

**Gezielte Erzeugung und Analyse transgener Mäuse
zur Aufklärung der Funktion der C-terminalen
Domäne des Cx43 Proteins *in vivo***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Karen Maaß

aus

London

Bonn, Juli 2004

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

1. Referent: Prof. Dr. Klaus Willecke

2. Referent: Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtman

Tag der Promotion: _____

Danksagung

Prof. Dr. Klaus Willecke danke ich insbesondere für die Überlassung des spannenden Themas sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung beim Aufbau neuer Kooperationen. Auch für die mir eingeräumten Freiheiten in der Bearbeitung der Fragestellungen möchte ich mich bedanken.

Prof. Dr. Karl Heinz Scheidtmann danke ich für die Übernahme des Koreferates und seine Hilfe in wissenschaftlichen und technischen Fragen. Mehr als einmal haben nicht nur ich sondern auch Kommilitonen in anderen Arbeitsgruppen von dem von ihm vermittelten Wissen profitiert.

Für die erfolgreichen Kooperationen, mit deren Hilfe die Bedeutung der Connexin43 Regulation für die epidermale und kardiale Morphogenese anschaulich demonstriert werden konnte, gilt mein Dank: Prof. Dr. V. Herzog, Dr. G. Kirfel und U. Kukulies (Bonn), Dr. J.-S. Kim (Seoul) und Dr. K. Tiemann (Bonn). Prof. Dr. E. Winterhager und Dr. R. Grümmer (Essen) danke ich für die histologische Analyse adulter Ovarien. Besonderen Dank für ihre sehr engagierte Mitarbeit möchte ich Manulela Saathoff und Alexander Ghanem (Bonn) aussprechen.

Für die Kooperation in der eigenen Arbeitsgruppe, sei es experimenteller Art oder durch Bereitstellung transgener Tiere, modifizierter embryonaler Stammzellen, Antikörper Bakterienstämme oder Plasmide, danke ich vor allem PD Dr. Otto Traub, Christian Schliecker, Gaby Schwarz sowie Dr. Martin Theis, der insbesondere zu Beginn meiner Doktorarbeit viele konstruktive Vorschläge einbrachte. Ina Fiedler bin ich für die Herstellung der transgenen Mäuse mittels Blastozysteninjektion sehr zu Dank verpflichtet. Für die zeitweilige Unterstützung in der Genotypisierung transgener Tiere sowie in der Anfertigung von Kryoschnitten gilt mein Dank Gabi Matern sowie Marco Schneider, Eva van Rossum, Gaby Schwarz und „meinen“ technischen Hilfskräften Jochen Welcker und Radek Dobrowolski. Danken möchte ich zudem herzlich „meinen“ Laborblöckerinnen Jennifer Bohnen und Sonja Burak für ihre hilfreiche Mitarbeit bei der Erzeugung und Analyse transgener Mäuse. Für die Pflege meiner transgenen Tiere möchte ich mich bei Daniela Hupfer und Sandra Spindler bedanken. Für das sehr schnelle und hilfreiche Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit möchte ich mich besonders bei Dr. Joachim Degen sowie Dr. Stephanie Urschel und Markus Kretz bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie sowie insbesondere meiner Bonner Wohngemeinschaft für die mir während der Doktorarbeit gewährte Unterstützung und Ablenkung. Zu dieser Wohngemeinschaft zähle ich selbstverständlich auch meine Laborschwestern Joana Fischer, Britta Döring und Kerstin Wellershaus.

Danksagung		III
Inhaltsverzeichnis		IV
Abbildungsverzeichnis		X
Abkürzungsverzeichnis		XII
1. Einleitung		1
1.I	Gap Junctions	1
1.I.1	Aufbau der Gap Junction Kanäle	1
1.I.2	Topologie der Connexine	3
1.I.3	Die genomische Organisation der Connexine	3
1.I.4	Funktion der Gap Junctions	4
1.I.5	Regulation der Gap Junction Bildung	4
1.II	Cx43 Gap Junction Kanäle	5
1.II.1	Regulation von Cx43 Gap Junction Kanälen	5
1.II.1.1	Interaktionen mit anderen Proteinen	5
1.II.1.2	Regulation durch Phosphorylierung	6
1.II.1.3	Die Regulation bei intrazelluläre Ansäuerung erfolgt über einen intramolekularen „Ball-and-Chain“ Verschlussmechanismus	7
1.II.1.4	Weitere über den intramolekularen „Ball-and-Chain“ Mechanismus erfolgende Regulationen	8
1.II.1.5	Regulation bei Veränderung der intrazellulären cAMP-oder Kalzium- Konzentration	8
1.II.1.6	Einfluss der carboxyterminalen Domäne auf die Wachstumskontrolle	8
1.II.2	Ausprägungsmuster von Cx43 in der adulten Maus	9
1.II.2.1	Epidermis	10
1.II.2.1A	Aufbau der Epidermis	10
1.II.2.1B	Die epidermale Permeabilitätsbarriere	11
1.II.2.1C	Expression von Connexinen in der adulten Epidermis	13
1.II.2.2	Ovarien und Cx43	14
1.II.2.3	Das Herz	15
1.II.2.3.A	Connexinausprägung im adulten Herzen	15
1.II.2.3.B	Elektrophysiologie des Herzens	16
1.II.2.3.C	Herzerkrankungen durch Störungen der Repolarisation	17
1.II.3.1	Embryonale Expression von Cx43 in der Maus-Epidermis	19
1.II.4	Cx43 und humane Erkrankungen	20
1.III.	Erzeugung transgener Mäuse	21
1.III.1	Einfacher Genersatz	21
1.III.2	Doppelter Genersatz	21
1.IV	Connexin43 Mausmutanten	22
1.V	Ziel der Arbeit	24
2. Material		25
2.I	Chemikalien und Enzyme	25
2.II	Medien, Stammlösungen und Puffer	25
2.II.1	Allgemeine Lösungen	25

2.II.2	Lösungen für die Analyse von Nukleinsäuren	25
2.II.3	Lösungen für Bakterienkultur	28
2.II.4	Lösungen für die Kultur von eukaryotischen Zellen	29
2.II.5	Lösungen für die Isolierung und den Nachweis von Proteinen	30
2.II.6	Lösungen für Histologie, Elektronenmikroskopie und Überprüfung der Funktion der epidermalen Barriere	33
2.II.7	Lösungen für Blastozysteninjektion, Superovulation und Tierbetäubung	34
2.II.8	Fertige Lösungen	35
2.III	Kommerzielle Reagenzien-Sätze	36
2.IV	Oligonukleotide	36
2.IV.1	Oligonukleotide für Sequenzierungen	36
2.IV.2	Oligonukleotide für PCR-Analytik	37
2.V	Hybridisierungssonden	37
2.VI	Bakterienstämme	38
2.VII	Eukaryotische Zelllinien	38
2.VIII	Plasmide	38
2.IX	Größenstandards	39
2.X	Antikörper	39
2.X.1	primäre Antikörper	39
2.X.1	sekundäre Antikörper	40
2.XII	Geräte	41
2.XIII	Sonstige Materialien	42
3.	Methoden	43
3.I.	Methoden der Analyse von Nukleinsäuren	43
3.II	Methoden der Bakterienkultur	54
3.III	Methoden der Zellkultur	55
3.IV	Erzeugung, Haltung und Handhabung transgener Mäuse	59
3.V	Funktionale Analysen an transgenen Tieren <i>in toto</i>	61
3.VI	Histologische und elektronenmikroskopische Analysen	63
3.VII	Isolierung und Nachweis von Proteinen	66
4.	Ergebnisse	71
4.I	Analyse der Cx43K258stop Mutation im HeLa-Zellkultur System	71
4.I.1	Herstellung Cx43K258stop exprimierender HeLa-Zellen	72
4.I.2	Cx43K258stop lokalisiert in HeLa-Zellen ebenso wie Cx43 in die Plasmamembran	72
4.I.3	Cx43K258stop zeigt die selben heterotypischen Kopplungseigenschaften wie Cx43	73
4.I.4	Proteinanalytik von Cx43K258stop	76
4.I.4.1	Cx43K258stop wird als ein Protein des Molekulargewichtes von 28kD gebildet	76
4.I.4.2	Cx43K258stop kann cAMP-abhängig schwach phosphoryliert werden	76
4.I.4.3	Cx43K258stop Protein hat gegenüber Cx43 eine verlängerte	

	Halbwertszeit	77
4.II	Erzeugung der transgenen Mauslinie Cx43K258stop	79
4.II.1	Herstellung des Zielgenvektors “Cx43K258stop“	80
4.II.1.1	Klonierungsstrategie zur Erzeugung des Zielgenvektors Cx43K258stop	80
4.II.1.2	Herstellung des Basis-Homologievektors Cx43 target.2**	81
4.II.1.3	Klonierung des Zielgenvektors Cx43K258stop	82
4.II.1.4	Überprüfung des Zielgenvektors Cx43K258stop	83
4.II.1.4A	Restriktionsanalyse des Zielgenvektors	83
4.II.1.4B	Sequenzierung des Zielgenvektors	84
4.II.2	Herstellung des PCR-Testvektors “PCR-Cx43K258stop“	84
4.II.2.1	Klonierungsstrategie zur Herstellung des PCR-Testvektors PCR-Cx43K258stop	84
4.II.2.2	Klonierung des PCR Testvektors PCR-Cx43K258stop	85
4.II.2.3	Überprüfung des PCR-Testvektors mittels Restriktionsanalyse	85
4.II.3	Etablierung der PCR Cx43K258stop	86
4.II.4	Transfektion von ES-Zellen und Expansion 6-Thioguanin-resistenter Klone	87
4.II.5	Analyse der ES-Zellklone	87
4.II.5.1	PCR-Analyse der 6-Thioguanin resistenten ES-Zellklone	87
4.II.5.2	Karyotyp-Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellklone	88
4.II.5.3	Southern Blot-Analysen des homolog rekombinierten ES-Zellklones 63	89
4.II.6	Erzeugung und Zucht von transgenen Mäusen mit verkürzter cx43 kodierender Region	91
4.II.6.1	Erzeugung von chimären Tieren mittels Blastozysteninjektion homolog rekombinierter ES-Zellen	91
4.II.6.2	Überprüfung transgener Mäuse mittels PCR-Analytik	92
4.III	Analyse der transgenen Mauslinie Cx43K258stop	95
4.III.1	Cx43K258stop Tiere zeigen eine stark reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit	95
4.III.2	DNS-, RNS- und Protein-Analytik an überlebenden adulten Cx43K258stop Tieren	96
4.III.2.1	Southern Blot-Analysen der genomischen DNS aus Cx43K258stop Tieren	96
4.III.2.2	Cx43K258stop mRNS wird ebenso wie cx43 mRNS exprimiert	97
4.III.2.3	Cx43K258stop Protein wird in einigen adulten Geweben schwächer als Cx43 exprimiert	98
4.III.3	Neugeborene Cx43K258stop Tiere zeigen makroskopische Auffälligkeiten	100
4.III.4	Analyse der neonatalen Epidermis von homozygoten Cx43K258stop Tieren	101
4.III.4.1	Cx43K258stop Tiere haben eine defekte epidermale Permeabilitätsbarriere	101
4.III.4.2	Neonatale Cx43K258stop Epidermis zeigt gestörte Desquamation und verfrühte Bildung von Keratohyalin granulae	102
4.III.4.3	Immunfluoreszenz-Analysen der Epidermis	104
4.III.4.3.A	Filaggrin wird in neonataler Cx43K258stop Epidermis verfrüht gebildet	104
4.III.4.3.B	Cx43K258stop und Cx26 sind in neonataler Epidermis verändert	

	exprimiert	106
4.III.4.3.C	Cx43K258stop Epidermis zeigt keine verstärkte Proliferation	106
4.III.4.3.D	ZO-1 Protein wird in neonataler Cx43K258stop Epidermis verstärkt exprimiert	107
4.III.4.4	<i>Cx43K258stop</i> mRNA wird in Epidermis nicht verstärkt gebildet	108
4.III.4.5	Unterschiede in der Filaggrin-Prozessierung sowie der Connexin-Expression in neonataler Cx43K258stop Epidermis	108
4.III.5	Analyse der epidermalen Einschnürungen von neonatalen homozygoten Cx43K258stop Tieren	110
4.III.4.4	<i>Cx43K258stop</i> mRNA wird in Epidermis nicht verstärkt gebildet	108
4.III.4.5	Unterschiede in der Filaggrin-Prozessierung sowie der Connexin-Expression in neonataler Cx43K258stop Epidermis	108
4.III.5	Analyse der epidermalen Einschnürungen von neonatalen homozygoten Cx43K258stop Tieren	110
4.III.6	Analyse der Epidermis adulter Cx43K258stop Tiere	111
4.III.6.1	Filaggrin wird in adulten Cx43K258stop Tieren wie im Wildtyp exprimiert	111
4.III.6.2	Filaggrin zeigt in adulten Cx43K258stop Tieren eine normale Prozessierung	112
4.III.7	Analyse der Fertilität adulter Cx43K258stop Weibchen	113
4.III.7.1	Cx43K258stop Ovarien zeigen eine gestörte Follikelreifung	113
4.III.7.2	Cx43K258stop wird in Ovarien verstärkt exprimiert	114
4.III.8	Analyse der Herzen neonataler Cx43K258stop Mäuse	115
4.III.8.1	Neonatale Cx43K258stop Herzen zeigen nicht den Phänotyp von Cx43 Knockout Herzen	115
4.III.8.2	Neonatale Cx43K258stop Herzen weisen eine veränderte Form („Kugelherzen“) auf	116
4.III.8.3	Repolarisationsstörungen in 20 Prozent aller neonatalen Cx43K258stop Herzen	117
4.III.8.4	Immunfluoreszenz-Analysen neonataler Cx43K258stop Herzen	119
4.III.8.4A	Cx43K258stop, ZO-1 und β -Catenin Protein sind in Cx43K258stop Herzen erhöht	119
4.III.8.4B	Cx40 und Cx45 sind in Cx43K258stop Herzen nicht in ihrer Expression verändert	120
4.III.8.5	Western Blot-Analysen bestätigen die neonatal erhöhte Expression von Cx43K258stop	122
4.III.9	Analyse der Herzen adulter Cx43K258stop Mäuse	123
4.III.9.1	Adulte Cx43K258stop Herzen zeigen häufig eine abnormale Kugelform und Infarkte	123
4.III.9.2	Langzeit-EKG Messungen weisen auf eine Cx43K258stop Gendosis-abhängige Tendenz zu einer Verlängerung des QRS-Komplex hin	124
4.III.9.3	Echokardiographie-Analysen demonstrieren eine verminderte Funktion des linken Ventrikels in adulten Cx43K258stop Herzen	125
4.III.9.4	Immunfluoreszenz-Analysen an adulten Cx43K258stop Herzen	126
4.III.9.5	Western Blot-Analysen adulter Cx43K258stop Herzen	128

4.III.9.6	ZO-1 Protein wird in adulten heterozygoten Cx43K258stop Herzen verstärkt exprimiert	129
4.III.10	Cx43K258stop Tiere zeigen gestörte Verhornung des vorderen Verdauungstraktes	130
4.III.11	Erste Analysen von Tieren des Genotyps Cx43K258stop/Cx43del	132
4.III.11.1	Hemizygoter Cx43K258stop Tiere haben gegenüber homozygot mutierten Tieren eine gesteigerte Überlebenswahrscheinlichkeit	132
4.III.11.2	Hemizygoter Cx43K258stop Mäuse zeigen keinen funktionalen Defekt der epidermalen Barriere	133
5.	Diskussion	135
5.I	Analyse von Cx43 Protein mit stark verkürzter C-terminalen Domäne (Cx43K258stop) in HeLa Zellen	136
5.I.1	Cx43K258stop Protein wird in HeLa-Zellen in Form größerer Gap Junction Plaques exprimiert als Cx43	136
5.I.2	Cx43K258stop Protein zeigt eine erhöhte Stabilität	137
5.I.3	Cx43K258stop Protein bildet ebenso wie Cx43 heterotypische Gap Junction Kanäle aus	139
5.I.4	Erhaltene Funktionen des Cx43K258stop Proteins	140
5.I.5	Zusammenfassung der im HeLa-System gewonnenen Erkenntnisse im Hinblick auf die <i>in vivo</i> Expression des Cx43K258stop Proteins	141
5.II	Herstellung der transgenen Mauslinie Cx43K258stop	141
5.II.5	Transkriptmenge des <i>cx43K258stop</i> -Allels ist gegenüber <i>cx43</i> -mRNS unverändert	143
5.III	Homozygoter Cx43K258stop Tiere zeigen eine sehr hohe postnatale Letalität	144
5.III.1	Defekt der epidermalen Barriere in neonatalen Cx43K258stop Tieren	144
5.III.1.1	Interpretation der makroskopischen Analyse der epidermalen Barriere	145
5.III.1.2	Einfluss des Cx43K258stop Protein in neonataler Epidermis	147
5.III.1.2.A	Veränderte Lokalisation von Cx43K258stop in der Epidermis	147
5.III.1.2.B	Veränderte Gap Junction vermittelte Kommunikation in Cx43K258stop der Epidermis	147
5.III.1.3	Veränderte Expression und Prozessierung von Profilaggrin-Protein in neonataler Epidermis	148
5.III.1.4	Veränderte Expression von Cx26 und ZO-1 Protein in neonataler Epidermis	150
5.III.2	Vohwinkel Syndrom ähnlicher Phänotyp in neonatalen Cx43K258stop Mäusen	151
5.III.3	Morphologische und elektrophysiologische Anomalien in neonatalen Cx43K258stop Herzen	152
5.III.3.1	Cx43K258stop Herzen zeigen nicht den morphologischen Phänotyp von Tieren mit genereller Deletion des <i>cx43</i> Gens	152
5.III.3.2	Cx43K258stop Herzen zeigen eine veränderte Herzform und Proteinexpression	152
5.III.3.3	Atrioseptaler Defekt in einem neonatalem Cx43K258stop Herz	153
5.III.3.4	Repolarisationsstörungen in neonatalen Cx43K258stop Herzen	154
5.III.3.4.A	Direkter Einfluss der Cx43K258stop Mutation auf die Repolarization	154

5.III.3.4.B	Indirekter Einfluss der Cx43K258stop Mutation auf die Repolarization	154
5.IV	Erkenntnisse aus der Analyse adulter Cx43K258stop Tiere und Cx43del/Cx43K258stop Tiere	156
5.IV.1	Erzeugung der Cx43K258stop/Cx43del Mauslinie	156
5.IV.2	Epidermis überlebender Cx43K258stop Tiere zeigt normale Filaggrin-Expression und Prozessierung	157
5.IV.3	Ovarien überlebender Cx43K258stop Weibchen zeigen eine gestörte Follikelreifung	158
5.IV.4	Cx43K258stop Protein in adulten Cx43K258stop Herzen	159
5.IV.5	Veränderte Morphologie und Funktionalität adulter Cx43K258stop Herzen	160
5.IV.6	Veränderte Expression von ZO-1 in heterozygoten, adulten Cx43K258stop Herzen	161
5.V	Vergleich der Cx43K258stop Mauslinie mit humanen Erkrankungen durch Mutationen des <i>cx43</i> Gens	162
5.V.1	Cx43K258stop und Oculodentodigitale Dysplasie (ODDD)	162
5.V.2	Cx43K258stop und menschliche Herzmissbildungen	163
6.	Ausblick	164
6.I	Ausblick für Cx43K258stop exprimierende HeLa-Zellen	164
6.II	Ausblick für die weitere Aufklärung des epidermalen Phänotyps homozygoter Cx43K258stop Mäuse	164
6.II.1	Ausblick für die weitere Aufklärung des epidermalen Phänotyps an neonatalen Tieren	165
6.II.2	Ausblick für die weitere Aufklärung des epidermalen Phänotyps an primären Keratinozyten	166
6.II.3	Analyse der epidermalen Wundheilung	167
6.III	Ausblick für die weitere Aufklärung der veränderten Funktion homozygoter Cx43K258stop Herzen	167
6.III.1	Ausblick für die Untersuchung von primären Cx43K258stop Kardiomyozyten Kulturen	167
6.III.2	Ausblick für die Untersuchung von Cx43K258stop/Cx43del Herzen	168
6.IV	Ausblick für die weitere Aufklärung homozygoter Cx43K258stop Ovarien	168
6.IV	Ausblick für die Analyse anderer Cx43 exprimierender Gewebe	169
6.IV.1	Analyse der Blutgefäße hinsichtlich Atherosklerose	169
6.IV.2	Analysen der Astrozytenfunktion	169
7.	Zusammenfassung	171
8.	Literaturverzeichnis	172
Anhang		A-I
	Plasmidkarten	A-C
	Sequenzierungen des Zielgenvektors <i>Cx43K258stop</i>	D-E
	Tabelle der PCR-positiven ES-Zellklone	F
	Lebenslauf	G
	Veröffentlichungen	H
	Posterpräsentationen und Vorträge	H-I
	Erklärung und CD der Arbeit (PDF und Echokardiographien)	J

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Struktur von Gap Junction Verbindungen	2
Abb. 1.2:	Mögliche Anordnung von Connexinen in Gap Junction Kanälen	2
Abb. 1.3:	Carboxyterminale Domäne des Cx43 Proteins	6
Abb. 1.4:	“Ball-and-Chain” Modell	7
Abb. 1.5:	Schematischer Querschnitt durch adulte Maus-Epidermis	10
Abb. 1.6:	Entstehung des cornified envelope	11
Abb. 1.7:	Kalzium-Konzentration und „Lamellar Bodies“ Sekretion in Maus-Epidermis	13
Abb. 1.8:	Reifungsstadien von humanen Follikeln im adulten Ovar	14
Abb. 1.9:	Verteilung der Connexinausprägung im adulten Herzen	15
Abb. 1.10:	Phasen des humanen Elektrokardiogramms	16
Abb. 1.11:	Entwicklung der Septen im Vorhof	19
Abb. 1.12:	Doppelter Gensatz	22
Abb. 4.1:	Restriktionsanalyse des Expressionsvektors pBEHpac18::Cx43K258stop	71
Abb. 4.2:	Immunfluoreszenz Analytik an HeLa-Zellen	72
Abb. 4.3:	Vergleich der Kopplungseigenschaften zwischen Cx43 und Cx43K258stop Teil 1	74
Abb. 4.4:	Vergleich der Kopplungseigenschaften zwischen Cx43 und Cx43K258stop Teil 2	75
Abb. 4.5:	Western Blot Analyse von HeLa-Lysaten	76
Abb. 4.6:	cAMP-abhängige Phosphorylierung von Cx43K258stop	77
Abb. 4.7:	Halbwertszeitbestimmung von Cx43K258stop Protein mittels Pulse-Chase Experiment	78
Abb. 4.8:	Strategie des doppelten Gensatzes zur Erzeugung des <i>cx43K258stop</i> Allels	79
Abb. 4.9:	PCR-Mutagenese und Wiederherstellung des <i>cx43</i> Intron-Exon II Übergangs	80
Abb. 4.10:	Erzeugung und Überprüfung des Basis-Homologievektors <i>Cx43 target.2**</i>	82
Abb. 4.11:	Klonierung des Zielgenvektors <i>Cx43K258stop</i>	83
Abb. 4.12:	Vektorkarte und Überprüfung des Zielgenvektors <i>Cx43K258stop</i> mittels Restriktasen	83
Abb. 4.13:	Klonierung des PCR-Testvektors <i>PCR-Cx43K258stop</i>	85
Abb. 4.14:	Vektorkarte und Überprüfung des PCR-Testvektors <i>PCR-Cx43K258stop</i>	86
Abb. 4.15:	Überprüfung der homologen Rekombination des <i>cx43K258stop</i> -Allels im <i>cx43</i> Locus von 6-Thioguanin resistenten ES-Zellklonen mittels PCR	88
Abb. 4.16:	Karyotyp-Analyse	89
Abb. 4.17:	zu erwartende Hybridisierungssignale und Ergebnisse der Southern Blot Analytik	90
Abb. 4.18:	<i>Cx43K258stop</i> Chimäre	91
Abb. 4.19:	PCR-Analytik transgener Mäuse	93
Abb. 4.20:	Genotyp-korrelierte relative Überlebenswahrscheinlichkeit	95
Abb. 4.21:	Southern Blot-Analytik der genomischen DNS transgener Mäuse	96
Abb. 4.22:	Northern Blot-Analyse an adultem Herz-, Gehirn- und Leber-Gewebe	97
Abb. 4.23:	Western Blot-Analyse für adultes Herz, Gehirn und Leber	99
Abb. 4.24:	Makroskopischer Hautphänotyp und postnatale Letalität von neugeborenen <i>Cx43K258stop</i> Tieren	100
Abb. 4.25:	persistierende Einschnürungen und partielle Autoamutation an Schwänzen von adulten <i>Cx43K258stop</i> Tieren	100
Abb. 4.26:	Funktionale Überprüfung der epidermalen Barriere mittels Farbstoffpenetration	101
Abb. 4.27:	Histologie und Transmissions-elektronenmikroskopie an neonataler Epidermis	102

Abb. 4.28:	REM-Analyse an neonataler Epidermis Teil I	103
Abb. 4.29:	REM-Analyse an Cx43K258stop Epidermis Teil II	103
Abb. 4.30:	Immunfluoreszenz-Analyse neonataler Haut I	105
Abb. 4.31:	Immunfluoreszenz-Analyse neonataler Haut II	105
Abb. 4.32:	Analyse der Proliferation und der Expression von ZO-1 und β -Catenin in neonataler Epidermis	107
Abb. 4.33:	Northern Blot-Analyse postnataler Epidermis	109
Abb. 4.34:	Western Blot-Analyse postnataler Epidermis	109
Abb. 4.35:	Western Blot-Analytik für epidermale Connexine	109
Abb. 4.36:	Analyse der epidermalen Einschnürungen	110
Abb. 4.37:	Immunfluoreszenz-Analysen an adulter Haut	111
Abb. 4.38:	Immunblot-Analysen an adulter Cx43K258stop Epidermis	112
Abb. 4.39:	Histologie adulter Cx43K258stop Ovarien	113
Abb. 4.40:	Cx43K258stop Expression in adulten Ovarien	114
Abb. 4.41:	Histologie des Ausflusstraktes neonataler Herzen	115
Abb. 4.42:	<i>in situ</i> Vergleich neonataler Wildtyp und Cx43K258stop Herzen	116
Abb. 4.43:	Vier-Kammer-Histologie neonataler Herzen	116
Abb. 4.44:	ST- und QT-Anomalien in 20% aller homozygoter, neonataler Cx43K258stop Tiere	118
Abb. 4.45:	Vergleich der Expression von Cx43, Cx43K258stop, ZO-1 und β -Catenin Protein in neonatalen Cx43K258stop Herzen	119
Abb. 4.46:	Doppelimmunfluoreszenz-Analyse für ZO-1 und β -Catenin in neonatalen Cx43K258stop Herzen	120
Abb. 4.47:	Immunfluoreszenz-Analyse für Cx40 in neonatalen Cx43K258stop Herzen	121
Abb. 4.48:	Immunfluoreszenz-Analyse für Cx45 in neonatalen Cx43K258stop Herzen	121
Abb. 4.49:	Western Blot-Analysen an neonatalen Cx43K258stop Herzen	122
Abb. 4.50:	<i>in situ</i> und histologische Analyse adulter Cx43K258stop Herzen	123
Abb. 4.51:	Elektrokardiographie adulter Cx43K258stop Herzen	124
Abb. 4.52:	Echokardiographie an adulten Cx43K258stop Herzen	126
Abb. 4.53:	Vergleich der Expression von Cx43, Cx43K258stop, ZO-1 und β -Catenin Protein in adulten Cx43K258stop Herzen	127
Abb. 4.54:	Immunfluoreszenz-Analyse für Cx45 in adulten Cx43K258stop Herzen	127
Abb. 4.55:	Immunoblot-Analyse an adulten Cx43K258stop Herzen	128
Abb. 4.56:	Erhöhte ZO-1 Expression in heterozygoten Cx43K258stop Herzen	129
Abb. 4.57:	Genotyp-korrelierte, postnatale Gewichtszunahme neonataler Cx43K258stop Tiere	130
Abb. 4.58:	Histologische Analyse des Zungen- und Ösophagus-Epithels in neonatalen Cx43K258stop Tieren	131
Abb. 4.59:	Gesteigertes Überleben von hemizygoten Cx43K255stop Tieren	133
Abb. 4.60:	Funktionale Analyse der epidermalen Barriere an Cx43K258stop / Cx43del Tieren	134
Abb. 4.61 :	<i>In situ</i> Aufnahmen von adulten Cx43K258stop/Cx43del Herzen	134
Abb. 5.1:	Ausbildung der epidermalen Barriere der Maus	144
Abb. 5.2:	Metabolische Aktivitäten und Funktionen des <i>Stratum corneums</i>	149

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere oder Adenin	HF	Hellfeld
A. bidest	Zweifach destilliertes Wasser	HR	homologe Region
Ac	Azetat	HPRT	Hypoxanthin-Guanosin Phosphoribosyltransferase
AK	Antikörper oder Ausgangsklon	HO	homozygot
amp	Ampizillin-Restistenzgen	HT	heterozygot
APS	Ammoniumpersulfat	IB	Immunoblot
AS	Aminosäurerest	IF	Immunfluoreszenz
ATP	Adenosintriphosphat	Ig	Immunglobulin
BCI	Blastozysteninjektion	IGF	Insulinlike Growth Factor
bp	Basenpaare	IOD	Intensity of optical density
BrdU	5-bromo-2'-desoxy-Uridin	i.p.	intraperitoneal
BSA	Rinderserum-Albumin	IP	Immunpräzipitation
C	Cytosin	K	Lysinaminosäurerest oder Keratin Protein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	kb	Kilobasen
CCG	Proteinfamilie; Akronym aus Connective Tissue Growth Factor/Cystein Rich 61/ Nephroblastoma overexpressed	KI	Knock-in
cDNS	zu mRNS komplementäre DNS	kD	Kilodalton
CDR	kodierende Region	KO	Knock-out
Ci	Curie	LB	Luria-Bertani
Cx	Connexin	LH	luteinisierendes Hormon
db-cAMP	Dibutyl-cAMP	LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
DDSA	Dodecenyln-bernsteinsäureanhydrid	M	Mol (mol/Liter)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	MEM	Modified Eagle Medium
DMP-30	2,4,6-Tris(dimethylamino-methyl)- phenol	mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
DMPC	Dimethylpyrokarbonat	NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
DMSO	Dimethylsulfoxid	NaOH	Natronlauge
DNase	Nuklease	NCS	Neugeborenen-Kälberserum
DNS	Desoxyribonukleinsäure	NMA	Methyl-norboren-2,3- dicarbonsäureanhydrid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	NOV	Nephroblastoma o verexpressed Protein
dpc	<i>dies post coitum</i> ; Tage nach Empfängnis	OD	Optische Dichte
DTT	1,4-Dithio-DL-threit	ODDD	Oculodentodigitale Dysplasie
ECL	Enhanced Chemiluminescence Reaction	pac	Puromyzin-Restistenzgen
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	pBEHpac	Expressionsplasmid BEHpac
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)- N,N,N',N'-tetraessigsäure	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
EKG	Elektrokardiographie	pBSK	Klonierungsplasmid Blueskript
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen der Maus	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
EtBr	Ethidiumbromid	PDGF	Platelet derived Growth Factor
EtOH	Ethanol	PDZ	Proteindomäne; Akronym aus PSD- 95/SAP90, Discs-large und ZO-1, den drei zuerst Proteinen mit PDZ- Domäne.
FCS	Fötale Kälberserum	Pen/Strep	Penicillin /Streptomycin
FSH	Follikelstimulierendes Hormon	PFA	Paraformaldehyd
g	Erdbeschleunigung	PGK	Phosphoglyzeratkinase
G	Guanin	pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
°C	Grad Celsius	PKA	Proteinkinase A
HAT	Hypoxantin-Aminopterin-Thymidin	PKC	Proteinkinase C
hCG	humanes Chorion Gonadotropin		
HE	Hämatoxylin-Eosin		

PVDF	Polyvinylidendiflorid
QTc	gegen Herzfrequenzrate korrigiertes QT-Interval im EKG
REM	Rasterelektronen- mikroskopie
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPRR	Small prolin rich region Protein
SSC	Natriumzitronensäuresalz-Puffer
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
TBS	Tris-gepufferter Puffer
TEM	Transmissionselektronen- mikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen- diamin
TdP	Torsade de points; spezifische Tachykardie des longQT-Syndroms
TK	Thymidinkinase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
U	Enzym-Aktivitätseinheiten
UCA	Urocansäure
ün	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
Vol.	Volumen
v/v	Volumen / Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht / Volumen
WT	Wildtyp
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β - D-galaktosid
Y	Tyrosinaminosäurerest
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	Zonula occludens Protein 1

Die gängigen SI Einheiten sowie Elementesymbole wurden in dieses Abkürzungsverzeichnis nicht mit aufgenommen, da sie als hinlänglich gebräuchlich und bekannt erachtet wurden.

1. Einleitung

Zellverbindungen sind eine Grundvoraussetzung für die Ausbildung mehrzelliger Gewebe. Neben den Kontakten der Zelle zur Extrazellulären Matrix bestehen direkte Zell-Zellverbindungen. Diese vermitteln mechanischen Stabilität und spezifische Interaktionen zwischen Zellen und werden funktional in drei Gruppen unterteilt: Abschlussverbindungen (Tight Junctions/Zonula occludens) erzeugen eine Diffusionsbarriere und werden insbesondere in polarisierten Epithelien ausgebildet. Haftverbindungen (Adherens Junctions/Zonula adhaerens und Desmosomen/Macula adhaerens) verbinden das Zytoskelett über Zellgrenzen hinweg und verleihen einem Gewebe somit Stabilität. Kommunizierende Verbindungen (Gap Junctions/Nexus) werden im Folgenden genauer erläutert.

1.I Gap Junctions

Gap Junctions zeichnen sich elektronenmikroskopisch (Abb. 1.1 A, B) dadurch aus, dass der Abstand zwischen zwei benachbarten Plasmamembranen von 20-30 nm in diesem Bereich auf 2-4 nm verengt ist (Revel und Karnovsky, 1967). Hieraus resultiert im elektronenmikroskopischen Bild der Eindruck einer Lücke (engl.: gap) in der Kontinuität der benachbarten Plasmamembranen. Die Gap Junction Verbindungen der Säugetiere werden aus Connexin-Proteinen aufgebaut. Ähnliche Zell-Zellverbindungen werden im Tierreich ab der Stufe der Coelenterata gefunden (Fraser et al., 1987). Diese topologisch und funktional ähnlichen Strukturen werden in Invertebraten von Innexin-Proteinen ausgebildet (Phelan und Starich, 2001), welche den Pannexinen der Vertebraten zu entsprechen scheinen (Panchin et al., 2000; Bruzzone et al., 2003). Vermutlich entstanden die verschiedenen Formen kommunikativer Zellverbindungen durch konvergente Evolution. Im Weiteren wird ausschließlich auf durch Connexine aufgebaute Gap Junctions Bezug genommen.

1.I.1 Aufbau der Gap Junction Kanäle

Gap Junctions treten als Ansammlungen in sogenannten Gap Junction Plaques von einigen wenigen bis mehreren tausend Einzelkanälen auf (Abb. 1.1 A-D). Diese Kanäle bilden in ihrem Inneren eine hydrophile Pore, welche die zytoplasmatischen Kompartimente benachbarter Zellen verbindet. Ein Gap Junction Kanal besteht aus zwei Halbkanälen, Connexonen, wobei eine der benachbarten Zellen jeweils einen Halbkanal ausbildet (Abb. 1.1 B). Ein Connexon ist ein Hexamer, das sich rosettenförmig aus Transmembranproteinen, den Connexinen, zusammensetzt (Nicholson, 2003). Connexone können homomer aus Connexinproteinen eines Typus (Risek et al., 1994; Sosinsky, 1995) oder heteromer aus verschiedenen aufgebaut werden (Kumar und Gilula, 1996; Bevans et al.,

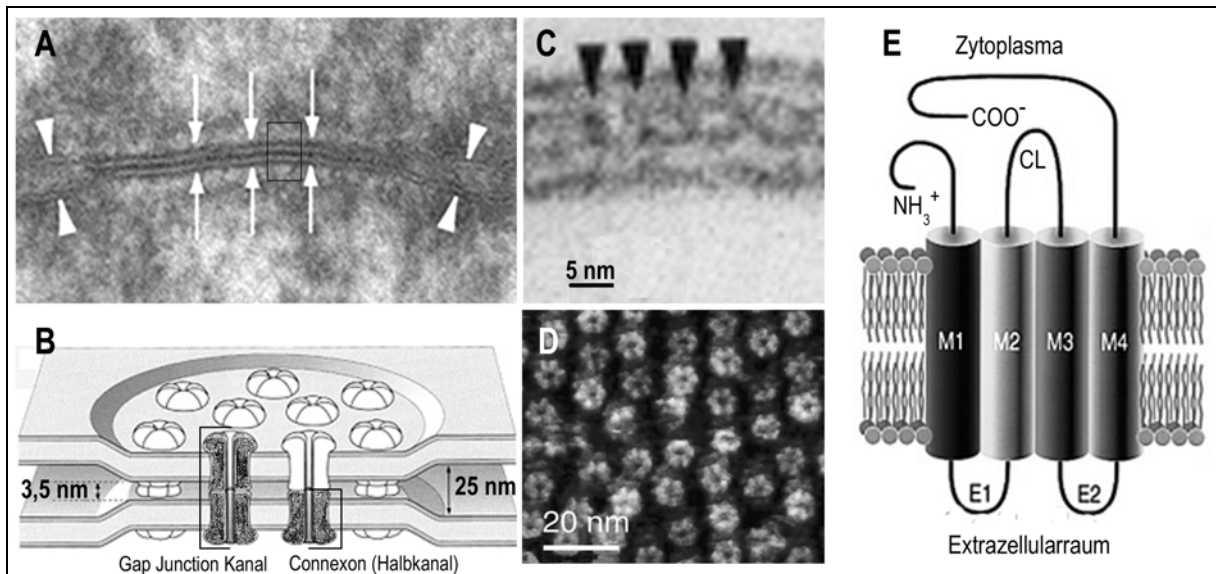


Abb. 1.1: Struktur von Gap Junction Verbindungen

Elektronenmikroskopische (A, C), schematische (B) und Rasterkraft-mikroskopische (D) Darstellung von Gap Junction Plaques. Die Pfeile in A deuten auf den auf 3,5 nm verengten Abstand der benachbarten Zellmembranen innerhalb eines Gap Junction Plaques, die Pfeilköpfe auf den normalen Abstand von 25 nm. C entspricht einem Ausschnitt aus A; Pfeilköpfe weisen auf Kanäle hin, die den Interzellulärraum durchspannen. In D sind die angehäuften hexameren Connexone eines Plaques zu erkennen. E zeigt die Topologie eines Connexin-Proteins mit vier α -helicalen Transmembrandomänen (M1 –M4), zwei extrazellulären Schleifen (E1 und E2) und den zytoplasmatischen Domänen des C-Terminus, N-Terminus sowie der zytoplasmatischen Schleife (cytoplasmic loop, CL) (Abbildungen teilweise verändert aus: De Zeeuw et al., 2003; Gros et al., 1983; Kandel et al., 1996; Nicholson 2003; Kumar und Gilula, 1996).

1998). Zudem können die am Aufbau beteiligten Zellen gleichartig oder verschieden zusammengesetzte Connexone ausprägen (Abb. 1.2), so dass homotypische oder heterotypische Gap Junction Kanäle gebildet werden (Elfgang et al., 1995; Übersicht in: Kumar und Gilula, 1996). Da Zellen meist mehr als ein Connexinprotein gleichzeitig exprimieren, ist die Varianz an strukturell einzigartigen Gap Junction Kanälen groß.

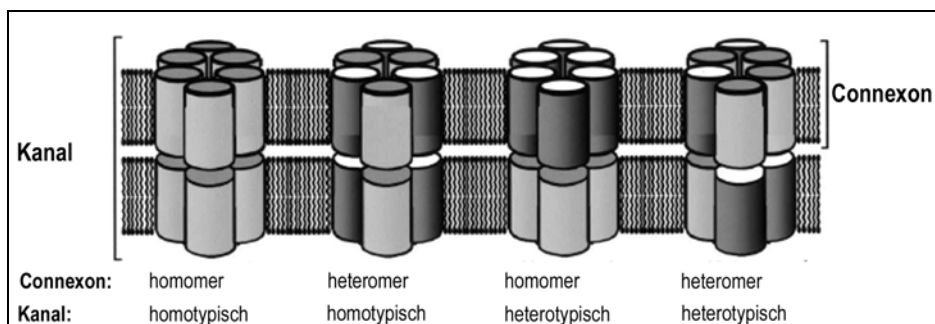


Abb. 1.2: Mögliche Anordnung von Connexinen in Gap Junction Kanälen

Connexone können aus gleichen (homomer) oder verschiedenen Connexinen (heteromer) aufgebaut sein. Gap Junction Kanäle können aus zwei gleichartig (homotypisch) oder verschieden aufgebauten Connexonen (heterotypisch) gebildet werden (modifiziert nach nach Evans und Martin, 2002).

1.1.2 Topologie der Connexine

In Nagern sind bisher 20 und im Menschen 21 verschiedene Connexine beschrieben (Söhl und Willecke, 2003). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen lässt vermuten, dass alle Mitglieder der Connexinfamilie Transmembranproteine mit ähnlicher Topologie sind (Abb. 1.1 E). Vorgeschlagen von Beyer et al. (1987), werden Connexine seit 1988 durch die Abkürzung "Cx" und ihr aus der cDNS abgeleiteten Molekulargewicht in Kilodalton (kD) bezeichnet. Hochauflösende Elektronen-Kristallographie Analysen (Unger et al., 1999) bestätigen ein Modell, nachdem Connexine die Plasmamembran viermal durchqueren. Durch die zytoplasmatische Lage des Amino- und Carboxyterminus lassen sich somit neun verschiedene Domänen unterscheiden (Abb. 1.1 E): Vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Schleifen sowie die drei zytoplasmatischen Bereiche der aminoterminalen Domäne, der zytoplasmatischen Schleife und der carboxyterminalen Domäne. Die Regionen mit der geringsten Sequenzhomologie innerhalb der Connexinproteine sind die zytoplasmatische Schleife und die carboxyterminale Domäne. Letztere kann in ihrer Länge zwischen 16 (Cx26; Zhang und Nicholson, 1989) und 269 (Cx57; Hombach et al., 2004) Aminosäuren variieren. Neben der erwähnten Nomenklatur nach Beyer werden Connexinproteine auch auf Grund der Sequenzhomologie der zytoplasmatischen Schleife in die α -, β -, γ -, δ - und ϵ - Gruppen eingeteilt (Gimlich et al., 1990; Söhl et al., 1998), wobei die Gruppenmitglieder unter Voranstellung der Abkürzung gj (Gap Junction Protein) in der Reihenfolge der Entdeckung nummeriert werden. Die meisten Connexine werden den zwei Hauptklassen der alpha- (Länge der Schleife zwischen 48 und 55 Aminosäurereste) und beta-Gruppe (Länge der Schleife zwischen 28 und 35 Aminosäurereste) zugeordnet. Die im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehende Connexin-Isoform wird in der Literatur alternativ als Cx43 oder gj α -1 bezeichnet.

1.1.3 Die genomische Organisation der Connexine

Fast alle Connexingene weisen die gleiche genomische Organisation auf: Sie bestehen aus zwei Exonen, wobei das untranslatierte Exon I durch einen Intronbereich von dem das komplette Leseraster enthaltenden Exon II getrennt ist (Zhang und Nicholson, 1989; Hennemann et al., 1992a). Ausnahmen (Übersicht in: Söhl und Willecke, 2003) bestehen für die Connexingene *cx36*, *cx39*, *cx57*, *hcx31.3* und *cx23*, welche eine Verteilung der kodierenden Region auf zwei oder drei Exone zeigen. Zudem weisen die Connexingene *cx30*, *cx32* und *cx45* alternatives Spleißen durch die Wahl alternativer Promotoren auf. Für die Multigenfamilie der Connexine wird auf Grund ihrer hohen Sequenzhomologie vermutet, dass sie aus einem Connexin-Stammgen durch Duplikationsereignisse hervorgegangen sind (Bruzzone et al., 1996; Kumar und Gilula, 1996). Dennoch liegen die bisher entdeckten Connexingene der Maus nur zum Teil in enger chromosomaler Lokalisation (Hsieh et al., 1991; Schwarz et al., 1992; Übersicht in: Söhl und Willecke).

1.I.4 Funktion der Gap Junctions

Gap Junction Kanäle erlauben die regulierte elektrische und metabolische Kopplung von Zellen. Die Durchlässigkeit von Gap Junction Kanälen für Ionen (Zaniboni et al., 2003), Stoffwechselmetabolite (Gabriel et al., 1998) und die sekundären Botenstoffe Kalzium, zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) (Saez et al., 1989) und Inositol 1,4,5-Trisphosphat (Niessen et al., 2000) ist belegt (Übersicht in: Nicholson et al., 2000). Gap Junction Kanäle variieren je nach ihrer Connexin-Zusammensetzung in ihrer Permeabilität (Qu & Dahl, 2002) und Einzelkanalleitfähigkeit (Suchyna et al., 1999). Durch unterschiedliche Connexin-Expression in benachbarten Zellen wird somit während der Morphogenese und in adulten Geweben variable interzelluläre Kommunikation ermöglicht (Kumar und Gilula, 1996; Valiunas et al., 2002). Zudem wurde auch eine Abgabe von ATP oder NAD^+ über ungepaarte Halbkanäle in den Extrazellulärraum postuliert (Ebihara, 2003; Goodenough und Paul, 2003). Gap Junction Kanäle können durch Phosphorylierung (Saez et al., 1998) sowie im Zuge pathologischer Veränderungen der intrazellulären Ionenkonzentration verschlossen werden (Peracchia et al., 2000). In neuronalen Geweben dienen Gap Junctions einer schnellen Reizweiterleitung (Übersicht in: Zoidl und Dermitzel, 2002) sowie der Synchronisation von Neuronen (Landisman et al., 2002). Als "elektrische Synapsen" (Revel und Karnovsky, 1967; Bennett, 1997) gewährleisten Gap Junctions die synchrone Kontraktion des Arbeitsmyokards im Herzen (Gros und Jongsma, 1996; Severs et al., 2004) sowie des Myometriums während der Geburt (Orsino et al., 1996). Der Verlust von Connexinen kann in Mausmodellen zu Störungen der Embryonalentwicklung führen (Reaume et al., 1995; Krüger et al., 2000). Connexinen wird zudem gewebespezifisch eine Funktion als Tumorsuppressoren zugeschrieben (Temme et al., 1997; Zhang et al., 2003).

1.I.5 Regulation der Gap Junction Bildung

Die Zusammenlagerung der Connexin-Monomere erfolgt posttranslational im Endoplasmatischen Reticulum. Connexone werden anschließend meist weiter über das *trans*-Golgi-Netzwerk entlang von Mikrotubuli zur Zellmembran sortiert (Evans and Martin, 2002), wobei für Cx26 auch ein alternativer Transport direkt vom Endoplasmatischen Reticulum zur Plasmamembran belegt ist (Martin et al., 2001). Die Integration von Connexonen erfolgt bevorzugt abseits von Zellverbindungen, wonach sich die Halbkanäle in der Plasmamembran lateral bewegen und in die Außenränder bestehender Gap Junction Plaques einfügen (Lauf et al., 2002; Gaietta et al., 2002). Die Ausbildung neuer Gap Junction Plaques ist vermutlich ein kooperativer Prozess, wobei der zeitbestimmende Schritt die Kopplung der ersten Connexone aus benachbarten, aber noch nicht angenäherten Membranen ist (Valiunas et al., 1997). Eine Erleichterung des Prozesses über Wechselwirkungen mit Proteinen der Zelladhäsionskontakte wie E-Cadherin (Fujimoto et al., 1997) wird diskutiert. Für Cx43 sind direkte und indirekte Protein-Protein Wechselwirkungen festgestellt worden (Übersicht in: Delmar et al., 2004), die vermutlich Einfluss auf die Expression haben und im Folgenden genauer erläutert werden.

1.II Cx43 Gap Junction Kanäle

1.II.1 Regulation von Cx43 Gap Junction Kanälen

Aus Cx43 aufgebaute Gap Junction Kanäle werden über verschiedene Mechanismen in ihrem Öffnungszustandes reguliert. Die Vermittlung der Regulation erfolgt dabei jeweils über die carboxyterminale Domäne des Proteins (Abb. 1.3).

1.II.1.1 Interaktionen mit anderen Proteinen

In regenerierenden Glanzstreifen des Herzens konnte die Kollokalisierung von Cx43-Protein mit dem Zonula occludens Protein-1 (ZO-1, Stevenson et al., 1986) nachgewiesen werden (Toyofuku et al., 1998; Barker et al., 2002). Sie erfolgt direkt über die Bindung der letzten vier carboxyterminalen Aminosäurereste des Cx43-Proteins an die zweite PDZ-Domäne (Übersicht in: Hung und Sheng, 2001) des ZO-1-Proteins (Giepmans und Moolenaar, 1998). Vermutlich vermittelt die Bindung an PDZ-Proteine das Lokalisationsmuster ("Clustering") zahlreicher Membranproteine (Bezprozvanny und Maximov, 2001). Die mittels Immunopräzipitation nachgewiesene Kollokalisierung von Connexinen und intrazellulären Zelladhäsionskontakt-Proteinen wie β -Catenin (Wu et al., 2003), N-Cadherin und p120-Catenin (Xu et al., 2001) deutet neben der postulierten wechselseitigen Beteiligung von Adhärenz-Verbindungen und Gap Junctions an der Ausbildung von Zellkontakten (Fujimoto et al., 1997; Wu et al., 2003) auch auf eine mögliche Beteiligung an Signaltransduktionsereignissen hin (Ai et al., 2000). Kürzlich wurde der Einfluß von p120-Catenin auf den intrazellulären Transport (Chen et al., 2003), die Stabilität der Expression in der Zellmembran (Thoreson et al., 2000) und die Degradation (Xiao et al., 2003; Davis et al., 2003) von Cadherinen belegt. Ähnliche Funktionen könnte p120-Catenin als ein Wächter der Zelladhäsion (Übersicht in: Pfeifer und Yap, 2003) auch für Cx43 Gap Junctions erfüllen. Analysen des Herzgewebes von Mäusen mit ubiquitärer Cx43 Deletion zeigten jedoch, dass der Aufbau von sowohl Zonula als auch Macula adherens auch ohne Cx43 Protein unverändert erfolgt (Gutstein et al., 2003). Dies bedeutet, dass Cx43 Gap Junctions zumindest nicht essentiell für die Ausbildung dieser Zellverbindungen im Herzen sind. Über Drebrin wurde kürzlich eine direkte Interaktion zwischen der carboxyterminalen Domäne von Cx43 und dem Aktin-Zytoskelett nachgewiesen (Butkevich et al., 2004). Es wird nun ein dem Cadherin-Catenin-System analoger Mechanismus der Verknüpfung von Cx43 mit dem Aktin-Zytoskelett mittels Drebrin postuliert. Für Cx43 wurde mittels Immunopräzipitation zudem eine Kollokalisierung mit Caveolin 1 gezeigt (Schubert et al., 2002). Auch hierdurch könnte die Lokalisation von Gap Junction Plaques zu spezialisierten Plasmamembran- Bereichen ("lipid rafts") reguliert werden. Eine direkte Interaktion mit Mikrotubuli erfolgt für

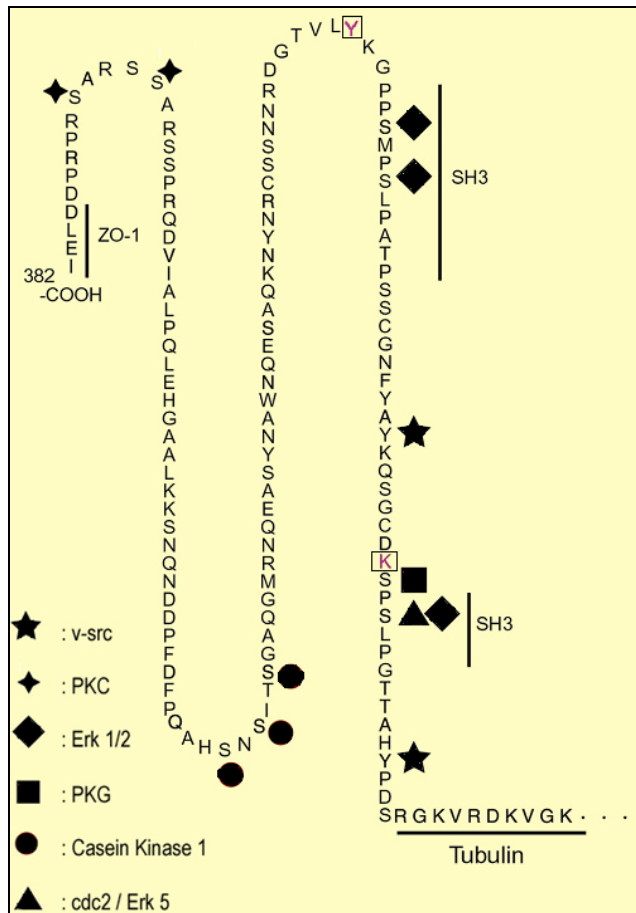


Abb. 1.3: Carboxyterminale Domäne des Cx43 Proteins

Dargestellt ist die carboxyterminale Domäne des Cx43 Proteins im Anschluss an die vierte Transmembrandomäne.

Direkte Protein-Interaktionsstellen:

ZO-1 (AS 379-382)

v-Src (AS 274-284)

α - und β -Tubulin (AS 234-243)

Belegte Phosphorylierungsstellen:

v-Src (Y247, Y265, Lau et al., 1996)

cdc2/Erk5 (S255, Warn-Cramer et al., 1996)

Erk1/2 (S255, S279, S282, Warn-Cramer et al., 1996)

PKG (S257, Kwak et al., 1995)

Casein Kinase 1 (S325, S328, S330, Cooper und Lampe, 2002)

PKC (S372, S368, Saez et al., 1993)

Markierte Aminosäurreste:

K258: für Ball-and-Chain Studien gewählte Stop-Mutation ("M257")

Y286: Tyrosinrest für endosomal/lysosomales Targeting

(modifiziert nach Nicholson, 2003)

Cx43 ebenfalls über eine Domäne der carboxyterminalen Region (Giepmans et al., 2001a). Schließlich wurde für die Src Proteinkinase eine direkte Protein-Protein Wechselwirkung nachgewiesen (Giepmans et al., 2001b). Die Interaktion mit Src bedarf einer Prolin-reichen SH3 Domäne sowie des Tyrosinrestes Y265 (Toyofuku et al., 2001).

1.II.1.2 Regulation durch Phosphorylierung

Die aus 156 Aminosäureresten bestehende carboxyterminale Region des Cx43 Proteins (Abb. 1.3) beinhaltet zahlreiche Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen (Musil et al., 1990). Neben der Regulation des Öffnungszustandes (Kim et al., 1999; Lampe et al., 2000) wird über Phosphorylierungen auch die Halbwertszeit des Cx43 Proteins beeinflusst (Musil et al., 2000). Zudem können mittels Phosphorylierung direkte Protein-Protein-Interaktionen verändert werden. So scheint die Src induzierte Phosphorylierung einen direkten Einfluß auf die Cx43-ZO-1 Interaktion in Kardiomyozyten zu nehmen (Toyofuku et al., 2001). Neben den in Abb. 1.3 aufgeführten Proteinkinasen, sind zudem Phosphorylierungen der carboxyterminalen Domäne durch Proteinkinase A (PKA), Kalzium-Calmodulin-abhängige Kinase II (Übersicht in: Hossain und Boynton, 2000) und die Stress-aktivierte Proteinkinase JNK belegt (Petrich et al., 2002). Die Degradation von Connexinen ist auf Grund ihrer sehr kurzen Halbwertszeit von ein bis fünf Stunden (Saffitz et al., 2000) ebenfalls ein Mechanismus der Gap Junction Regulation. Thomas et al. (2003) zeigten, dass die reguläre Halbwertszeit des humanen Cx43 Proteins von zwei Stunden auf

sechs Stunden verlängert wird, wenn Tyrosinrest 286 (Abb. 1.3) gegen einen Phenylalaninrest ausgetauscht wird. Dies wurde auf die Zerstörung einer für den endosomalen/lysosomalen Abbauweg essentiellen Erkennungssequenz durch den Austausch des erwähnten Tyrosinrestes zurückgeführt. Gap Junction Kanäle werden sowohl als Vollkanäle (annuläre Gap Junctions) als auch als Halbkanäle endozytiert (Übersicht in: Saffitz et al., 2000). Am Abbau scheinen sowohl das proteosomale als auch das lysosomale System beteiligt zu sein (Laing et al., 1998)

1.II.1.3 Die Regulation bei intrazelluläre Ansäuerung erfolgt über einen intramolekularen „Ball-and-Chain“ Verschlussmechanismus

Lokalisierte Abfall des extra- und intrazellulären pH-Wertes tritt unter pathologischen Begebenheiten in Folge einer Sauerstoff-Unterversorgung (Hypoxie) auf. Diese besteht beispielsweise bei unzureichender oder fehlender atrialer Blutzufuhr durch die Minderdurchblutung (Ischämie) eines Gewebes. Gap Junction Kanäle zeigen unter ischämischen Bedingungen einen schnellen Verschluss der Kanalpore, wobei die pH-Sensitivität von der Connexin-Zusammensetzung eines Connexons abhängig ist (Spray und Burt, 1990; Francis et al., 1999). Für Cx43 Connexone wurde durch Verkürzungsexperimente nachgewiesen, dass das pH-abhängige Schließen der Kanalpore abhängig von der Länge der carboxyterminalen Domäne ist (Liu et al., 1993). Da der Verschlussmechanismus *in vitro* durch Koexpression der zuvor deletierten Domäne wiederhergestellt werden konnte (Morley et al. 1996), wird für Cx43 ein intramolekulares Ball und Kette (engl: „Ball-and-Chain“) Modell postuliert (Übersicht in: Delmar et al., 2004), vergleichbar der Inaktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle (Hoshi et al., 1990). Hierbei dient eine Peptidsequenz aus dem Bereich der carboxyterminalen Domäne (Duffy et al., 2001) als Partikel („Ball“), der bei intrazellulärem Anstieg der Protonenkonzentration die hydrophile Gap Junction Kanalpore verschließt (Abb. 1.4). Dieser Ball bindet intramolekular an eine Rezeptordomäne des Cx43-Proteins im Bereich der Kanalöffnung. Diese Rezeptordomäne befindet sich innerhalb der Aminosäurereste 119 bis 144 in der zweiten Hälfte der zytoplasmatischen Schleife (Duffy et al., 2002). Als intramolekulare Kette verbindet dabei die carboxyterminale Domäne Partikel und Rezeptor (Ek-Vitorin et al., 1996, Calero et al., 1998). Der Verschluss scheint ein kooperativer Prozeß mehrerer Cx43-Untereinheiten zu sein, da Monomere der carboxyterminalen Domäne bei Abfall des pH-Wertes unter Veränderung ihrer Sekundärstruktur dimerisieren (Delmar et al., 2004).

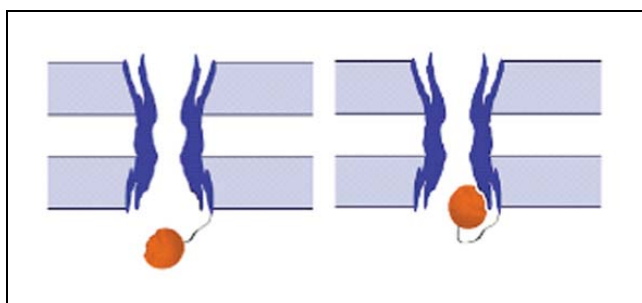


Abb. 1.4: „Ball-and-Chain“ Modell

Links: Unter normalen Bedingungen ist die Ball-Domäne (orange) von der Kanalpore entfernt. Rechts: bei entsprechender Stimulierung schwingt die Domäne in Richtung der Kanalöffnung und bindet an eine Rezeptordomäne, die der Pore angegliedert ist. Hierdurch wird der Kanal geschlossen oder zumindest in seiner Permeabilität verändert (modifiziert nach Delmar et al., 2004).

1.II.1.4 Weitere über den intramolekularen „Ball-and-Chain“ Mechanismus erfolgende Regulationen

Durch weitere Analysen *in vitro* konnte belegt werden, dass auch zahlreiche andere Einflüsse zu einem Verschluss von Cx43 Gap Junction Kanälen mittels des „Ball-and-Chain“ Mechanismus führen. So erfolgt hiedurch der Kanalverschluss nach Stimulation mit Insulin/IGF (Homma et al., 1998) oder PDGF (Moorby and Gherardi, 1999). Auch ein Verschluss von Cx43 Gap Junction Kanälen in Folge einer erhöhten Potentialdifferenz zwischen Zytoplasmata miteinander kommunizierender Zellen konnte auf diesen Mechanismus rückgeführt werden (Moreno et al., 2002). Für die nach Phosphorylierung erfolgende Schließung von Cx43 Gap Junction Kanälen (siehe 1.II.2.3) wurde zumindest für die Src-Kinase ebenfalls der „Ball-and-Chain“ Mechanismus als zu Grunde liegend nachgewiesen (Zhou et al., 1999).

1.II.1.5 Regulation bei Veränderung der intrazellulären cAMP-oder Kalzium-Konzentration

Ein Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration führt zu einer erhöhten Cx43-vermittelten Gap Junction Kommunikation (Darrow et al., 1995) durch den Transport von neuen Cx43-Connexonen zur Plasmamembran (Paulson et al., 2000). Dieser Transport ist abhängig von Proteinkinase A-vermittelter Phosphorylierung des Serinrestes 364 der carboxyterminalen Domäne. Aus carboxyterminal verkürzten Connexinen bestehende Connexone zeigten eine deutlich verlangsamte Integration in die Plasmamembran (TenBroek et al., 2001). Vermutlich ist die carboxyterminale Region daher wichtig für die Interaktion mit intrazellulären Transportproteinen. Erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentrationen führen, vermittelt über Aktivierung der Proteinkinase C, zu einer Reduktion der Cx43 Gap Junction vermittelten Kommunikation (Doble et al., 2000). Beispielsweise scheint in der embryonalen Herzentwicklung die Kontrolle des Öffnungszustandes von Cx43 Gap Junction Kanälen über eine Feinregulation mittels PKA- und PKC-vermittelter Phosphorylierungen realisiert zu werden (Duncan und Fletcher, 2002; Britz-Cunningham et al., 1995).

1.II.1.6 Einfluss der carboxyterminalen Domäne auf die Wachstumskontrolle

Kürzlich wurde eine aktive Rolle der carboxyterminalen Domäne des Cx43 Proteins in der Proliferationskontrolle von HeLa-Zellen postuliert (Dang et al., 2003). Expression der carboxyterminalen Domäne bestehend aus den Aminosäurereste 243-382 resultierte in einer Reduktion der Zellproliferation. Desweiteren wurde die direkte Interaktion der carboxyterminalen Domäne des Cx43 Proteins mit Nephroblastoma overexpressed Protein (NOV) beschrieben (Gellhaus et al. In press). NOV ist ein Mitglied der Connective Tissue Growth Factor/Cysteine Rich 61/Nephroblastoma overexpressed Familie (CCG), welcher eine Beteiligung an Entwicklung und Differenzierung, Angiogenese, Wundheilung, Migration, Entzündungsprozessen und Tumorwachstum zugeschrieben wird (Übersicht in: Brigstock, 1999). Cx43 Transfektion in Gliomazellen (Gupta et al., 2001) oder malignen

Trophoblastzellen (Gellhaus et al, in press) führte neben reduzierten Proliferation auch zu einer verstärkten Lokalisation des NOV Proteins an die Zellmembran. In menschlichem Dickdarmkrebsgewebe wurden Mutationen innerhalb der carboxyterminalen Domäne des Cx43 Proteins innerhalb invasiver Tumorstrukturen entdeckt (Dubina et al., 2002). Da entsprechende Mutationen nicht in benignen Vorstufen auftraten, wird eine Verbindung mit späten Stadien der Tumorprogression postuliert.

1.II.2 Ausprägungsmuster von Cx43 in der adulten Maus

Cx43 Protein wurde bei der Isolierung von Gap Junction Plaques aus dem Herzen entdeckt (Manjunath et al., 1984). Im adulten Herz wird Cx43 Protein insbesondere im Arbeitsmyokard exprimiert (Übersicht in: Severs et a., 2004). Des Weiteren wird Cx43 Protein in endothelialen Zellen (Haefliger et al., 2004; Theis et al., 2004) sowie in der glatten Muskulatur der Gefäße (Haefliger et al., 2004), des Darms (Wang und Daniel, 2001) und des Uterus (Mitchell und Lye, 2001) gefunden. Astrozyten des ZNS (Theis et al., 2003), Epithelzellen der Augenlinse und Cornea (White et al., 2001; Laux-Fenton et al., 2003), Keratinozyten des *Stratum basale* und *spinosum* (Kretz et al., 2003) sowie myoepitheliale Zellen der Milchdrüsen (Plum et al., 2000) enthalten ebenfalls Cx43 Protein. Keimdrüsen exprimieren Cx43 Protein sowohl in den Leydig- und Sertoli-Zellen des Hodens (Roscoe et al., 2001) wie auch in den Granulosa-Zellen reifender Follikel des Ovars (Gittens et al., 2003). Zudem wurde die Expression von Cx43 Protein in hämatopoetischen Zellen des Rückenmarks (Oviedo-Orta und Evans, 2004) sowie in Thymus (Alves et al., 1995) und Milz nachgewiesen (Krenacs et al., 1996). Auch in den Odontoblasten sich entwickelnder Zähne (Murakami et al., 2001) und in Osteoblasten (Castro et al., 2003) wurde die Expression von Cx43 Protein belegt. Im Folgenden wird die funktionale Expression von Cx43 Protein für drei Gewebe genauer beschrieben, die im Zentrum dieser Arbeit stehen,.

1.II.2.1 Epidermis

1.II.2.1A Aufbau der Epidermis

Das gefäßlose, stratifizierende, verhornende Epithel, welches die gesamte Körperoberfläche bedeckt, wird als Epidermis (Oberhaut) bezeichnet. Zusammen mit der sich hierunter befindenden Dermis (Lederhaut) bildet sie die Haut (Cutis), das größte Organ der Säugetiere. Der Hauptbestandteil dieses Organs sind Keratinozyten, welche innerhalb des Epithels von basal nach apikal differenzieren und die Grenzschicht zum Körperäußeren als Korneozyten bilden (Abb. 1.5). Die Funktionen der Keratinozyten umfassen die selbständige Regeneration der Epidermis nach Verwundungen (Martin, 1997) sowie die Aufrechterhaltung einer Barrierefunktion gegen Austrocknung und Eindringen von schädigenden Mikroorganismen oder Toxinen (Cartlidge, 2000). Zehn Prozent der epidermalen Zellpopulation stellen zudem pigmentproduzierende Melanozyten, immunologisch aktive Langerhans-Zellen und sensorisch aktive Merkel-Zellen. Die morphologisch unterscheidbaren Schichten der Epidermis zeigen im Zuge ihrer Differenzierung eine veränderte Proteinexpression. Spezifische Proteine der Basalzellschicht sind beispielsweise die Keratine 5, 14 und 15 (Fisher und Holbrook, 1987).

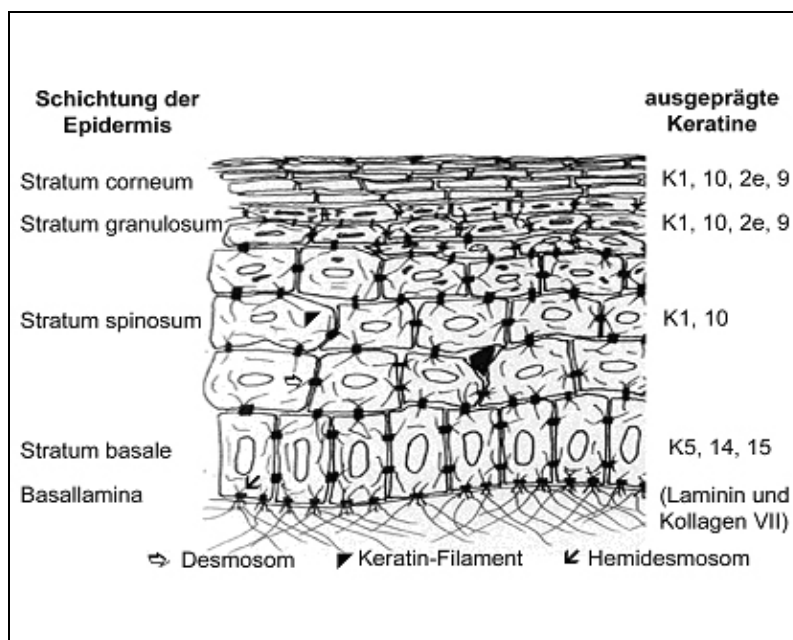


Abb. 1.5: Schematischer Querschnitt durch adulte Maus-Epidermis

Dargestellt sind die differenzierenden Keratinozyten-Schichten, die hierin jeweils ausgeprägten Keratine sowie das aus ihnen aufgebaute Intermediär-filament- Zytoskelett der Epidermis.

K: Keratin

(Schema zur Verfügung gestellt von Prof. T. Magin).

Ab dem *Stratum spinosum* exprimieren Keratinozyten die Keratine 1 und 10 (Fuchs, 1990). Im *Stratum granulosum* werden zusätzlich die Keratine 2e und 9 ausgeprägt (Herzog et al., 1994). Im Zuge der terminalen Differenzierung werden zudem Filaggrin (Pressland et al., 1997; 2004) sowie zahlreiche für eine funktionale Verhornung des *Stratum corneum* notwendige Proteine und Enzyme synthetisiert (Übersicht in: Kalinin et al., 2002). Das *Stratum basale* enthält Zellen, welche die Fähigkeit zur kontinuierlichen Zellteilung besitzen,

wobei die eigentlichen epidermalen Stammzellen wahrscheinlich zum Großteil in der Balg-Region der Haarfollikel zu finden sind (Übersicht in: Potten und Booth, 2002).

1.II.2.1B Die epidermale Permeabilitätsbarriere

Für ein terrestrisches Leben *ex utero* ist die epidermale Permeabilitätsbarriere essentiell. Diese Barriere wird aus terminal differenzierten Keratinozyten, den Korneozyten („Ziegel“, siehe Abb. 1.6) und spezialisierten Lipiden („Mörtel“, siehe Abb. 1.6 und 1.7) gebildet (Übersicht in: Madison, 2003). Korneozyten bestehen aus einem kompakt gepackten Keratinfilament-Skelett und einer durch zahlreiche quervernetzte Proteine gebildeten Hülle, dem sogenannten „cornified envelope“ (engl: verhornte Umhüllung, siehe Übersicht in: Kalinin et al., 2002). Die Bündelung von Keratinfilamenten wird durch Filaggrin (Presland et al., 1992) ermöglicht. Um einer vorzeitigen Aggregation vorzubeugen, wird dieses Protein zunächst als hochphosphoryliertes Profilaggrin synthetisiert, bestehend aus 13 Filaggrinuntereinheiten. Im Zuge der ansteigenden Kalziumkonzentration (siehe Abb. 1.7 A) wird Profilaggrin von Kalzium-abhängigen Enzymen dephosphoryliert und zu Monomeren prozessiert (Resig et al., 1993). Die „cornified envelope“ Proteine Envoplakin, Periplakin (Ruhberg et al., 1996) und Involucrin (Eckert et al., 1993) werden im Zuge der ansteigenden Kalziumkonzentration insbesondere im *Stratum granulosum* synthetisiert, assoziieren mit der Plasmamembran und

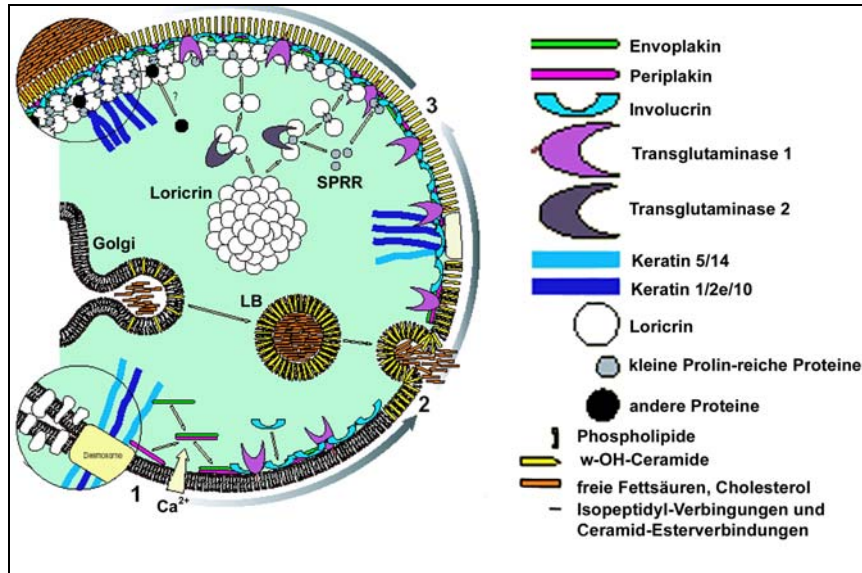


Abb. 1.6: Entstehung des cornified envelope

- 1: Initiation der Bildung des cornified envelopes (Envoplakin, Periplakin, Involucrin)
- 2: Bildung des lipid envelopes über Exozytose von Lamellar Bodies (LB)
- 3: Verstärkung des cornified envelopes (Loricrin und SPRRs)

LB: Odland oder Lamellar Bodies
 SPRR: small prolin-rich region proteins
 (modifiziert nach Kalinin et al., 2001)

werden hier durch die Transglutaminase 1 über Glutaminreste an spezielle Fettsäurereste quervernetzt (Kalin et al, 2002). Hierzu erfolgt am Golgi Apparat der Granulosazellen die Bildung von „Odland- oder Lamellar Bodies“ (Odland und Holbrook, 1981). Diese Vesikel setzen sich aus ω -hydroxy-Ceramiden mit sehr langen Fettsäureketten sowie großen Mengen an freien Fettsäuren, Cholesterolen, Cholesterolestern und anderen Ceramiden zusammen und beinhalten Hydrolasen (siehe Übersicht in: Elias, 2004). Zwischen *Stratum corneum* und

Stratum granulosum fusionieren die „Lamellar Bodies“ mit der Plasmamembran, wodurch diese schließlich zu einer unpolaren, reinen Lipidhülle umgewandelt wird („lipid envelope“, Nemes et al., 1999), an die intrazellulär die Proteine des „cornified envelopes“ kovalent verknüpft sind. Zum anderen gelangen durch die Exozytose der „Lamellar Bodies“ transportierte Lipide und modifizierende Enzyme in den Interzellulärraum. Durch Prozessierung dieser Lipide entstehen multilamellierte Lipidschichten, welche als Dichtungsmaterial den Bereich zwischen den Korneozyten ausfüllen und durch ihren unpolaren Charakter die Wasser-Permeabilitätsbarriere verstärken (Fluhr et al., 2001; Behne et al., 2002). Abschließend erfolgt intrazellulär durch die Transglutaminase 3 eine Verstärkung des „cornified envelopes“ mittels der Quervernetzung von Loricrin (Hohl et al., 1991) und kleinen Prolin-reichen Proteinen (Koizumi et al., 1996) an die bestehende Proteinmatrix. Zellorganelle, Mikrotubuli und Mikrofilamente werden genauso wie der Großteil der Zell-Zellverbindungen abgebaut (Kalinin et al., 2001). Im *Stratum corneum* erfolgen neben der Prozessierung von Lipiden noch weitere Prozesse. So wird das histidinreiche Filaggrin Protein vermutlich durch Cathepsine und Histidase umgewandelt (Scott und Harding, 1986; Elias, 2004). Hier bei entsteh zum einen die osmotisch wirksame Urocansäure (UCA, urocanic acid) (Krien und Kermici, 2000), welche zur Aufrechterhaltung der Flexibilität des *Stratum corneums* wichtig ist („Humectans“) und zum anderen Protonen. Zahlreiche Barrierefunktionen scheinen von der Regulation des pH-Wertes in der Epidermis abhängig zu sein: Lipidprozessierung und hiermit die vollständige Ausbildung multilamellierter Lipidschichten und der epidermalen Permeabilitätsbarriere, antimikrobielle Aktivität und sowohl die regulierte Kohäsion als auch die anschließende Desquamation der Korneozyten (Übersicht in: Elias et al., 2004). Neben Histidin können auch Glutamin und Arginin durch Desaminierung zu „Humectans“ umgesetzt werden (Übersicht in: Rawlings and Harding, 2004). Defekte der epidermalen Permeabilitätsbarriere in Mausmodellen (Übersicht in: Segre, 2003) wurden für Mutationen in Genen der terminalen Differenzierung beschrieben. So zeigen Mäuse mit Deletion des epidermalen Wachstumsfaktors Krüppel-like Faktor 4 (Segre et al., 1999), der Transglutaminase 1 (Matsuki et al., 1998) oder der Lipidprozessierenden Matripase 1 (List et al., 2002) postnatale Lethalität durch vollständigen Verlust der epidermalen Barriere. Tiere, welche eine mutierte Form des Retinolsäure-Rezeptors exprimieren, zeigen auf Grund einer fehlerhaften Lipidsynthese nur unvollständige Ausbildung von multilamellierten Lipidschichten. Ein kleiner Teil der Tiere kann den postnatalen Barrieredefekt durch Hyperkeratose überleben (Attar et al., 1997). Expression einer mutierten Form des Loricrin Proteins führte postnatal zu einer eingeschränkten Barrierefunktion, welches spätestens an Tag 11 durch die verstärkte Expression anderer „cornified envelope“ Proteine kompensiert wurde (Suga et al., 2000). Auch Mutationen in Zellkontaktproteine wie Claudin 1 (Furuse et al., 2002), Claudin 6 (Turksen und Troy, 2002) oder Desmocollin 1 (Chidgey et al., 2001) können zu einem Verlust der epidermalen Barriere führen. Während eine kurzzeitige Störung der epidermalen Barrierefunktion durch eine

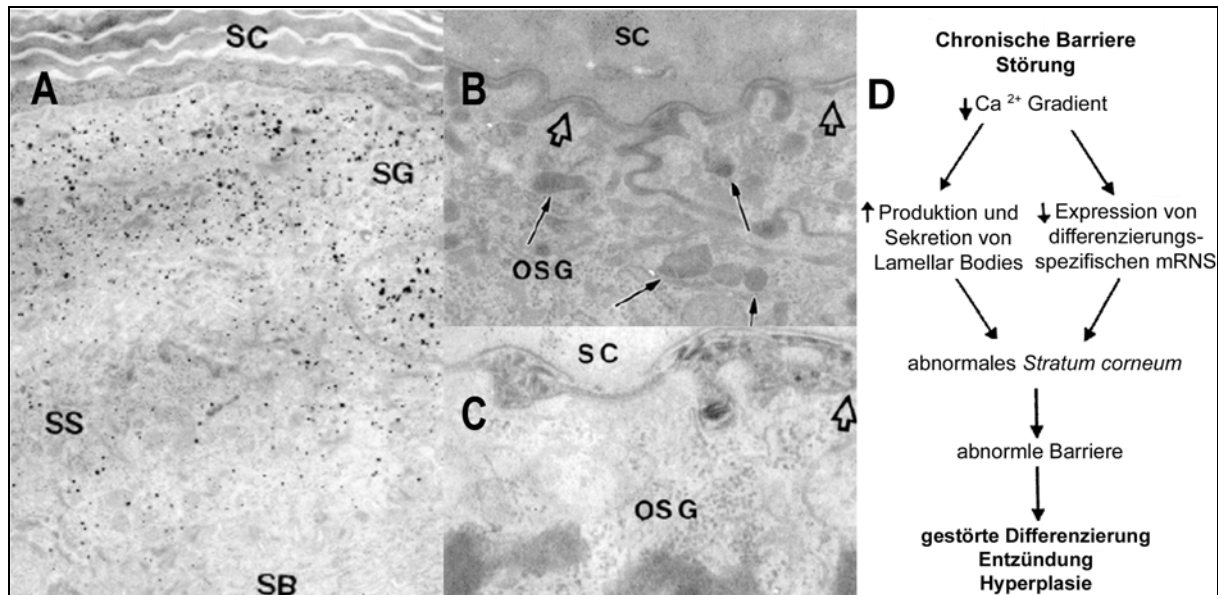


Abb. 1.7: Kalzium-Konzentration und „Lamellar Bodies“ Sekretion in Maus-Epidermis

A: Kalziumgradient der Epidermis: höchste Konzentrationen befinden sich in der äußeren Schicht des Stratum granulosum (SG) (Präzipitation von Kalzium in der Epidermis durch Natrium-Pyroantimon und anschließende OsO_4 -Postfixierung). B,C: Lokalisation von Lamellar Bodies in unversehrter (B) und Aceton-behandelter Epidermis (C). Während sich die Vesikel in unversehrter Haut innerhalb der äußeren Granulosazellen (OSG) befinden, sind sie nach Störung der epidermalen Barriere im Interzellularraum (große Pfeile in B und C) zwischen *Stratum corneum* (SC) und *Stratum granulosum* zu finden. D: Schema des Zusammenhangs zwischen Störungen der epidermalen Barriere, Kalziumkonzentration, Lamellar Bodies und Funktionalität des *Stratum corneum*. SS: *Stratum spinosum*, SB: *Stratum basale*. (modifiziert nach Elias et al., 2002).

verstärkte Exozytose von „Lamellar Bodies“ ausgeglichen wird (Abb. 1.7 C), ist in chronischen Defekten auf Grund einer gestörten terminalen Differenzierung das *Stratum corneum* so stark betroffen, dass die Barrierefunktion nicht wiederhergestellt werden kann (Abb. 1.7 D). Als Sensor für eine gestörte epidermale Barriere werden Veränderungen des epidermalen Kalzium Gradienten vermutet (Elias et al., 2002).

1.II.2.1C Expression von Connexinen in der adulten Epidermis

Cx43 wird neben Cx40 in der postnatalen Epidermis der Maus in *Stratum basale* und zusammen mit Cx31 und Cx31.1 im *Stratum spinosum* exprimiert. In den terminal differenzierenden Lagen des *Stratum granulosum* werden insbesondere Cx31 und Cx31.1 ausgeprägt. Cx37 scheint in der gesamten Epidermis exprimiert zu werden. In erkrankter Haut wird im *Stratum granulosum* zudem eine hohe Expression von Cx26 gefunden (Übersicht in: Richard, 2000). Transkripte weiterer Connexine sind nachgewiesen worden (Hennemann et al., 1992b; Dahl et al., 1996a). Im Gegensatz zur Maus wird Cx43 in menschlicher Epidermis zusammen mit Cx31 insbesondere im *Stratum granulosum* ausgeprägt, während die Keratinozyten des *Stratum basale* vornehmlich Cx26 exprimieren (Übersicht in: Richard, 2000).

1.II.2.2 Ovarien und Cx43

In der Rindenzone des Ovars erfolgt die Reifung der Keimzellen. Während die Vermehrungsphase der Oogenese vor der Geburt abgeschlossen ist, erfolgt die Reifungsperiode unter Einbeziehung des umgebenden Bindegewebes in Form der Ausbildung und Reifung eines Follikels zum größten Teil erst nach der Geburt. In der Fetalzeit gebildet Oogonien sind im Ovar als ruhende Primärfollikel erkennbar (Abb. 1.8 A). Mit Einsetzen der Geschlechtsreife beginnt die weitere Follikelreifung. Sekundärfollikel (Abb. 1.8 B) zeichnen sich durch ein mehrschichtiges, prismatisches Epithel aus, zudem entsteht zwischen Oozyte und Follikelzellen die *Membrana pellucida*. Im Zuge der Reifung entstehen flüssigkeitsgefüllte Lücken, die sich schließlich zu einem Hohlraum (*Antrum*) vereinigen (A in Abb. 1.8 C). Im Tertiärfollikel ragt die Oozyte schließlich auf einem Hügel aus Follikelepithelzellen (*Cumulus oophorus*) ins *Antrum* hinein. Das Innere des *Antrums* wird von Granulosazellen ausgekleidet, einer Lage aus abgeflachten Follikelzellen. Während die Oozyte ausschließlich Cx37 exprimiert (Kidder und Mhawi, 2002), exprimieren die Zellen des Follikelepithels mindestens sechs Connexine, einschließlich Cx43 (Wright et al., 2001).

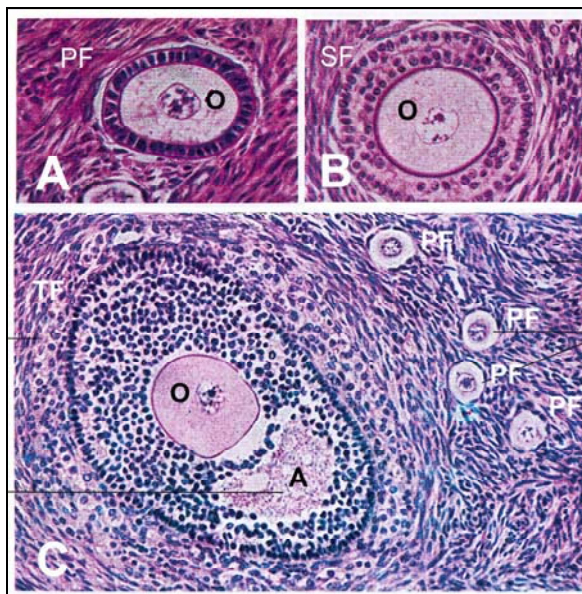


Abb. 1.8: Reifungsstadien von humanen Follikeln im adulten Ovar

A: Primärfollikel (PF) bestehen aus einer im Diktyotänstadium arretierter Oozyte (O) und einem einschichtigen, stark abgeflachten Follikelepithel.
 B: Das Follikelepithel eines Sekundärfollikels (SF) ist mehrschichtig. In diesem Stadium lässt sich auch schon deutlich die Membrana pellucida der Oozyte erkennen.
 C: Beginnende Bildung eines Tertiärfollikels (TF). Im Zentrum liegt die Oozyte mit deutlich erkennbarer Membrana pellucida und Nucleolus. Das mehrschichtige Epithel des Follikels wird durch die Sekretion von Follikelflüssigkeit auseinandergedrängt, so dass ein Hohlraum, das Antrum (A) entsteht. Im rechten Bildteil sind Primärfollikel zu erkennen.
 (modifiziert nach Kühnel, Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie, 1989)

Das in Granulosazellen ausgeprägt Cx43 Protein (Okuma et al., 1996) zeigt eine veränderte Phosphorylierung und Expression in Abhängigkeit von hormonellen Signalen (Granot und Dekel, 1998). Neben der Versorgung der Oozyte mit Nährstoffen scheint auch die Arretierung der Meiose mittels Erhaltung eines hohen cAMP Spiegels die wesentliche Aufgabe von Cx43 Gap Junctions während der Follikelreifung zu sein. Nach Stimulation mit luteinisiertem Hormon (LH) erfährt Cx43 eine Phosphorylierung und anschließende Reduktion der Expression (Granot und Dekel, 1998). Diese scheint nicht in erster Linie durch verstärkte Degradation, sondern durch Reduktion der *cx43* mRNA Translation zu erfolgen (Kalma et al., 2004).

Analysen von Cx43 defizienten Ovarien zeigten eine starke Einschränkung der Follikelreifung, nur Primärfollikel mit einem einschichtigen Epithel wurden gebildet (Juneja et al., 1999). Obwohl Follikelzellen auch andere Connexine exprimieren, scheint Gap Junction vermittelte Kommunikation mittels Cx43 essentiell für die Reifung zu sein (Ackert et al. 2001; Gittens et al. 2003). Nach der Ovulation eines reifen Graafschen Follikels erschlafft der leere Follikel und wird durch das Eindringen von Blut zum *Corpus rubrum*. Dieser entwickelt sich durch Proliferation der Granulosazellen zum *Corpus luteum*. Im Fall einer Schwangerschaft bleibt dieser zunächst bestehen und produziert Progesteron und Östrogene. Letztlich erfolgt eine Umwandlung zu Narbengewebe (*Corpus albicans*) und schließlich dessen Resorption.

1.II.2.3 Das Herz

Das Herz (Cor) ist ein muskulöses Hohlorgan (Abb. 1.9), dessen Muskelschicht (Myokard) von einer serösen Haut (Epikard) umschlossen und von einer mehrschichtigen Innenschicht (Endokard) ausgekleidet wird. Das Herz wird von einer Scheidewand (Septum) in eine linke und eine rechte Hälfte unterteilt, die ihrerseits jeweils aus einem Vorhof (Atrium) und einer Kammer (Ventrikel) bestehen. Zwischen dem Lungen- und Körperkreislauf gelegen, sorgt das Herz in Form einer Saug- und Druckpumpe für die Bewegung des Bluts.

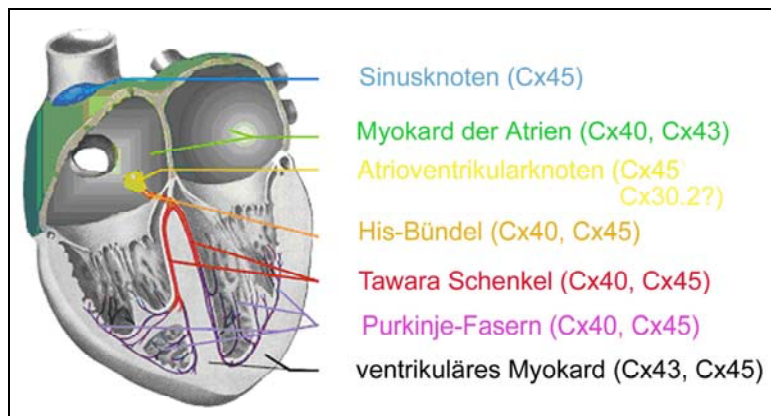


Abb. 1.9: Verteilung der Connexinausprägung im adulten Herzen

Expression der Connexine Cx30.2, Cx40, Cx43 und Cx45 im adulten Mausherz (modifiziert nach Verheijck et al., 2001).

(Schema des humanen Herzens, modifiziert nach Netter et al., 1993).

1.II.2.3.A Connexinausprägung im adulten Herzen

Im adulten Herz werden insbesondere die Gap Junction Proteine Cx40, Cx43 und Cx45 ausgeprägt (Abb. 1.9, Übersicht in: van Veen, 2001; Severs et al., 2004). Während Cx43 in Kardiomyozyten des gesamten Myokards stark exprimiert wird, findet sich Cx40 insbesondere in den Herzmuskelzellen des Atriums und kaum im Ventrikel. Cx45 wird in beiden Typen von Kardiomyozyten sehr schwach exprimiert (Vozzi et al., 1999). Im reizweiterleitenden System des Herzens werden insbesondere Cx45 und Cx40 ausgeprägt (Coppen et al., 1999). Vermutlich ist die variable Kombination aus Cx40 Gap Junction Kanälen mit einer hohen Einzelkanalleitfähigkeit von 145 pS und Cx45 Gap Junction Kanälen mit einer sehr geringen Einzelkanalleitfähigkeit von 35 pS im reizweiterleitenden System essentiell für die unterschiedlichen Reizleitungsgeschwindigkeiten in diesem komplexen System. (van Veen et al., 2001; Valiunas et al., 2002). Kürzlich wurde in unserer

Arbeitsgruppe die Expression eines weiteren Connexins im Herzen belegt. Cx30.2 scheint im Atrioventrikulärknoten exprimiert zu werden (Maria Kreuzberg, persönliche Mitteilung). Im Übergang zum Arbeitsmyokard findet sich in den Purkinje-Fasern eine Koexpression von Cx45 und Cx43 (Coppen et al., 1999).

1.II.2.3.B Elektrophysiologie des Herzens

In den Schrittmacherzellen des im rechten Atrium gelegenen Sinusknotens erfolgt die Erregungsbildung des Herzens (Boyett et al., 2000). Durch eine geringe Leitfähigkeit für Natrium- und Kalziumionen im Ruhezustand entsteht ein Präpotential. Dies führt durch die spannungsabhängige, kurzzeitige Öffnung von Natrium- und Kalzium-Ionenkanälen zur Ausbildung eines Aktionspotentials. Die Erregung breitet sich von hier auf beide Vorhöfe und den Atrioventrikulärknoten aus und gelangt dann über das Hiss-Bündel mit seinen beiden Tawara-Schenkeln zu den Purkinje-Fasern, welche die Erregung auf das Kammermyokard übertragen. Hier breitet sich die Erregung von innen nach außen und von der Spitze (Apex) zur Basis aus. Die elektrische Aktivierung der einzelnen Herzbereiche (Abb. 1.10) lässt sich als wandernde Erregungsfront durch die Ableitung der Potentialdifferenzen zwischen zwei Punkten auf der Körperoberfläche in Form eines Elektrokardiogramms (EKG) graphisch darstellen (Waller, 1887). Dies erfolgt durch Summation der Größe und Richtung der verschiedenen gleichzeitig auftretenden Potentiale (Vektoren). Die P-Welle entspricht der atrialen Depolarisation, das PQ-Intervall umfasst den Zeitraum vom Beginn der atrialen bis zum Beginn der ventrikulären Erregung. Das QRS-Intervall gibt die ventrikuläre Depolarisation an und überlagert die Repolarisation der Vorhöfe. Das QT-Intervall repräsentiert die Gesamtdauer der ventrikulären De- und Repolarisation. Für die Ausbildung

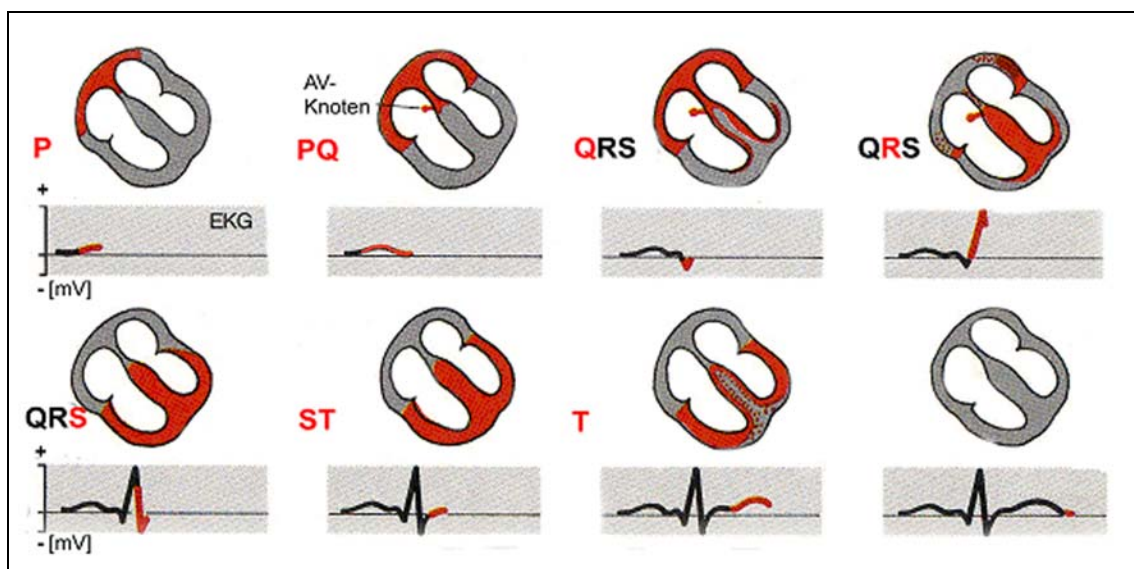


Abb. 1.10: Phasen des humanen Elektrokardiogramms

Dargestellt sind Depolarisation (rot) und Repolarisation (rot gepunktet) im Zuge der Erregungsausbreitung im Herz. Parallel ist unterhalb die jeweilige Phase im Elektrokardiogramm (EKG) rot eingezeichnet (modifiziert nach Silbernagel und Despopoulos, 1988).

eines Aktionspotentials sowie die Repolarisation in einzelnen Myokardzellen sind verschiedene spannungsabhängige Ionenkanäle verantwortlich (Übersicht in: Boyett et al.; 1996; Oto und Breithardt, Kapitel 2 und 3, 2001). Die Depolarisation der Kardiomyozyten wird durch spannungsabhängige Natrium- und Kalzium-Ionenkanäle vermittelt. Die Repolarisation erfolgt durch einen frühen sowie einen verzögerten Ausstrom von Kaliumionen. Eine unterschiedliche Verteilung dieser Ionenkanäle und damit die Dauer der Aktionspotentiale im Myokard, ermöglicht, dass die Erregung innerhalb des Myokards gerichtet weitergeleitet wird (Übersicht in: Antzelevitch und Fish, 2001). Außerdem wird eine Wiedererregung im gleichen Zyklus (reentry, kreisende Erregung) verhindert (Lukas und Antzelevitch, 1996). Um eine synchrone Kontraktion im Zuge der Erregungswelle zu ermöglichen, sind die Kardiomyozyten über Gap Junctions gekoppelt. Selbst bei der zellautonomen Ausbildung von Aktionspotentialen unterschiedlicher Dauer wird durch den elektrotonischen Fluß somit eine Angleichung benachbarter Zellen ermöglicht (Peters, 1996; Jalife et al., 1999). Die Dichte dieser Ionenkanal-unabhängigen Ströme bestimmt auch die Gesamtgeschwindigkeit der Ausbreitung einer Erregungswelle über das Gewebe (Shaw und Rudy, 1997). Hierbei spielen sowohl die Größe und Verteilung der Gap Junction-Plaques als auch die individuellen Eigenschaften der Kanäle, aus denen sich die Plaques aufbauen, eine entscheidende Rolle (Peters und Wit, 1998; Valiunas et al., 2002). Aufgrund der länglichen Form ventrikulärer Kardiomyozyten erfolgt die Erregungsausbreitung im Herzen anisotrop (Sano et al., 1959; Saffitz et al., 1995). Dies begründet sich auf dem kleineren elektrischen Widerstand des Zytoplasmas gegenüber Gap Junction Kanälen, so dass sich eine Erregungswelle bevorzugt in longitudinaler Richtung ausbreitet (Peters und Wit, 1998). Auch durch die makroskopische Form von Gewebestrukturen wird die Erregungsweiterleitung moduliert (Rohr et al., 1997). In humanen Herzerkrankungen ist eine Veränderung der Verteilung und/oder Menge an ausgeprägten Gap Junction Proteinen beschrieben (Übersicht in: Severs et al., 2004). So wurde sowohl bei Kardiomyopathien, in Myokarditis als auch in ischämischen Herzen eine Abnahme der Menge an Cx43 Protein festgestellt (Dupont et al., 2001; Kostin et al., 2003). Zudem sieht man in der Myokardschicht um Infarkt Narben sowie in hypertrophiertem Herzgewebe eine bevorzugt laterale Expression von Cx43, statt der typischen Ausprägung in Glanzstreifen (Matsushita et al., 1999; Emdad et al., 2001). Dies wird als eine Prädisposition für Arrhythmieentstehung durch Veränderung der anisotropen Reizweiterleitung angesehen (Peters et al., 1997).

1.II.2.3.C Herzerkrankungen durch Störungen der Repolarisation

Tödlichen Arrhythmien des Herzens (Übersicht in: Roberts und Brugada, 2000) können unter anderem durch Heterogenität der Repolarisation und daraus resultierender kreisender Erregung entstehen. Das Brugada-Syndrom (Brugada und Brugada, 1992) zeichnet sich im EKG durch Hebungen des ST-Segments aus (Brugada et al., 1998) und führt ein hohes Risiko des plötzlichen Herztodes (Antzelevitch et al., 1999) mit sich. Chen et al. (1998) zeigten eine Korrelation mit Mutationen in der α -Untereinheit des kardialen Natriumkanals (SCN5A),

welche entweder zum Verlust der Expression (Baroudi et al., 2001) oder zu einer schnelleren Inaktivierung dieses Natriumkanals führen (Wan et al., 1999). Durch den somit geringeren Einstrom von Natrium-Ionen zu Beginn des Aktionspotentials wird die Repolarisationszeit verkürzt. Dies tritt insbesondere in epikardialen Zellen auf, welche eine hohe Konzentration an frühzeitig aktiven Kaliumkanälen besitzen. Durch die entstehende Heterogenität der Repolarisation innerhalb der Ventrikelwand werden durch vorzeitige Wiedererregung kreisende Erregungen möglich. Hierbei kann es schließlich zu ventrikulärer Tachykardie (erhöhte Herzschlagfrequenz) und tödlicher ventrikulärer Fibrillation (Herzflimmern, unkoordinierte Herzmuskelkontraktionen) kommen. Das LongQT-Syndrom zeichnet sich im EKG, wie aus dem Namen erkennbar, durch eine Verlängerung des QT-Intervalls und somit der Repolarisation aus. Auch hier treten veränderte Formen der T-Welle auf sowie eine atypische Tachykardie, die Torsade de Pointes (TdP) (Priori et al., 1991). Unterschiedliche Typen des LongQT-Syndroms konnten mit Mutationen in verschiedenen Kalium-Ionenkanälen sowie in der SCN5A-Natriumkanal-Untereinheit in Zusammenhang gebracht werden (Übersicht in: Oto und Breithardt, Kapitel 5, 2001). Diese führen jeweils zu einer Reduktion des Netto-Repolarisationsstroms, entweder durch verminderten Kalium-Ionenausstrom oder verstärkten Natrium-Ioneneinstrom (Shimizu und Antzelevitch, 1997). Durch die schwache Expression des verzögert reagierenden Kaliumkanals in myokardialen Zellen der mittleren Ventrikelwand (M-Zellen) im Vergleich zu endo- oder epikardialen Kardiomyozyten (Akar et al., 2002) entsteht eine Heterogenität der Wiedererregbarkeit. Zusammen mit der verlängerten Repolarisation kann dies zu speziellen kreisenden Erregungen (TdP) führen. Ein Zusammenhang zwischen LongQT-Syndrom und plötzlichem Kindstod wird diskutiert (Schwartz et al., 1998; 2001).

1.II.3. Expression von Cx43 während der Embryonalentwicklung

Das Expressionsmuster der *cx43* mRNA ist während der Embryogenese zeitlich und räumlich sehr distinkt reguliert (Ruangvoravat und Lo, 1992; Sainio et al., 1992; Dahl et al., 1995). Cx43-Transkript kann in hohem Maß in Zygote und Blastozyste nachgewiesen werden (DeSousa et al., 1993; Reuss et al., 1997). Die Expression von *cx43* mRNA ist im Blastozystenstadium nach der Implantation in der Dezipua auf embryonale Zellen beschränkt (Dahl et al., 1996b). Nach der Gastrulation kann *cx43* mRNA und Cx43 Protein in Geweben nachgewiesen werden, die sich aus dem Ektoderm, Mesoderm oder Endoderm ableiten. Zudem wird Cx43 häufig in Organen gefunden, die induktive Wechselwirkungen durchlaufen (Ruangvoravat und Lo, 1992; Dahl et al., 1995). Auch in Geweben, die sich von Zellen der Neuralleiste ableiten, läßt sich die Expression von Cx43 Protein nachweisen (Waldo et al., 1999).

1.II.3.1 Embryonale Expression von Cx43 in der Maus-Epidermis

Die Epidermis ist ein Derivat des Ektoderms. Das zunächst einschichtige Epithel differenziert zwischen Tag 13 und 17 der Maus-Embryonalentwicklung in ein mehrlagiges Epithel, welches von einer schützenden Peridermschicht umgeben ist. Zwischen Tag 17 und 19 bildet sich ein stratifiziertes Epithel aus, das alle Strukturen der adulten Epidermis enthält (DuBrul, 1972). In diesem Zeitraum schließt sich auch die epidermale Barriere (Hardman et al., 1998). Die Lokalisation des Cx43 Proteins verändert sich während der Embryonalentwicklung der Epidermis (Choudhry et al., 1997). Während Cx43 und Cx26 zwischen Tag 12 und 15 in den suprabasalen und der Basalschicht zusammen ausgeprägt werden, findet sich Cx26 Protein ab Tag 17 nur noch im *Stratum granulosum*. Gleichzeitig wird die Expression von Cx43 Protein auf das *Stratum basale* und das *Stratum spinosum* reduziert. Es wird vermutet, dass diese von der Kalzium-Konzentration abhängige Veränderung der Connexinausprägung einhergeht mit einem selektiven Wechsel der Gap Junction Permeabilität im Zuge der terminalen Differenzierung von Keratinozyten (Brissette et al., 1994).

1.II.3.2 Embryonale Expression von Cx43 im Maus-Herzen

Cx43 wird ab Tag 9,5 im Ventrikel und ab Tag 12,5 in den Atrien nachgewiesen und eine starke Zunahme der Expression während der weiteren Herzentwicklung ist beschrieben (Delorme et al., 1997; Duncan und Fletcher, 2002). Cx43 exprimierende Neuralleistenzellen sind an der Morphogenese der Trennung des zunächst einheitlichen Ausflußtraktes des Herzens (*Conus cordis*, *Truncus arteriosus*) in Aorta und *Truncus pulmonalis* beteiligt (Huang et al., 1998). Auch eine Beteiligung an der Ausbildung von atrialen (Abb. 1.11) und ventrikulären Septen wird auf Grund von Connexin defekten Mäusen angenommen (Lo, 2000; Kirchhoff et al., 2000).

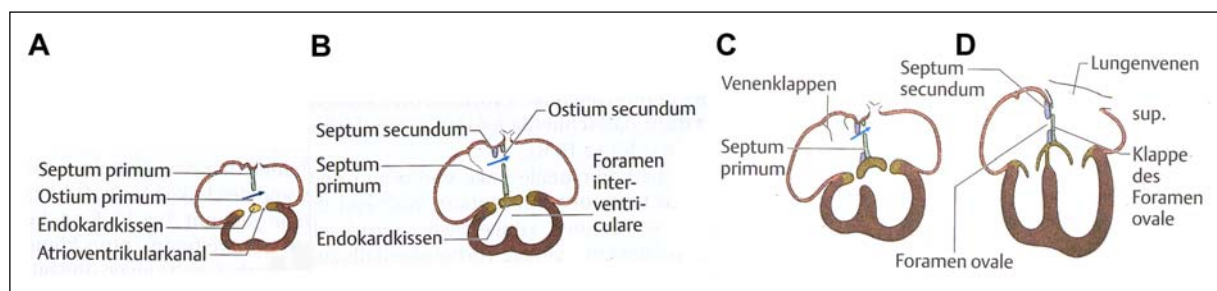


Abb. 1.11: Entwicklung der Septen im Vorhof des menschlichen Herzes

A: Das *Septum primum* wächst vom Dach des ungeteilten Vorhofs auf das Endokardkissen im Atrioventrikularkanal (AVK) herab. Der verbleibende atriale Durchgang heißt *Foramen* oder *Ostium primum*. B: Das *Septum primum* verschmilzt mit dem Endokardkissen im AVK, reißt dabei aber zuvor oben ein. Dieser atriale Durchgang heißt *Foramen* oder *Ostium secundum*. C: Das *Septum secundum* wächst vor, lässt jedoch bis zur Geburt das *Foramen ovale* als Durchgang zwischen beiden Atrien frei. D: Durch den größeren Druck nach Einsetzen des Lungenkreislaufes verschließt sich das *Foramen ovale* nach der Geburt und beide Vorhöfe sind voneinander getrennt (modifiziert nach Sadler, 2003)

1.II.4 Cx43 und humane Erkrankungen

Kürzlich konnten Punktmutationen innerhalb der kodierenden Region des humanen *cx43* Gens mit okulodentodigitaler Dysplasie (ODDD, Paznekas et al., 2003) in Verbindung gebracht werden. Dieses Syndrom zeichnet sich insbesondere durch Mikrophthalmie (abnormale Kleinheit der Augäpfel), Pseudohypertelorismus (überweiter Abstand der Augen), Zahnschmelzdysplasie, Hypotrichose (Haarmangel) sowie Missbildungen der Mittelhand- bzw. Mittelfußknochen aus. Letztere führen häufig zu Kamptodaktylie (hakenförmige Beugekontraktur des 5., seltener auch 4. und 3. Fingers im Mittelgelenk bei gleichzeitiger Überstreckung im Grundgelenk) oder Syndaktylie (Verwachsung von Fingern oder Zehen). In einigen Fällen wurden zudem Hörverlust, Katarakt- oder Glaukom-Bildung, Hyperkeratose der Handinnenflächen und Fußsohlen sowie Herzfehler aufgedeckt. So zeigte ein Patient mit der Cx43G21R Mutation einen Defekt des Vorhofseptums. Schon bevor ODDD Mutationen dem *cx43* Gens zugeordnet werden konnten, wurde eine Verbindung zwischen diesem Syndrom und Septenfehlbildungen im Herz dokumentiert (Schneider et al., 1977; Judisch et al., 1979). ODDD-Mutationen wurden bis jetzt in allen Domänen des Cx43 Proteins mit Ausnahme der carboxyterminalen Region dokumentiert. Des Weiteren wurden Punktmutationen, die zum Verlust von phosphorylierbaren Aminosäureresten des Cx43 Proteins führen, beim Menschen mit dem Auftreten komplexer Herz-Mißbildungen in Verbindung gebracht (Britz-Cunningham et al., 1995). Hierbei handelt es sich um viszeralatriale Heterotaxien, wobei die schweren Herz-Mißbildungen mit veränderter Organlage einhergehen. Dasgupta et al. (2001) zeigten zudem einen Zusammenhang zwischen *cx43* Mutationen und einer Hypoplasie (Unterentwicklung) des linken Ventrikels. Die auftretenden Mutationen, vermutlich auf eine Rekombination mit dem humanen *cx43* Pseudogen rückführbar, führen zu dem Austausch von zwei Arginin- gegen jeweils Glutaminreste in der carboxyterminalen Domäne. Es wird vermutet, dass diese Mutationen die funktionale Phosphorylierung und somit Regulation von Cx43 während der Herzentwicklung behindern.

1.III. Erzeugung transgener Mäuse

Zur *in vivo* Analyse von Säugetiergenen werden häufig Mausmutanten genutzt. Die genaue Funktionsanalyse eines Gens ist an transgenen Tieren möglich, die mittels Injektion gezielt veränderter embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) in Blastozyten erzeugt werden (Übersicht in: Nagy et al., 2003). ES-Zelllinien werden aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981) und behalten unter entsprechender Behandlung ihre Totipotenz (Williams et al., 1988; Hilton et al., 1991) *in vitro* bei. Transgene Mäuse lassen sich auch nach längere Kultur von ES-Zellen erzeugen (Fedorov et al., 1997).

1.III.1 Einfacher Genersatz

Bei dieser Methode erfolgt zunächst *in vitro* der gezielte Austausch eines Gens ("Gene Targeting") durch homologe Rekombination mit einem Ersetzungs- oder Insertionsvektor in ES-Zellen (Hooper et al., 1987; Capecchi, 1989; Deng et al., 1993). Durch ein doppeltes Überkreuzen („Crossing over“) der flankierenden Bereiche mit den endogenen Homologiebereichen kann die Zielgensequenz durch die transgenen Sequenzen chromosomal ersetzt werden. Auf Grund der geringen Rekombinationsfrequenz (ein Ereignis in 1-10 Millionen Fällen) werden homolog rekombinierte ES-Zellen durch Selektion auf eingebrachte Selektionsgene angereichert. Die Effizienz der homologen Rekombination kann durch die Verwendung isogener Homologiesequenzen, d.h. DNS-Sequenzen aus demselben Mausstamm, gesteigert werden (te Riele et al., 1992). In der ursprünglichen Anwendung dieser Methode wird die kodierende Region eines Gens durch das Einbringen des Selektionsgenes soweit zerstört, dass es zu keiner funktionellen Genexpression mehr kommt ("Knock out“).

1.III.2 Doppelter Genersatz

Mit Hilfe der Methode des doppelten Genersatzes ("double replacement“) werden in zwei homologen Rekombinationsschritten (Abb. 1.8) gezielt genomische Sequenzen ausgetauscht ("Knock-in“), ohne dass Resistenzgene im Genom der transgenen Mäuse zurückbleiben (Abb. 1.12; Reid et al., 1990; Askew et al., 1993). So kann eine genomische Sequenz mit vergleichsweise geringem Aufwand durch verschiedene DNS-Konstrukte ausgetauscht werden. Anwendung findet der doppelte Genersatz insbesondere bei der Analyse verwandter Gene oder der Untersuchung humaner Gene und Mutationen in Mausmutanten (Hanks et al., 1995). Die Grundlage dieser Methode besteht darin, dass in der ersten homologen Rekombination ein Selektionsgen eingebracht wird, auf dessen Anwesenheit selektioniert werden kann. In der zweiten homologen Rekombination im gleichen Genlocus erfolgt der Austausch gegen eine andere DNS-Sequenz und es wird auf Abwesenheit desselben Selektionsgens selektioniert. Eine besonders elegante Abwandlung der Methode wurde von Reid et al. (1990) beschrieben und von Stacey et al. (1994) erstmals durchgeführt. Sie beruht auf der Verwendung einer Zelllinie, die defizient für das Enzym Hypoxanthin-Guanin

Phosphoribosyltransferase (HPRT) ist (Thompson et al., 1989; Magin et al., 1992). Anders als bei der Maus ist der Verlust dieses Enzyms des Purin- Wiederverwertungsweges beim Menschen mit einer schweren Erkrankung, dem Lesch-Nyham Syndrom, verbunden (Stout und Caskey, 1988).

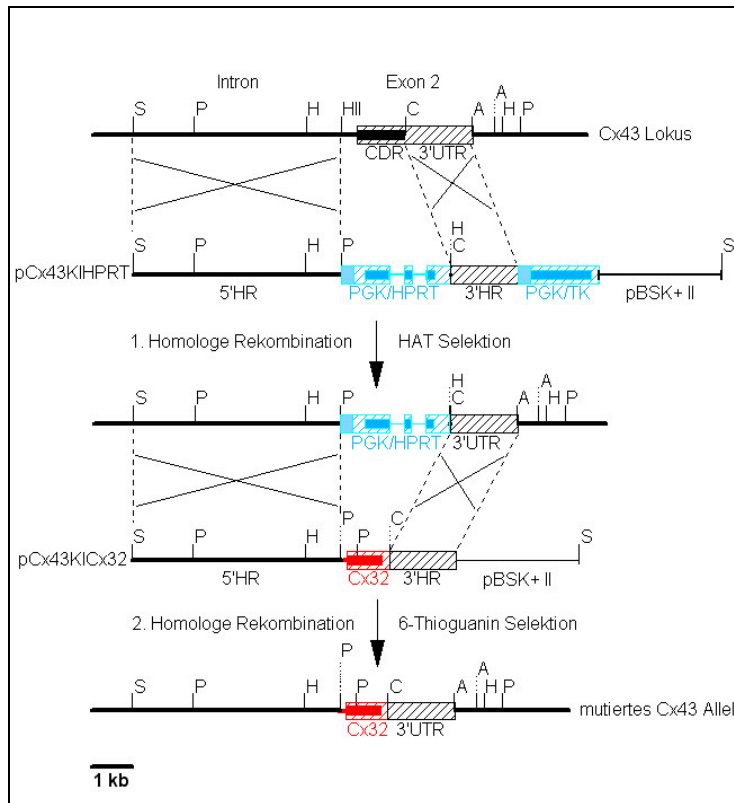


Abb. 1.12: Doppelter Genersatz

Mittels *hpert*-Minigen als Selektionsgen des ersten Austauschschrittes, können homolog rekombinierte ES-Zellklone durch Hypoxanthin-, Aminopterin- und Thymin- (HAT) Selektion anreichert werden.

Mittels 6-Thioguanin werden nach dem zweiten Austauschschritt nicht homolog rekombinierte ES-Zellen, die *hpert* weiterhin exprimieren, selektiv durch Bildung eines Nukleotidanalogons abgetötet.

S: *Sac* I; P: *Pst* I; H: *Hind* III; HII: *Hinc* II; C: *Cla* I; A: *Ava* I, CDR: kodierende Region; UTR: untranslatierte Region; HR: Homologie-Region, PGK: Phosphoglycerat-Promotor; TK: Thymidinkinase; HAT: Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin; HPRT: Hypoxanthin-Guanin

Phosphoribosyltransferase
pBSK: Klonierungsplasmid
Bluescript SK(+II); Cx: Connexin
(modifiziert nach Plum et al., 2000)

1.IV Connexin43 Mausmutanten

Während der letzten zehn Jahre wurden verschiedene Mausmodelle beschrieben, die verschiedene Veränderungen des *cx43* Gens in sich tragen (Übersicht in: Gros et al., 2004). 1995 wurde zunächst durch Reaume et al. eine Maus mit genereller Deletion der kodierenden Region des *cx43* Gens beschrieben. Homozygote Tiere sterben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt auf Grund einer Zyanose. Morphologisch konnte dies auf eine Stenose durch verstärkte Bildung von *Tarbeculae carneae* im Bereich des Ausflusstraktes des rechten Herzventrikles rückgeführt werden. Analysen der embryonalen Herzentwicklung zeigten, dass es in homozygoten Tieren zu einer veränderten Ausbildung der Herzscheife kommt. Hierdurch verbleibt der zukünftige rechte Ventrikel erhöht mit dem Herzausflusstrakt verbunden. In diesem Bereich entstehen am Tag 13,5 die zusätzlichen Trabeculae, welche letztendlich bei Trennung vom mütterlichen Kreislauf zur tödlichen Zyanose führen, da der Blutfluß zur Lunge hierdurch versperrt wird (Ya et al., 1998). Vermutlich beruhen diese morphogenetischen Anomalien auf Grund der veränderten *cx43*-Gendosis (Ewart et al., 1997) auf einer veränderten Migration von Cx43 exprimierenden Neuralleistenzellen (Huang et al., 1998). Diese sind an der Modulation von morphogenetischen Endokardprozessen beteiligt

(Waldo et al., 1999), so der Trennung des zunächst gemeinsamen Herzausflußtraktes in Aorta und Truncus pulmonalis. Analysen von *cx43* defekten Mäusen zeigten zudem Störungen der Septenbildung in Atrium und Ventrikel (Lo et al., 2000; Kirchhoff et al., 2000), verzögerte Ossifikation von Rippen, Wirbelsäule und Gesichtsknochen (Lecanda et al., 2000), Kataraktbildung der Augenlinse (Gao und Spray, 1998) sowie Störungen der Spermatogenese (Roscoe et al., 2001) und Hämatopoese (Montecino-Rodriguez et al., 2000). Ein heterozygoter Verlust des *cx43* Gens wurde von einer Arbeitsgruppe mit einer 30% Verlangsamung der ventrikulären Erregungseiterleitung (Guerrero et al., 1997) korreliert, während eine andere Gruppe keine Unterschiede zu Wildtyp Mäusen feststellte (Morley et al., 1999). Die pränatale Analyse der Herzen homozygoter Mäuse zeigte eine reduzierte ventrikuläre Reizweiterleitung, die mit einer gleichzeitig auftretenden Reduktion des Cx40 Proteins im reizweiterleitenden System des Herzens korreliert werden konnte (Vaidya et al., 2001). Die Kardiomyozyten-spezifische, konditionale Deletion des *cx43* Gens führt ebenfalls zu verlangsamer Erregungsweiterleitung und plötzlichem Tod auf Grund von Arrhythmien des Herzens innerhalb der ersten zwei Monate nach der Geburt (Gutstein et al., 2001). Die konditionelle, induzierbare Ausschaltung des *cx43* Gens in adulten Tiere führt innerhalb von vier Wochen zum Tod der Tiere. Auch hier zeigen die Tiere Reduktion der ventrikulären Erregungsweiterleitung und arrhythmogene Tachykardie (Eckhardt et al., 2003). Der Ersatz der kodierenden Region des *cx43* Gens gegen die des *cx32* oder *cx40* Gens konnte den letalen Phenotyp von Mäusen mit genereller *cx43* Deletion aufheben (Plum et al., 2000). Cx43Ki32 homozygote Tiere zeigten nur milde Trabeculae-Bildung im Bereich des rechten Ausflußtraktes, Cx43Ki40 homozygote Mäuse zeigten keine morphologischen Veränderungen des Herzens. Beide Mausmutanten zeigten spontane ventrikuläre Arrhythmien. Homozygote Tiere waren jeweils durch eine starke Reduktion der Keimzellen-Anzahl unfruchtbar.

1.V Ziel der Arbeit

Die carboxyterminale Domäne ist wesentlich an der Regulation von Cx43 Gap Junction Kanälen beteiligt. Sie beeinflusst den Öffnungszustand von Cx43 Gap Junction Kanälen, vermittelt direkte intra- und intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkung und bestimmt die Stabilität des Cx43 Proteins.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Mausmutante erzeugt werden, die anstelle der endogenen eine um die letzten 125 carboxyterminalen Aminosäurereste verkürzte Cx43 Isoform (Cx43K258stop) in allen Zelltypen exprimiert, welche eine Expression des *cx43* Gens zeigen.

Der Austausch der kodierenden Region des endogenen *cx43* Gens gegen die gewählte *cx43K258stop* Mutation sollte mittels der Methode des genetischen Doppellersatzes in HM1 embryonalen Stammzellen der Maus erfolgen. Da bei Anwendung dieser Methode keine heterologen Gensequenzen im Zielgen-Locus verbleiben, sollte hierdurch eine gegenüber *cx43* unveränderte Genexpression des *cx43K258stop* Allels gewährleistet werden. Hierzu sollte zunächst ein Zielgenvektor für die Transfektion von im *cx43* Locus *hprt*-markierten HM1 embryonalen Stammzellen der Maus (Plum et al., 2000) hergestellt, überprüft und transfiziert werden. Die nach genetischem Doppellersatz erhaltenen, homolog rekombinierten embryonalen Stammzellen sollten mittels Blastozysteninjektion zur Erzeugung von chimären Cx43K258stop Tieren und der anschließenden Erzeugung einer transgenen Cx43K258stop Mauslinie verwendet werden. Diese Tiere sollten hinsichtlich der Auswirkung der carboxyterminalen Verkürzung des Cx43 Proteins *in vivo* untersucht werden. Hierbei sollte besonderes Gewicht auf die Analyse der Morphologie und Funktion des Herzens homozygoter Tiere gelegt werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob der Verlust der carboxyterminalen Region des Cx43 Proteins zu demselben Phänotyp wie die generelle Deletion dieses Gens führt. Des Weiteren sollte der Einfluss der Cx43K258stop Mutation in anderen Geweben analysiert werden, so beispielsweise auf die Follikelreifung in den Ovarien homozygoter Weibchen.

Gleichzeitig sollte mittels der Einbringung der Cx43K258stop Mutation in HeLa-Zellen ein leicht zugängliches Expressionssystem geschaffen werden, um zellbiologische und biochemische Eigenschaften des Cx43K258stop Proteins näher bestimmen zu können. Mit Hilfe dieses Systems sollte analysiert werden, ob der Verlust der carboxyterminalen Domäne einen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran sowie die Ausbildung und Funktionalität von homo- und heterotypischen Gap Junction Kanälen hat. Zudem sollte festgestellt werden, ob die Stabilität des Cx43K258stop Proteins gegenüber Cx43 verändert ist.

2. Material

2.I Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen in p.A.-Qualität bezogen: Biochrom AG, Difco, Fluka, GibcoBRL, ICN, Merck, PAA, Riedel-de Haën, Roche, Roth, Serva und Sigma. Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham-Buchler erworben. Die verwendeten Enzyme und Nukleotide stammen von Amersham Pharmacia Biotech, New England BioLabs, Promega oder Roche.

2.II Medien, Stammlösungen und Puffer

Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, in sterilem, zweifach destilliertem Wasser (A. bidest) angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

2.II.1 Allgemeine Lösungen

PBS⁻ (pH 7,2)	133 mM	Natriumchlorid
	2,7 mM	Kaliumchlorid
	8,1 mM	Natriumhydrogenphosphat
	1,5 mM	Kaliumhydrogenphosphat
SDS-Stammlösung (10%)	1g Natriumdodecylsulfat in 10 ml A. bidest	

2.II.2 Lösungen für die Analyse von Nukleinsäuren

2.II.2.1 Präparation von Plasmid-DNS

STET-Puffer (pH 8,0)	50,0 mM	Tris
	50,0 mM	EDTA
	5% (v/v)	Triton X-100
	8% (v/v)	Sucrose
LysozymbLösung	10 mg Lysozym in 1 ml TE-Puffer; frisch ansetzen	
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM	Tris-HCl
	1 mM	EDTA
RNase2000-Stammlösung	100 mg RNase A in 49 ml TE-Puffer lösen; 1 ml RNase T1 zugeben, 15 min kochen. Aliquots bei -20°C lagern	

2.II.2.2 Präparation genomischer DNS aus ES-Zellen und Mausgewebe

Proteinase K-Stammlösung	20 mg Proteinase K in 1 ml TE-Puffer lösen Aliquots bei -20°C lagern	
ES-Lysispuffer (pH 8,0)	50 mM	NaCl
	20 mM	Tris-HCl [pH 8,5]
	100 mM	EDTA
	0,5% (w/v)	SDS
	2 mM	CaCl ₂
	Vor Gebrauch sterilfiltrieren, Zugabe von 50 µl Proteinase K- und 100 µl RNase2000-Stammlösung pro ml	
Laird-Lysispuffer (pH 8,5)	100 mM	Tris-HCl [pH 8,5]
	200 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	0,2% (v/v)	SDS
	100 µg/ ml	Proteinase K (vor Gebrauch zusetzen)
Lysis-Puffer (pH 8,0)	0,2 M	Tris
	0,1 M	EDTA
	1 %	SDS
	200 µg/ ml	Proteinase K (vor Gebrauch zusetzen)

2.II.2.3 Präparation von Gesamt-RNS

DMPC-Wasser	200 µl Dimethyl-pyrrolcarbonat auf 100 ml Wasser; üN bei RT rühren; führt zur Inaktivierung von RNasen durch Methylierung; 1 h autoklavieren; hierbei zerfällt DMPC zu H ₂ O und CO ₂	
RNS-Natriumacetat (pH 5,2)	3 M NaAc; mit DMPC-Wasser herstellen	

2.II.2.4 Gelelektrophorese

TBE-Puffer (20 x)	1,8 M	Tris
	1,8 M	Borsäure
	50 mM	EDTA
DNS-Probenpuffer (6 x)	0,25% (w/v)	Bromphenolblau
	0,25% (w/v)	Xylencyanol
	30,0% (v/v)	Glycerol
Ethidiumbromid- Stammlösung	1% (w/v) Ethidiumbromid bei RT lichtgeschützt lagern	
MOPS-Puffer (10 x) (pH 7,0)	0,2 M	Morpholinopropansulfonsäure
	50 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA
	pH-Wert einstellen; autoklavieren; lichtgeschützt lagern	

RNS-Probenpuffer (10 x)	1 mM 0,4% (w/v) 0,4% 50% Lagerung bei -20°C	EDTA Bromphenolblau Xylencyanol Glycerol
RNS-Ethidiumbromid	40% Ethidiumbromid in DMPC-Wasser bei -20°C lichtgeschützt lagern	

2.II.2.5 Übertragung von Nukleinsäuren auf Membranen

DNS-Denaturierungslösung	0,5 M 1,5 M	NaOH NaCl
DNS-Depurinierungslösung	0,25 M	HCl
DNS-Transferlösung	0,25 M 1,5 M	NaOH NaCl
SSC (20 x) (pH 7,5)	3 M 0,3 M	NaCl Trinatriumcitrat pH-Wert einstellen

2.II.2.6 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Denhardt's Reagenz (50 x)	1% (w/v) 1% (w/v) 1%	Ficoll Polyvinylpyrrolidon BSA, Fraktion V
Formamid <small>deionisiert</small>	100 ml Formamid mit 5 g Ionenaustauscher-Harz (BIO-RAD) 30 min rühren; durch Faltenfilter filtrieren; bei -20°C lagern	
(Prä)Hybridisierungslösung	50% 5 x 5 x 0,5 x	Formamid SSC Denhardt's Reagenz SDS sterilfiltrieren; bei -20°C lagern; vor Anwendung auf 42°C erwärmen und 50 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNS (sowie denaturierte, markierte Sonde) hinzugeben.

2.II.2.7 Aufreinigung markierter DNS-Sonden

Sephadex G-50-Lösung	Sephadex G-50 (Pharmacia) mit TE-Puffer versehen und ünquellen lassen, autoklavieren, bei 4°C aufbewahren
Silikonisierte Glaswolle	Silikonisierer (Roth) 1:60 in A. bidest verdünnen, Glaswolle eintauchen, schwenken, 1 h bei 120°C autoklavieren

2.II.2.8 Waschlösungen nach Nukleinsäure-Hybridisierungen

Für stringentes Waschen der Filter wurden aus SSC und SDS-Stammlösungen entsprechend verdünnte Waschlösungen hergestellt. Die vollständige Entfernung von hybridisierter Sonde erfolgt mit 1 mM Tris, 0,1% SDS, pH 7,5.

2.II.3 Lösungen für Bakterienkultur**2.II.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien**

YT⁺⁺ - Medium (pH 7,5)

0,8% (w/v)	Trypton
0,5% (w/v)	Hefe-Extrakt
0,5% (w/v)	NaCl

Medium autoklavieren, auf RT abkühlen

20 mM	MgSO ₄ (sterilfiltriert)
10 mM	KCl (sterilfiltriert)

Transformationspuffer I (pH 5,8)

30 mM	KAc
50 mM	MgCl ₂ * 2H ₂ O
100 mM	RbCl
10 mM	CaCl ₂ * 2H ₂ O

sterilfiltrieren; Lagerung bei 4°C

Transformationspuffer II (pH 7,0)

10 mM	MOPS
75 mM	CaCl ₂ * 2H ₂ O
10 mM	RbCl
15%	Glycerol

sterilfiltrieren; Lagerung bei 4°C

2.II.3.2 Transformation

Ampicillin-Stammlösung

500 mg Ampicillin in 5 ml A. bidest lösen (100 mg/ ml), mit NaOH neutralisieren, bei -20°C lagern; für Verwendung in Selektionsmedien 1:1000 verdünnen

LB-Medium (pH 7,4)

1% (w/v)	NaCl
1% (w/v)	Hefe-Extrakt
0,5% (w/v)	Trypton

autoklavieren

LB-Nährböden (pH 7,4)

LB-Medium mit 1,5% (w/v) Dunkel-Agar;
20 min autoklavieren; ggf. Zugabe von Antibiotika bei 55°C;
Nährböden in 10 cm Kulturschalen gießen und erstarren lassen;
Lagerung bei 4°C

2.II.4 Lösungen für die Kultur von eukaryotischen Zellen

2.II.4.1 Medien und Stammlösungen für die Kultivierung von embryonalen Stammzellen der Maus

Für ES-Zellkultur kommerziell erworbene Lösungen, Medien und destilliertes Wasser waren Zellkultur-getestet. Anzusetzende Lösungen wurden autoklaviert und/oder sterilfiltriert.

Einfrier-Medium (2 x)	17,5 ml 5 ml 2,5 ml Lagerung bei -20°C	Normalmedium DMSO Fötales Kälberserum
Gelatine-Stammlösung (1%)	10 g Gelatine in 1000 ml A.bidest lösen, zweimal für 1 h autoklavieren; bei 4°C lagern; für den Zellkulturgebrauch: Herstellung einer 0,1% Lösung in sterilem, destilliertem ES-Kultur Wasser.	
β-Mercaptoethanol (0,1 mM)	14,1 ml 0,1 ml sterilfiltrieren; Lagerung bei -20°C	steriles PBS ⁻ β-Mercaptoethanol (Sigma)
Normalmedium (10% Serum)	500 ml 5,6 ml 5,6 ml 28 ml 28 ml 0,57 ml 0,57 ml bei 4°C lagern, Zugabe von 5,6 ml	Glasgow MEM Natriumpyruvat [100 mM] nicht-essentielle Aminosäuren [100 x] sterilfiltriertes Fötales Rinderserum sterilfiltriertes Neugeborenen Kälberserum β-Mercaptoethanol [0,1 mM] humanes LIF [1000 x] Penicillin-Streptomycin [100 x]
Penicillin/Streptomycin-Stammlösung [100 x]	0,6% (w/v) 1% (w/v) in Puck'scher Saline, sterilfiltrieren; bei 4°C lagern	Penicillin [10000 Einheiten/ml] Streptomycinsulfat [10000 Einheiten/ml]
Puck'sche Saline (pH 8,2)	8,0 g 0,4 g 1,0 g 0,35 g mit A. bidest auf 1 l auffüllen, pH-Wert einstellen, sterilfiltrieren, bei -20°C lagern	NaCl KCl D-Glucose Natriumhydrogencarbonat
Selektionsmedium	Zugabe von 1/1000 Vol. 6-Thioguanin-Stammlösung zu 1 Vol. Normalmedium	
6-Thioguanin-Stammlösung (1000 x) (pH 7,0)	50 mg 1 ml 25 ml pH-Wert einstellen, Lagerung bei -20°C	2-Amino-6-mercaptapurin NaOH [1 M] A. bidest
Trypsin-Lösung	400 ml 100 ml 5 ml 5 ml	autoklaviertes PBS ⁻ autoklavierte EDTA-Lösung [1,85 g auf 1 l] zellkulturgetestetes Trypsin [10 x] zellkulturgetestetes Hühnerserum

2.II.4.2 Lösungen für Elektroporation und Karyotyp-Analyse

HBS⁻ [10 x]	16 g	NaCl
	0,74 g	KCl
	0,252 g	Natriumhydrogenphosphat
	2 g	D-Glucose
	10 g	Hepes
	In 180 ml A. bidest lösen, pH 7,2 einstellen, mit A.bidest auf 200 ml auffüllen, sterilfiltrieren. Herstellung von 1 x HBS durch Verdünnung in sterilem Zellkulturwasser	
Giemsa-Lösung	0,4% (w/v) in gepufferter Methanol-Lösung, pH 6,9 (Sigma, Aldrich, modifiziert)	

2.II.4.3 Medien und Stammlösungen für die Kultivierung von HeLa-Zellen

Puromycin-Stock	0,05% Puromycin (Sigma) in Zellkultur-Wasser, sterilfiltrieren, bei -20°C lagern	
D10-Medium	500 ml	DMEM (Sigma)
	55 ml	HeLa-FCS (Biochrom)
	5 ml	100x Pen/Strep (Sigma)
	Lagerung bei 4°C bis zu einem Monat	
Selektionsmedium	D10-Medium mit 1 µg/ml Puromycin Lagerung bei 4°C bis zu einem Monat	
HeLa-Trypsin	0,04%	Trypsin (Sigma)
	0,5 mM	EDTA-Natriumsalz (Serva)
	pH 7,5, sterilfiltrieren, bei 4°C (kurzzeitig) oder -20°C lagern	

2.II.5 Lösungen für die Isolierung und den Nachweis von Proteinen**2.II.5.1 Lösungen für die Isolierung von Proteinen aus kultivierten Zellen und Geweben**

Complete (25x)	1 Tablette Complete (Roche) in 2 ml A. bidest lösen, Lagerung bei -20°C	
SDS-Probenpuffer (pH 6,8)	62,5 mM	Tris-HCl
	3% (w/v)	SDS
	10% (v/v)	Glycerin
	pH-Wert einstellen	
Dispase-Lösung	2,4 Einheiten Dispase/ml PBS	
TBS-Puffer (pH 7,5)	10 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	pH-Wert einstellen	

Sepharose 4B-Gel	500 µl Sepharose 4B-Gel (Amersham) mit gleichem Volumen TBS-Puffer überschichten; bei 4°C etwa 6 Monate lagerbar	
Sepharose-ProteinA-Gel	150 mg ProteinA Sepharose CL-4B (Amersham) ad 500 µl mit TBS-Puffer, 2 h bei 4°C quellen lassen, nach Zentrifugation (5 min, 4.000 Upm, 4°C) Überstand abnehmen und mit gleichem Volumen TBS-Puffer überschichten; bei 4°C etwa 6 Monate lagerbar	
RIPA-Puffer (pH 7,2)	10 mM	Phosphatpuffer (Na ₂ HPO ₄ : NaH ₂ PO ₄ = 3:1)
	0,1%	SDS
	40 mM	Natriumfluorid
	2 mM	EDTA
	1%	Triton X-100
	pH-Wert einstellen, ad 100 ml, 1 h autoklavieren	
	0,1 %	Deoxycholat frisch zugeben
RIPA-Waschpuffer	10 mM	Phosphatpuffer (Na ₂ HPO ₄ : NaH ₂ PO ₄ = 4:1)
	1 M	NaCl
	40 mM	Natriumfluorid
	10 mM	EDTA
	0,2 %	Triton X-100
	ad 500 ml, mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, 1 h autoklavieren	

2.II.5.2 Lösungen für den Nachweis von Proteinen

Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris-Base (Sigma)
	0,4% (w/v)	SDS
	pH 6,8, sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C	
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-Base
	0,4% (w/v)	SDS
	pH 8,8, sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C	
APS-Stammlösung	1 g Ammoniumpersulfat in 10 ml A. bidest frisch ansetzen	
Laemmli-Probenpuffer	62,5 mM	Tris-HCl
	3% (w/v)	SDS
	10% (v/v)	Glycerin
	0,01% (w/v)	Bromphenolblau (Serva)
	5% (v/v)	2-Mercaptoethanol
	pH 6,8	

2. MATERIAL

SDS-Elektrophoresepuffer	0,25 M 1,92 M 1% (w/v) pH 8,3	Tris-Base Glycin SDS
Transfer-Puffer (5x)	50 mM 100 mM 800 mM pH 8,3	Tris-HCl (Sigma) Tris-Base Glycin
Transfer-Puffer (1x)	200 ml 200 ml ad 1l	Transfer-Puffer (5x) Methanol
Coomassie-Färbelösg.	0,25% (w/v) 10% (v/v) 50% (v/v)	Coomassie Brilliant Blue (ICN) Essigsäure Methanol durch Faltenfilter filtrieren, lichtgeschützt lagern, wieder verwendbar
Coomassie-Entfärber	10% (v/v) 30% (v/v)	Essigsäure Methanol
Immunoblot- Waschlösung	8,5 mM 1,7 mM 50 mM 0,1% (v/v)	Tris-HCl Tris-Base NaCl Tween 20 (Merck)
Immunoblot- Blockierungslösung	5 % (w/v) Magermilchpulver lösen in Immunoblot-Waschlösung frisch ansetzen	
Ponceau-Färbelösung	0,2% (w/v) 3% (w/v)	Ponceau S (ICN) Trichloressigsäure lichtgeschützt lagern, wieder verwendbar
Paraformaldehyd-Stammlösung	8 g Paraformaldehyd in 180 ml A. bidest bei 60° C lösen, Zugabe von NaOH bis zur Klärung. Nach Abkühlen auf RT Zugabe von 10 ml PBS ⁻ (10x), pH-Wert auf 7,2 einstellen, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C	
Natriumcarbonat-Lösung	2% Natriumcarbonat in A. bidest	
Immunfluoreszenz- Blockierungslösung	4% 0,1%	BSA Fraktion V Triton X-100 in PBS; frisch ansetzen
Zellkern-Färbelösung in Immunfluoreszenzen	0,05 % (w/v) Hoechst 33258 (Sigma) in PBS ⁻ , lichtgeschützte Lagerung bei -20°C	
BrdU-Injektionslösung für Proliferationsanalyse mittels Immunfluoreszenz	12 mg BrdU (Sigma) pro ml in 0,9% NaCl lösen frisch ansetzen	

Saurer Ethanol für Proliferationsanalyse mittels Immunofluoreszenz	90% 5% ad A. bidest	Ethanol absolut Eisessig
---	---------------------------	-----------------------------

2.II.6 Lösungen für Histologie, Elektronenmikroskopie und Überprüfung der Funktion der epidermalen Barriere

Formalin Fixierlösung	37% Formalinlösung wurde mit 1/10 Volumen PBS ⁻ (10x) und A. bidest immer frisch auf eine 4% oder 2% Formalinlösung in PBS verdünnt und pH Wert auf 7,2 eingestellt	
Hämatoxylin-Lösung	0,1% Mayers Hämalaunlösung (Merck) vor Gebrauch filtrieren, lichtgeschützt lagern; wieder verwendbar	
Eosin-Lösung	0,5% Eosin Y (Fluka) in A. bidest mit 1 Tropfen Essigsäure vor Gebrauch filtrieren, wieder verwendbar	
Phosphomolybdän-Lösung	0,2% Phosphomolybdänsäure in A. bidest, frisch ansetzen	
Picrosiriusred-Lösung	0,1% Sirius Red in 100% gesättigter Pikrinsäure filtrieren, frisch ansetzen	
Cacodylatpuffer	0,1M pH 7,3 einstellen	Cacodylat in A. bidest
Karnovsky-Lösung (Fixierlösung)	2% 4%	Glutaraldehyd Formaldehyd in Cacodylatpuffer; frisch ansetzen
Osmiumsäure (Fixierlösung)	4% 8% 16%	OsO ₄ (Plano) Glutaraldehyd Paraformaldehyd
Uranylazetat (Kontrastierlösung)	4%	([CH ₃ COO] ₂ UO ₂ x 3H ₂ O) in A. bidest lösen pH 4-5 einstellen
Epon-Stammlösung A	5 ml 8 ml	Epon (Fluka) DDSA
Epon-Stammlösung B	8 ml 7 ml	Epon NMA
Epon-Einbettungslösung	13 ml 15 ml 1,5-2%	Epon-Stammlösung A Epon-Stammlösung B Härter DMP-30
Epon-Propylenoxyd-Lösung	1 : 1 Lösung aus Epon-Einbettungslösung und Propylenoxyd	
Bleicitrat-Lösung (Kontrastierung)	250 mg Bleicitrat 1,6 ml ad 10 ml A. bidest	(Serva) in A.bidest, 1N NaOH

Toluidinblau-Lösung für Semi-Dünnschnitte	0,1% Toluidinblau (Merk) in 2,5% wässrigem Natriumkarbonat	
Toluidinblau-Lösung zur Überprüfung der epidermalen Barrier	0,0125% Toluidinblau (Merk) in PBS ⁻	
LacZ-Basislösung (pH 7,4)	100 mM	Phosphatpuffer (Na ₂ HPO ₄ : NaH ₂ PO ₄ = 3:1)
	2 mM	MgCl ₂
	5 mM	EGTA
LacZ-Waschlösung	0,01 % (v/v)	Na-Deoxycholat (ICN)
	0,2 % (v/v)	Nonidet P40 (Roche)
	in LacZ-Basislösung	
K₃[Fe(CN)₆]-Stammlösung	0,5 M Kaliumhexacyanoferrat (III), lichtgeschützt bei 4°C lagern	
K₄[Fe(CN)₆]-Stammlösung	0,5 M Kaliumhexacyanoferrat (II), lichtgeschützt bei 4°C lagern	
X-Gal Stammlösung	4 % (w/v) X-Gal (Roth) in N,N'-Dimethylformamid, lichtgeschützt bei -20°C lagern	
LacZ-Substratlösung	5 mM	K ₃ [Fe(CN) ₆]
	5 mM	K ₄ [Fe(CN) ₆]
	2,4 % (v/v)	X-Gal Stammlösung
	in LacZ-Waschlösung, sterilfiltrieren, lichtgeschützt bei 4°C aufbewahren, wieder verwendbar	

2.II.7 Lösungen für Blastozysteninjektion, Superovulation und Tierbetäubung

Physiologische Kochsalzlösung	0,9% NaCl in A.bidest autoklavieren
Transfermedium	33 mM HEPES in ES-Normalmedium bei -20°C lagerbar ca. 1 Woche lagerbar
Injektionsmedium	200 U/ml DNase in Transfermedium sterilfiltrieren, in Aliquots bei -20 °C bis zu 6 Monaten lagerbar
FSH-Lösung	50 U /ml Pregnant Mare Serum (Calbiochem #367222) in 0,9% NaCl lösen, sterilfiltrieren, Aliquots bei 20 °C ca. ein Jahr lagerbar
hCG-Stock	500U/Gefäß 5000U Predalon (Organon), ad 1 ml 0,9% NaCl, Aliquots à 100 µl lyophilisieren, Pulver bei -70°C ca. 1 Jahr haltbar
hCG-Lösung	50U/ml (Predalon) entsprechend einem Gefäß hCG-Stock ad 10 ml 0,9% NaCl, sterilfiltrieren; Aliquots bei -20°C maximal 1 Monat haltbar

Xylazin-Ketamin-Gemisch	0,5 ml	Xylazin (2 % Rompun; Bayer)
	0,25 ml	Ketamin (10 % Ketavet; Pharmacia & Upjohn)
	4,25 ml	0,9 % NaCl-Lösung
	frisch ansetzen	
	0,01 ml/g Körpergewicht wurden i.p. appliziert	

2.II.8 Fertige Lösungen

Acrylamid-Stammlösung Rotiphorese Gel 40 (Roth)	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Bleicitrat (Serva)	Transmissions-Elektronenmikroskopie
Demecolcine Solution (Sigma)	Colchizin für ES-Zell Karyotypanalyse
Dibutyl-cAMP (Sigma)	Aktivator der Proteinkinase A
DMSO (Sigma)	Einfrieren von kultivierten Zellen
Entellan (Merck)	Histologie
Ethidiumbromid, 1% (Merck)	DNS und RNS Gelelektrophorese
Forene (Abbott)	Isofluran-Inhalationsanästhetikum
Formaldehyd, 37% (Merck)	Histologie
Giensa Färbelösung (Sigma)	ES-Zell Karyotypanalyse
Histowachs (Leica)	Paraffin für Histologie
Immersol™ 518N (Zeiss)	Immersionsöl für Mikroskopie
Leitsilber (Plano)	Raster-Elektronenmikroskopie
Mineral Oil (Sigma)	PCR-Öl
Permafluor (Immunotec)	Immunofluoreszenz
Propylenoxid (Fluka)	Semi- und Ultradünnschnitte
Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce)	Abzieh-Lösung für Immunoblots
Roti-Block (10x) (Roth)	Immunoblot
TEMED (Sigma)	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tfx-20 (Promega)	Lipofektion von HeLa-Zellen
Tissue-Tec (Sakura)	Anfertigung von Kryoschnitten
TRIzol (Gibco BRL)	RNS Isolierung
Uranlyazetat (Agar Aids)	Semi- und Ultradünnschnitte

2.III Kommerzielle Reagenzien-Sätze

DNA-Isolierung aus Agarosegelen	QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen)
Plasmid-Isolierung	Jetstar Plasmid Midi Kit 50 (JETstar) QIAgen EndoFree MaxiKit (10) (Qiagen)
Radioaktive DNA-Markierung	Megaprime-DNA labelling system (Amersham)
Proteinmengen-Bestimmung	Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination (Sigma)
ECL-Reaktion	ECL+Plus (Amersham)
Verstärkung von radioaktiven Signalen in Autoradiographien	Amplify (Amersham)
Immunofluoreszenz mit Antikörpern aus Maus	M.O.M.TM Immunodetection Kit, Peroxidase (Vector Laboratories)
BrdU-Detektion mittels Immunofluoreszenz	5-Bromo-2' desoxy-uridine Labeling and Detection Kit I (Roche)
Epon-Einbettung für Semi- und Ultradünnschnitte	Epoxy – Embedding Kit (Fluka)

2.IV Oligonukleotide

Die lyophilisiert gelieferten Startermoleküle wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Volumen TE-Puffer gelöst. Die Lagerung erfolgt bei -20°C

2.IV.1 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung (Ergebnisse)
AAA6n	5' CAG ATG AAC TTA ATT CAG 3'	<i>cx43K258stop</i> (4.II.1.4 B)
Cx43 PCR RO1	5'GCC TAG CTA TCC CAA AAC ACC 3'	<i>cx43K258stop</i> (4.II.1.4 B)

2.IV.2 Oligonukleotide für PCR-Analytik

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung (Ergebnisse)
TV43tr-HO	5' GTC TTC TTC AAG GGC GTT AAG GAT CGC GTC 3'	ES-Zell-Analyse (4.II.5.1)
TV43WT-RO	5' TGG CCA CTG CAA GCA GCA ACA TAC CAT TGC 3'	ES-Zell-Analyse (4.II.5.1)
43-trun-03	5' GGT CCA AGC CTA CTC CAC GGC C 3'	Interne Cx43 Sonde (4.II.10.3 & 4.III.2.1)
43-trun-04	5' CCA TCG ATT AGG ATG GGC TCA GTG GGC CGG 3'	Interne Cx43 Sonde (4.II.10.3 & 4.III.2.1)
Cx43delICT-HO3	5' CAA AAC ACC CCC CAA GGA ACC TAG 3'	Cx43 K258 stop PCR (4.II.6.2)
delICT-RO	5' GCA TCC TCT TCA AGT CTG TCT TCG 3'	Cx43 K258 stop PCR (4.II.6.2)
Cx43-HO2 (Plum et al., 2001)	5' CGC AAT TAC AAC AAG CAA GCC AGC 3'	Cx43 WT PCR (4.II.6.2)
Cx43-RO4 (Plum et al., 2001)	5' CGC CTC ATT ACT GAG GTT GTT GAG 3'	Cx43 WT PCR (4.II.6.2)
43del-forward (Theis et al., 2001)	5' GGC ATA CAG ACC CTT GGA CTC C 3'	Cx43 del PCR (4.II.6.2)
43del-revers (Theis et al., 2001)	5' TGC GGG CCT CTT CGC TAT TAC G 3'	Cx43 del PCR (4.II.6.2)

2.V Hybridisierungssonden

Zielregion	Beschreibung	Größe	Verwendung (Ergebnisse)
<i>cx43</i> 3' UTR	<i>Ava</i> I –Fragment aus Plasmid <i>Cx43 Cla</i> I/ <i>Hind</i> III	550 bp	Externe Sonde (4.II.10.3 & 4.III.2.1)
<i>cx43</i> kodierende Region	PCR-Fragment aus Cloning Cx43K258stop- PCR	770 bp	Interne Sonde (4.II.10.3 & 4.III.2.1)
<i>cx43</i> 3' UTR	<i>Cla</i> I - <i>Eco</i> RI – Fragment Aus Plasmid <i>Cx43 Cla</i> I/ <i>Hind</i> III	880 bp	Northern Blot Analysen (4.III.2.2 & 4.III.4.5)

2.VI Bakterienstämme

E. coli Stamm	Genotyp	Eigenschaft	Referenz
XL I-blue	recA1, endA1, gryA96, thi-1, d(mcr)A183, d(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, supE44, relA1, lac[F pro AB lacI ^q ZdM15Tn10(tet ^r 12,5 µg/ ml)]	Tetracyclinresistenz DNS-Methylierungsdefizienz	Bullock et al., 1987

2.VII Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
HeLa (ATCC CCL 2)	Aneuploide, epitheloide Cervixkarzinom Linie aus menschlichem Gewebe	Untransfizierte, kommunikationsdefiziente Wildtyp-Zellen (HeLa-WT)	Jones et al., 1971
HM1	Embryonale Stammzellen der Maus, gewonnen aus dem Mausstamm Sv129P2/OlaHsd	Im <i>cx43</i> Locus unveränderte ES-Zellen	Magin et al, 1992
AK 53	Homolog rekombinierte HM1 Zellen	Kodierende <i>cx43</i> Region ausgetauscht gegen <i>hprt</i> -Minigen	Plum et al., 2000
Klon 63	Homolog rekombinierte HM1 Zellen	Kodierende <i>cx43</i> Region ausgetauscht gegen <i>cx43K258stop</i>	Vorliegende Arbeit

2.VIII Plasmide

Siehe auch Vektorkarten im Anhang

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
<i>pBEHpac1</i>	Expressionsvektor für eukaryotische Zellen	Horst et al., 1971
<i>pBEHpac::Cx43K258stop</i>	<i>cx43K258stop</i> -Expressionsvektor	Vorliegende Arbeit
<i>pBluscript II SK (+) [pBSK]</i>	Klonierungsvektor	Stratagene
<i>G143*</i>	3,1 kb <i>cx43</i> genomische DNS: kodierende <i>cx43</i> Region, flankiert von ca. 1 kb 3' und 5' untranslatierte Region, gegenüber <i>G143</i> (G. Schwarz) ohne <i>Eag</i> I-Schnittstelle in Multipler Klonierungsstelle	Erhalten von M. Theis
<i>G143*::Cx43trunk</i>	<i>G143*</i> mit verkürzter <i>cx43</i> kodierenden Region (Mutation <i>cx43K258stop</i>)	Vorliegende Arbeit
<i>Cx43target2*</i>	5 kb <i>cx43</i> - 5' untranslatierte Region :: <i>cx32</i> kodierende Region :: 1,6 kb <i>cx43</i> - 3' untranslatierte Region; gegenüber <i>Cx43target2</i> (Plum et al., 2000) mit zusätzlicher <i>Not I</i> Schnittstelle	Erhalten von M. Theis
<i>Cx43target2**</i>	<i>Cx43target2*</i> ohne <i>Xho</i> I Schnittstelle am Übergang zwischen 3' untranslatierter Region und <i>pBSK</i> -Vektorrückgrat	Vorliegende Arbeit
<i>Cx43K258stop</i>	Zielgenvektor zur Einbringung der <i>cx43K258stop</i> -Mutation	Vorliegende Arbeit
<i>Cx43 Sac I / Hind III</i>	3 kb <i>cx43</i> genomische DNS, bestehend aus 500 bp 3' kodierende Region und 2.5 kb 3' untranslatierter Region	Erhalten von G. Schwarz
<i>PCR-Cx43K258stop</i>	PCR-Testvektor	Vorliegende Arbeit

2.IX Größenstandards

DNS-Größenstandards	Fragmentgrößen (kb)
<i>EcoR I/Hind III</i> gespaltene Lambda-DNS	21,226; 5,148; 4,973; 4,268; 3,530; 2,027; 1,904; 1,584; 1,375; 0,947; 0,831; 0,564; 0,125
1 kb DNS-Leiter (Gibco)	12,216; 11,198; 10,18; 9,162; 9,144; 7,126; 6,108; 5,09; 4,072; 3,054; 2,036; 1,636; 1,018; 0,517; 0,506; 0,398; 0,344; 0,298; 0,220; 0,201; 0,154; 0,134; 0,075
100 bp DNS-Leiter (Gibco)	2,072; 1,500; 1,400; 1,300; 1,200; 1,100; 1,000; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100
RNS-Größenstandard	Fragmentgrößen (kb)
0,24-9,5 kb RNS-Leiter (Gibco)	9,49; 7,46; 4,40; 2,37; 1,35; 0,24
Protein-Molekulargewichtsstandard	Molekulargewicht (kD)
Prestained Precision Protein Standard (Bio-Rad)	250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 15, 10

2.X Antikörper

2.X.1 primäre Antikörper

Antigen	Antikörper Typ	Spezies	Verwendung	Bezugsquelle Referenz
Cx26	monoklonal	Maus	IB IF	1:3000 1:200 Zymed
Cx45	monoklonal	Maus	IB IF	1:1000 1:100 Chemicon
β -Catenin	monoklonal	Maus	IF	1:100 BDBioscience
BrdU	monoklonal	Maus	IF	1:10 Roche
Cx43, carboxy-terminale Domäne (Cx43-CS)	polyklonal	Kaninchen	IP IB IF	2 μ l 1:500 1:500 C. Schlieker (Diplomarbeit, 2000)
Cx43, zweite Hälfte der zytoplasmatischen Schleife (Cx43-L2)	polyklonal (affinitätsgereinigt)	Kaninchen	IP IB IF	2 μ l 1:500 1:250 Yeager and Gilula, 1992
Keratin 1	polyklonal	Kaninchen	IB IF	1:5000 1:500 Babco
Keratin 5	polyklonal	Kaninchen	IB IF	1:5000 1:500 Babco
Loricrin	polyklonal	Kaninchen	IB IF	1:1000 1:500 Babco

Antigen	Antikörper Typ	Spezies	Verwendung		Bezugsquelle Referenz
Filaggrin	polyklonal	Kaninchen	IB	1:10000	Babco
			IF	1:750	
ZO-1	polyklonal	Kaninchen	IB	1:500	Zymed
			IF	1:250	
Cx30	polyklonal	Kaninchen	IF	1:100	Zymed
Cx31	polyklonal	Kaninchen	IF	1:100	Biotrend
Cx40	polyklonal	Kaninchen	IB	1:500	Biotrend
			IF	1:100	

IP: Immunpräzipitation, IB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz

2.X.1 sekundäre Antikörper

Antigen	Antikörper Typ	Spezies	Markierung	Verwendung	Bezugsquelle
Kaninchen IgG	polyklonal	Ziege	Meerrettich- Peroxidase	IB	1:20000 Dianova
Kaninchen IgG	polyklonal	Ziege	Alexa ⁵⁹⁴	IF	1:2000 Mobitec
Kaninchen IgG	polyklonal	Ziege	Alexa ⁴⁸⁸	IF	1:400 Mobitec
Maus IgG	polyklonal	Ziege	Meerrettich- Peroxidase	IB	1:20000 Dianova
Maus IgG	polyklonal	Ziege	Alexa ⁵⁹⁴	IF	1:1000 Mobitec

IB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz

2.XI Mauslinien

Stamm / Linie	Beschreibung	Referenz
C57BL/6	Wildtyp-Mausstamm schwarzer Fellfarbe; Züchtung und Rückkreuzung; Weibchen als Blastozysten-Spendertiere für Blastozysteninjektion	Charles River
NMRI	albino Wildtyp-Mausstamm, Weibchen als Empfängertiere für injizierte Blastozysten	Charles River
Cx43del	Transgene Mauslinie; kodierende Region des <i>cx43</i> Gens ist durch das <i>lacZ</i> -Reportergen ausgetauscht	Theis et al., 2001

2.XII Geräte

Axiophot; Mikroskop mit Epifluoreszenz und angeschlossener AxioCam color HR (Zeiss)
Besputterungsanlage HR 208 (Cressington)
Binokular MS5 (Leica)
Blotting-Chamber Mighty-Small II [Western-Elektroblot] (Bio-Rad)
Echokardiograph HDI-5000 mit 15 MHz Schallkopf (Philips Medical Systems, USA)
EKG Mehrkanal-Verstärker und Digitalkonverter (PowerLab™ System, ADInstruments)
Elektrophoresekammer Mighty Small II SE250/SE260 mit SE245 [SDS-PAGE] (Hoefer)
Elektrophoresekammern Pharmacia GNA-100 und -200 [Nukleinsäuren] (Pharmacia)
Elektroporationsapparatur Gene Pulser (Bio-Rad)
Entwicklermaschine Curix 60 (Agfa)
Geltrockner M583 Gel Dryer (Bio-Rad)
Glasmesser Brecher [Semidünnschnitten] LKB 2178 Knife Maker II (LKB)
ImageMaster VDS [UV-Apparatur zur Dokumentation von EtBr-Agarosegelen] (Pharmacia Biotech)
Inkubatoren für die eukaryotische Zellkultur mit CO₂-Regelung (Heraeus)
Kritischer-Punkt-Trockner [Rasterelektronenmikroskopie] CPD 030 (BAL-TEC)
Kryostat HM5000M (Microm)
Lyophylle LYOVAC GT2 (Leybold)
Paraffin-Gewebeinfiltrationsautomat TP 1020 und Paraffinausgießstation EG 1140H (Leica)
Paraffin-Schnitt-Transfersystem mit Rotationsmikrotom HM 360 (Leica)
PCR Maschine PTC-100 und PTC 200 „Programmable Thermal Controller“ (BioZym)
Raster-Elektronenmikroskop FEG XL 30 S (FEI Philips)
Schüttler G25 [Bakterienkultur] (Heraeus)
Spektralphotometer DU 640 (Beckman) und Shimadzu UV-120-02
Sputter-Coater für Raster-Elektronenmikroskopie 208 HR (Cressington Scientific Instruments Ltd.)
Szintillationszähler LS 1801 (Beckman)
Telemetrie Adaptor Analog Output Adaptor (Data Sciences International)
Telemetrie-Empfängerplatte RPC-1 (Data Sciences International)
Telemetrie Software PowerLab (Chart, ADInstruments für Apple Macintosh Rechner)
Telemetrie Tansmitter für Langzeit EKG TA10EA-F20 (Data Sciences International)
Telemetrie Analog-Digital-Wandler (PowerLab 4s, ADInstruments)
Transmissions-Elektronenmikroskop CM120 (FEI Philips)
Ultramikrotom (Semi- und Ultradünnschnitte) Ultracut E (Reichert Jung)
Ultraschallbad Transonic T460, ELMA und Ultraschallspitze Sonifer B-12 (Branson)
UV Stratalinker 2400 (Stratagene)

Zentrifugen: Centrifuge 5415 D (Eppendorf), Biofuge fresco, Minifuge RF, Multifuge 3 S-H (Heraeus), GPKR Centrifuge, J2-21 mit Rotor JA-20 (Beckman)

2.XIII Sonstige Materialien

Begrenzungsstift für Immunfluoreszenz (DakoPen, Dako)

Diamantmesser (Diatome 45° MA 757, Leica)

Einbettgießformen für Elektronenmikroskopie (Plano)

Einbettungskassetten für Histologie (Biopsie-Kassetten, Leica)

Einfriergefäß für Zellen (Cryo 1°C Freezing Container, „Mr. Frosty“; Nalgene)

Epilierungscreme (Pilca)

Faltenfilter (Schleicher & Schuell)

Glasstreifen für Glasmesser (Plano)

Glasmesserbrecher (LKB)

Halter für Präparate in der Raster-Elektronenmikroskopie (Plano)

Kolbenhubpipetten (Gielson)

Negativfilme für Elektronenmikroskopie (Kodak Electron Image Film, SO-163)

Nitrozellulose Membranen (Hybond-ECL, Amersham)

Nylon Membranen (Hybond-N- und Hybond-N⁺-Membran, Amersham)

Objektträger (Superior, Marienfeld und SuperFrost Plus, Menzel-Gläser)

Pipettenspitzen und Reagenzgefäße (Sarstedt)

Pipettierhilfe (accu-jet, Brand)

Plastikküvetten (Einmal Küvetten ½ Mikro 1,6 ml, VWR)

Plastikschieffchen für Glasmesser (Plano)

Röntgenfilme (X-OMAT AR (Sigma), BIOMAX AR und BIOMAX MR (Kodak))

Sterile Zellkulturartikel (Falcon, Sarstedt, Nunc und Becton Dickinson)

Sterilfilter (0,4 µm und 0,2 µm, Schleicher & Schuell)

Transmitter für Langzeit EKG Telemetrie (Data Science)

Whatman 3mm-Papier GB 002 (Schleicher & Schuell)

3. Methoden

3.I. Methoden der Analyse von Nukleinsäuren

3.I.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.I.1.1 Analytische Plasmid-Isolierung (Minipräparation)

Zur schnellen Präparation von Plasmid-DNS aus einer Vielzahl von Bakterienklonen (nach Luckow; modifiziert nach Holmes und Qingley, 1981) werden 2 ml LB-Medium, versehen mit dem geeigneten Antibiotikum, mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien inokuliert. Die Kultur wird bei 37°C für mindestens 8 h bei 225 Upm inkubiert. 1,5 ml der Kultur werden in ein Schnappdeckel-Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien durch einminütiges Zentrifugieren bei 16000 x g sedimentiert. Das Sediment wird nach Verwerfen des Überstandes in 400 µl STET-Puffer resuspendiert. 30 µl frisch angesetzte Lysozym-Lösung werden zugesetzt und die Suspension mit Hilfe eines Strudelmischers durchmengt. Die Ansätze werden 5 min bei RT inkubiert und dann einem einminütigen Hitzestoß von 100°C unterzogen. Die Ansätze werden 5 min auf Eis abgekühlt und danach bei 4°C für 15 min bei 16000 x g zentrifugiert. Das aus Zellresten und hieran haftender genomischer DNS bestehende Sediment wird entfernt (steriler Zahnstocher). Der die plasmidische DNS und RNS enthaltende Überstand wird mit 400 µl 2-Propanol vermischt und für 20 min bei -20°C gelagert. Das Präzipitat der Plasmid-DNS wird durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 18000 x g sedimentiert (DNS fällt als dehydriertes Salz aus), der Überstand wird verworfen und die DNS mit 400 µl kaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation (10 min, 4°C, 18000 x g) wird der Überstand verworfen und die Plasmid-DNS nach Lufttrocknung in 50 µl TE-Puffer mit 0.1% RNase2000 aufgenommen. Die Plasmid-DNS-Lösung wird bei -20°C gelagert.

3.I.1.2 Präparative Plasmid-DNS Isolierung mittels Anionentauschersäulen (Midipräparation)

Zur Präparation größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNS wird der Plasmid-Präparationssatz der Firma Jetstar verwendet.

Für die Gewinnung von Plasmid-DNS in hoher Kopienanzahl werden 50 ml LB Medium, versehen mit dem geeigneten Antibiotikum, mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien inokuliert. Die Kultur wird nach 12 h Inkubation bei 37°C und 225 Upm in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß (Falcon) überführt und die Bakterien durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 20°C und 7000 x g sedimentiert. Die Bakterien werden in einem Volumen von 4 ml Resuspensionslösung (50 mM Tris, 10 mM EDTA; RNase; pH 8,0) gelöst. Die Isolierung beginnt mit einem alkalischen Zellaufschluß durch Zugabe von 4 ml Lysispuffer (200 mM NaOH; 1,0% SDS). Nach Neutralisation durch Zugabe von 4 ml Neutralisationspuffer (3,1M KAc; pH 5,5) wird der Überstand des Lysates auf die äquilibrierte Anionentauscher-Säule (10 ml Äquilibrationspuffer: 600 mM NaCl; 100 mM NaAc; 0,15% Triton X-100; pH 5,0) gegeben. Durch stufenweises Erhöhen der Ionenkonzentration werden Protein- und RNS-Verunreinigungen ausgewaschen (2 x 10 ml Waschpuffer: 800 mM NaCl; 100 mM NaAc; pH 5,0). Die Plasmid-DNS wird mit hoher Anionenkonzentration aus der Bindung an die Kationenmatrix der Säule verdrängt (5 ml Elutionspuffer: 1250 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl; pH 8,5), durch 2-Propanolfällung konzentriert und schließlich im gewünschten TE-Puffer-Volumen aufgenommen (100-200 µl). Die Plasmid-DNS-Lösung wird bei -20°C gelagert.

3.I.1.3 Präparative, endotoxinfreie Plasmid-DNS Isolierung mittels Ionenauschersäulen (Maxipräparation)

Die für die Transfektion embryonaler Stammzellen der Maus benötigten großen Mengen an Plasmid-DNS werden mit Hilfe des QIAGEN EndoFree MaxiKits der Firma Qiagen gewonnen. Um zu gewährleisten, daß die zu transfizierende DNS frei von bakteriellen Endotoxinen ist, da diese zur Differenzierung von ES-Zellen führen und die Keimbahngängigkeit negativ beeinflussen können, werden bei dieser Präparation ausschließlich Einmal-Plastikpipetten verwendet.

100 ml LB-Medium, versetzt mit dem geeigneten Antibiotikum, werden mit einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienklons inokuliert und über Nacht bei 37°C und 225 Upm inkubiert.

Die Präparation erfolgt über Anionenaustausch-Säulen (QIAGEN-tip 500), prinzipiell wie unter 3.I.1.2 beschrieben. Die Plasmid-DNS wird in 200 µl endotoxinfreiem TE-Puffer gelöst. Die Plasmid-DNS-Lösung wird bei -20°C gelagert.

3.I.1.4 Isolierung genomischer DNS aus Kulturzellen

Für die Isolierung großer Mengen genomischer DNS aus ES-Zellen werden konfluent bewachsene 10 cm-Kulturschalen eingesetzt. Nach Abnehmen des Kulturmediums wird der Zellrasen zweimal mit PBS⁻ gewaschen, um Mediumreste vollständig zu entfernen. Auf die Schale wird eine Mischung von 3 ml ES-Lysispuffer und 30 µl Proteinase K (20 mg/ml) pipettiert. Die geschlossenen Kulturschalen werden für mindestens 3 h auf einem Schwenktisch bei RT inkubiert. Anschließend wird das Lysat mit Hilfe einer 1 ml Kolbenhubpipette mit abgeschnittener Einmalspitze in ein 15 ml Schraubdeckelgefäß überführt und über Nacht (üN) bei 55°C inkubiert. Durch Zugabe von 3 ml 2-Propanol und mehrmaliges Invertieren, wird die gefällte genomische DNS als weißer Faden sichtbar. Dieser DNS-Faden wird mit Hilfe einer umgebogenen 1 ml Spitze einer 1 ml Kolbenhubpipette aus dem Gefäß entfernt, mit 70% Ethanol gewaschen und in ein 2 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt. Je nach Größe der DNS-Flocke wird die luftgetrocknete DNS in 50 bis 200 µl TE-Puffer aufgenommen. Zum Lösen der DNS-Flocke wird der Ansatz üN bei 55°C inkubiert. Die genomische DNS-Lösung wird bei 4°C gelagert.

3.I.1.5 Isolierung genomischer DNS aus Mausschwanzspitzen

Für die Genotypisierung von Mäusen wird eine 0,5-1 cm lange Schwanzbiopsie in 400 µl Laird-Lysispuffer (Laird et al., 1991) mit 3 µl Proteinase K-Lösung bei 55°C üN lysiert. Haare und unlösliche Zellrückstände werden durch Zentrifugieren (5 min, RT, 16000 x g) abgetrennt und der Überstand in ein neues, mit der Tiernummer beschriftetes Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl 2-Propanol und mehrmaligem Invertieren wird die DNS als Flocke sichtbar. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, RT, 18000 x g) wird der Überstand entfernt. Die DNS wird anschließend durch Zugabe von 500 µl 70 % EtOH und Zentrifugation gewaschen. Der Überstand wird wiederum sorgfältig entfernt, die DNS 5 min bei RT getrocknet, danach in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und ÜN bei 55°C in Lösung gebracht. Für PCR-Analysen (siehe 3.5.1) werden 2 µl DNS-Lösung eingesetzt.

3.I.1.6 Isolierung genomischer DNS aus der Leber von Mäusen

Nach der Tötung von Mäusen des gewünschten Genotyps durch zervikale Dislokation wird die Leber zur DNS Gewinnung entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Hilfe von vorgekühlten Schraubzylindern und Metallstäben mit einem Hammer zu Pulver zermörsert, das in 50 ml Röhrchen (Falcon) gesammelt wird, in dem 10 ml Lysis-Puffer vorgelegt sind. Nach der Lysis bei 55°C üN im Wasserbad werden 10 µg/ml RNase2000 zugegeben und die Ansätze bei 37°C, 250 Upm nochmals üN inkubiert, bis keine Gewebeklumpen mehr sichtbar sind. Zur Abtrennung der DNS-haltigen Lösung erfolgt die Zugabe von 10 ml Roti-Phenol/Chloroform, eine

Zentrifugation (30 min, 4°C, 7000 x g) und die Abnahme der oberen Phase, die in ein neues 50 ml Gefäß überführt wird. Durch Mischen des Ansatzes nach Zugabe von zwei Volumen absolutem EtOH und 1/50 Volumen 3 M NaCl-Lösung wird eine DNS-Flocke sichtbar, die mit einem sterilen Zahnstocher aus der Lösung gefischt werden kann. Diese Flocke wird 2 h bei RT in 70% EtOH unter Schütteln gewaschen, anschließend 30 min luftgetrocknet und schließlich mit 1 ml TE-Puffer versetzt. Nach Zugabe von 50 µl RNase2000 wird die DNS bei 55°C üN im Wasserbad unter Schütteln gelöst.

3.I.1.7 Isolierung von Gesamt-RNS aus Geweben

Mittels des Reagenzes TRIzol, einer homogenen Lösung aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat (Chomczynski und Sacchi, 1987), lässt sich Gesamt-RNS aus Kulturzellen und Geweben geschützt vor RNasen isolieren. Hierzu wird Gewebe frisch präpariert, gewogen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Unter einem Abzug werden pro 100 mg Gewebe 1 ml TRIzol hinzugegeben und das Gewebe mit Hilfe eines Ultraschallstabes gelöst. Der Ansatz wird für 5 min bei RT inkubiert. Zum Lysat werden pro ml TRIzol 0,2 ml Chloroform gegeben, der Ansatz wird 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt und daraufhin 15 min bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues 13 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml 2-Propanol/ml TRIzol versehen, durch Invertieren des Gefäßes durchmischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 12000 x g wird der Überstand verworfen und die gefällte RNS mit 3 ml 75% RNS-Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 7500 x g wird der Überstand entfernt und die RNS luftgetrocknet. Die getrocknete RNS wird in 400 µl DMPC-Wasser gelöst und in 2 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäße überführt. Für die photometrische Vermessung und ein RNS-Testgel zur Überprüfung auf RNS-Abbau werden sofort zweimal 10 µl RNS-Lösung abgenommen. Nach vollständiger Lösung der RNS durch 5 minütige Inkubation bei 65°C werden die RNS-Proben bei -70°C gelagert.

3.I.2 Aufreinigung von DNS-Fragmenten

3.I.2.1 Aufreinigung von DNS aus niedrigschmelzenden Ethidiumbromid-Agarosegelen

DNS-Fragmente von 100 bp bis 10 kb Länge können mit Hilfe kommerzieller Reagenzien-Sätzen schnell aus Agarosegelen isoliert werden (hier: QIAquick Gel Extraktion Kit, Qiagen). Die Ausbeute liegt bei 70 bis 80%. Das gewünschte DNS-Fragment wird mit Hilfe des Lichts eines langwelligen UV-Leuchtkastens identifiziert und möglichst knapp mit einem Skalpell aus dem Ethidiumbromid-Agarosegel ausgeschnitten. Das Gelstück wird in ein 1,5 ml Schnappdeckel-Reaktionsgefäß überführt und mit dem dreifachen Volumen Extraktionslösung des Gelgewichts versehen (100 mg entsprechen 100 µl). Zum Lösen wird der Ansatz bei 55°C inkubiert und unterstützend alle 2 min auf einem Strudelrührer durchmischt. Nach Zugabe eines Volumens 2-Propanol wird der Ansatz auf die Elutionssäule gegeben. Die DNS bindet mit hoher Affinität an die Silikatmatrix. Nach 1 minütiger Zentrifugation (RT, 16000 x g) und Verwerfen des Durchflusses werden 0,75 ml Waschpuffer auf die Säule gefüllt. Der Ansatz wird 5 min bei RT inkubiert und zweimal für 1 min (RT, 16000 x g) zentrifugiert. Die Elution der DNS erfolgt mit einem Volumen von 30 bis 60 µl Elutionspuffer durch erneute Zentrifugation (1 min, RT, 16000 x g). Die DNS kann für weitere Anwendungen sofort verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

3.I.2.2 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNS

Die Extraktion mit Hilfe organischer Lösungsmittel dient zur Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Ansätzen, in denen (modifizierende) Proteine enthalten sind. Die durch die Behandlung denaturierten Proteine befinden sich nach der Phasentrennung in der organischen Phase, Nukleinsäuren in der wässrigen Phase. Bei der Extraktion von sehr geringen DNS-Mengen kann Glykogen als Träger- und Markierungshilfe beigemischt werden.

Die DNS-Lösung wird mit einem Volumen TE-gesättigtem Phenol/Chloroform (1:1) kräftig durchmischt (Strudelmischer). Zur Phasentrennung wird der Ansatz 2 bis 10 min bei 17500 x g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird abgenommen und kann zur Entfernung von Phenolresten anschließend mit Chloroform/Isomylalkohol (24:1) extrahiert werden. Bei der Aufreinigung von PCR-Produkten empfiehlt sich zusätzlich ein Waschen mit Ether, da die Taq-Polymerase nach der Synthese an den DNS-Enden verbleibt und weitere Modifikationen des Produktes behindern kann. Hierzu wird nach der Phenol/Chloroform-Extraktion ein Volumen Ether zugefügt und der Ansatz kräftig durchmischt (Strudelmischer). Zur Phasentrennung wird die Mischung kurz zentrifugiert und der Unterstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wird dreimal durchgeführt und der Etherüberstand nach dem letzten Waschschrift abgedampft.

3.I.3 Enzymatische Modifikationen von DNS

3.I.3.1 Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen kurze DNS-Sequenzen und schneiden doppelsträngige DNS innerhalb dieser Erkennungssequenz. Somit kann doppelsträngige DNS reproduzierbar in diskrete Fragmente aufgetrennt werden. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen werden unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

Vollständige Spaltung von Plasmid-DNS

Analytische Spaltungen erfolgen in einem Endvolumen von 10 µl. Eingesetzt werden 0,2 µl der jeweiligen Restriktionsendonukleasen (0,16 bis 0,3 Enzymeinheiten). Präparative Spaltungen erfolgten in einem der eingesetzten DNS-Menge und dem weiteren Vorgehen entsprechenden Volumen.

Vollständige Spaltung von genomischer DNS

Für die Analyse von genomischer DNS mittels Southern-Blot-Hybridisierung werden 12 µg genomische DNS für die jeweiligen Spaltungen in einem Volumen von 40 µl eingesetzt. Pro Ansatz werden 1,5 µl hochkonzentrierte Restriktionsendonuklease (40U/µl; *Hind* III; Roche) eingesetzt. Um mögliche Verminderungen der Restriktasenaktivität durch RNS-Kontaminationen auszuschließen, wird jedem Ansatz 1 µl RNase2000 zugefügt. Die Spaltungen erfolgten in 37°C. Die Vollständigkeit der Spaltung wird durch Auftrag 1/20 Vol. des Restriktionsansatzes auf ein 0,7% Ethidiumbromid-Agarosegel überprüft. Gegebenenfalls werden unvollständig verdauten Ansätze mit zusätzlichen 10 µl frischer Restriktase-Lösung (1 µl Restriktase auf 9 µl 1x Restriktase-Puffer) versehen und erneut in 37°C inkubiert. Die Gele werden zudem für den quantitativen Abgleich der für die Hauptgele aufzutragenden Volumen der Restriktionsansätze verwendet.

Partielle Spaltung von Plasmid-DNS

Für einige Klonierungsvorhaben ist es günstig, Plasmid-DNS nur an einigen der vorhandenen Erkennungssequenzen einer Restriktionsendonuklease zu spalten. Partielle Restriktionen können a) durch Zeitreihen, d.h. Inkubation gleicher DNS-Mengen mit der gleichen Enzymmenge über

unterschiedliche Zeiträume und/oder b) durch Verdünnungsreihen, d. h. Inkubation der gleichen DNS-Menge mit unterschiedlich konzentrierten Enzymmengen über den gleichen Zeitraum erhalten werden.

3.I.3.2 Glättung überhängender einzelsträngiger DNS-Enden

Viele Restriktionsendonukleasen erzeugen bei der Spaltung von DNS-Molekülen 3'- oder 5'-überhängende Enden. Häufig sind die erzeugten Enden von DNS-Fragmenten, die im Weiteren verbunden werden sollen, nicht kompatibel. In diesen Fällen können die Enden durch Auffüllen (5'-überhängende Enden) mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNS-Polymerase I aus *E.coli* oder durch Abbau (3'-überhängende Enden) mittels der T4 DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4 geglättet werden. Im Verlauf der Arbeit werden ausschließlich 5' überhängende Enden geglättet:

Zu 20 µl hitzeinaktiviertem Restriktionsansatz (0,1-4 µg DNS) werden jeweils 10 µl Glättungsansatz gegeben, bestehend aus 1,0 µl hochsalziger Restriktionpuffer (zehnfach konzentriert), 3,0 µl DTT [10 mM] (Dithiothreitol; Reduktionsmittel stabilisiert das Klenow-Fragment), 0,5 µl dNTPs [2 mM], 4,5 µl Wasser und 1,0 µl Klenow [2 Einheiten/µl]. Die Inkubation des Ansatzes erfolgt bei 37°C für 15 min. Anschließend wird das Klenow-Enzym im Ansatz durch 15 minütige Inkubation bei 75°C hitzeinaktiviert.

3.I.3.3 Dephosphorylierung freier 5' -DNS-Enden

Die Wahrscheinlichkeit einer unimolekularen Verknüpfung kann dadurch vermindert werden, dass die freien 5' Phosphatgruppen der Vektor-DNS entfernt werden. Als Phosphatase wird hierzu die alkalische Phosphatase aus Krabben verwendet. Diese alkalische Phosphatase ist kompatibel mit Restriktionsendonukleasen-Puffern hohen Salzgehaltes. DNS-Fragmente aus Restriktionen unter anderen Bedingungen müssen entsprechend umgepuffert oder vor der Behandlung aufgereinigt werden. In der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich aus Ethidiumbromid-Gelen isolierte DNS-Fragmente 5' dephosphoryliert. Dazu wird Vektor-DNS Eluat mit 1 µl Phosphatase [1 Enzymeinheit/µl] und 3 µl zehnfach Phosphatasepuffer versetzt und auf ein Volumen von 29 µl gebracht. Der Ansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert. Ein weiterer µl Phosphatase wird zugegeben und der Ansatz weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wird hitzeinaktiviert (15 min, 75°C) und die DNS in berechneter Menge für die Ligation eingesetzt.

3.I.3.4 DNS-Ligation

Bei der Zusammenfügung von freien DNS-Enden (Ligation) muß stets zwischen intra- und intermolekularen Verknüpfungen unterschieden werden. Intramolekulare Verknüpfungen können nur erfolgen, wenn die DNS-Enden jeweils kohäsiv oder glatt sind. Die Rezirkularisierung, eine unimolekulare Reaktion, ist in diesem Fall wahrscheinlicher. Um möglichst wenig Konkatemere zu erhalten, werden diese Ligationen darum in großen Reaktionsvolumen, mit wenig DNS und über einen kurzen Zeitraum durchgeführt. Plasmid-Rezirkularisierungen werden beispielsweise nach der Entfernung von Schnittstellen durch Glättung durchgeführt.

Die meistens erwünschten intermolekularen Verknüpfungen können durch mehrerer Faktoren gegenüber der Religation begünstigt werden: Durchführung in einem möglichst kleinen Volumen (10 µl); Erzeugung nicht-kompatibler Enden an den einzelnen DNS-Fragmentenden, so daß nur intermolekulare Verknüpfungen zwischen Vektor- und Passagier-DNS möglich sind; Dephosphorylierung der freien 5' Enden, wenn Fragmente mit geglätteten oder kohäsiven Enden ligiert werden sollen. Zur Verknüpfung wird die DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 eingesetzt. Sie nutzt ATP als Cofaktor für die Katalyse der Phosphodiesterbrücken-Bildung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3' Hydroxyl-Enden in doppelsträngiger DNS. Sie kann im

Unterschied zur DNS-Ligase aus *E.coli* neben kompatiblen überhängenden Enden auch geglättete Enden verknüpfen.

Tabelle 3.1: Ligationsbedingungen für intra-oder intermolekulare Verknüpfungen von Plasmid-DNS

Zusammensetzung und Bedingungen	Intramolekulare Verknüpfung	Intermolekulare Verknüpfung
Volumen eingesetzter DNS	x µl	x µl
Volumen zehnfach T4 DNS-Ligasepuffer	4 µl	1 µl
Volumen T4 DNS-Ligase [1 Einheit/µl]	1 µl	1 µl
Endvolumen, einzustellen mit A. bidest	40 µl	10 µl
Inkubationsbedingungen bei Ansätzen mit kompatiblen, kohäsiven Enden	12 bis 16 h 16°C (Wasserbad)	12 bis 16h 16°C (Wasserbad)
Inkubationsbedingungen bei Ansätzen mit glatten Enden (bei intermol. Ansatz erneute Zugabe von Ligase und Puffer nach 20h)	4 bis 12 h 16°C (Wasserbad)	16 bis 48 h Raumtemperatur

3.I.4 Elektrophorese

Die Auftrennung von Molekülen in einem elektrischen Feld auf Grund ihrer Ladung nennt man Elektrophorese. Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren wird durch ihre negative Nettoladung (Phosphatgruppen) ermöglicht. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Molekül ist, neben Stärke des elektrischen Feldes und Nettoladung des Moleküls, abhängig vom Friktionskoeffizient. Dieser bezieht, neben Masse und Form des Moleküls, die Viskosität des Mediums ein, in dem die Elektrophorese stattfindet. Die Größe von Molekülen lässt sich durch gleichzeitiges Auftragen von Molekülen bekannter Länge (Größenstandard).

3.I.4.1 Native Agarose-Gelelektrophorese von DNS

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren im Bereich von 100 bp bis 20 kb wird native Agarose als Matrix genutzt. Gele werden, entsprechend der zu analysierenden Fragmentgrößen, in Agarose-Konzentrationen von 0,65 bis 2,0%, mit 0,5 fach TBE-Puffer hergestellt. Vor dem Ausquellen wird Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml hinzugegeben. DNS-Proben und DNS-Längenstandard werden, mit 6 fach DNS-Ladepuffer versehen, aufgetragen und können nach erfolgter Elektrophorese (5-6 V/cm Gellänge; in 0,5 fach TBE) durch die Interkalation des Ethidiumbromids auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden.

3.I.4.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNS

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in 1,0% Agarosegelen, die 0,9% Formaldehyd enthalten. Durch die denaturierenden Bedingungen werden RNS-Trennartefakte, durch das Auftreten partieller Duplex-RNS-Formungen, ausgeschlossen. Die RNS-Proben werden mit 2 µl Formaldehyd (37%), 5 µl Formamid_{deion}, 1 µl zehnfachkonzentrierten MOPS-Puffer und 1 µl Ethidiumbromid (400 µg/µl) versetzt, 15 min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl 6 fach RNS-Ladepuffer werden Proben und RNS-Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in einfach MOPS-Puffer unter ständiger Pufferumwälzung (4°C, 5-6 V/cm Gellänge). Die Laufstrecken der ribosomalen RNS (28S = 4,7 kb, 18S = 1,9 kb) und des Standards werden nach erfolgter Elektrophorese mittels UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

3.I.5 Fällung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.I.5.1 Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren fallen in der Anwesenheit von Natrium- oder Ammoniumionen und Ethanol als Kationen-DNS-Salze aus (nach Wallace, 1987). Vor der Fällung hinzugegebenes Glycogen (Boehringer) kopräzipitiert mit DNS und verringert so Fällungsverluste.

Natriumacetat-Fällung von DNS

Zur DNS-Lösung werden $\frac{1}{10}$ Vol. Natriumacetat (3 M; pH 5,2) und $2\frac{1}{2}$ Vol. eiskalter Ethanol_{absolut} gegeben. Alternativ kann zur Verringerung des Fällungsvolumens als Alkohol 0,6-1 Vol. 2-Propanol eingesetzt werden. Der gut durchmischte Ansatz wird zur Präzipitation 15 min bei -70°C (Ethanol) oder 30 min bei RT (2-Propanol) inkubiert. Das Präzipitat wird sedimentiert (30 min, 4°C , $17500 \times g$), mit 70% Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung im gewünschten Volumen TE-Puffer gelöst.

Natriumacetat-Fällung von RNS

Zu 400 μl RNS-Lösung werden 2 Vol. Ethanol_{absolut} und $\frac{1}{10}$ Vol. RNS-Natriumacetat (3M; pH 5,2, in DMPC-Wasser) gefügt und durchmischt. Die RNS wird für 15 min bei -70°C präzipitiert und anschließend sedimentiert (15min, 4°C , $19000 \times g$). Das Sediment wird mit 500 μl 75%-RNS-Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung im berechneten Volumen DMPC-Wasser aufgenommen. Die Lösung wird 5 min bei RT geschüttelt und 2 min bei 65°C inkubiert. Die RNS wird bei -70°C gelagert.

3.I.5.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur photometrischen Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren wird die Extinktion im Wellenlängenbereich des Absorptionsmaximums von Nukleinsäuren (260 nm; durch die heterozyklischen Nukleotidbasen) und Proteinen (280 nm; durch aromatische Aminosäurereste) vermessen. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz entspricht eine Optische Dichte von 1 (OD1) bei 260 nm und einem Strahlengang von 1 cm einer Konzentration von

50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (doppelsträngige DNS)

40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (RNS)

33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Oligonukleotide)

$\text{Konzentration [} \mu\text{g}/\mu\text{l]} = \frac{A_{260} \times \text{Verdünnung} \times \text{OD } 1}{1000}$
--

Der Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung (1,8-2,0 für DNS; 1,9-2,2 für RNS). Niedrigere Werte deuten auf verunreinigende, UV-absorbierende Stoffe hin (Proteine, Phenol).

3.I.5.3 Konzentrationsabschätzung durch Ethidiumbromid-Fluoreszenz

Hierbei wird zur quantitativen Konzentrationsbestimmung die Ethidiumbromid-Fluoreszenz-Intensität einer zu vermessenden Bande mit derjenigen eines Standards bekannter Konzentration verwendet.

Zudem kann mittels dieser Methode der genaue Abgleich von Nukleinsäure-Volumina, die für Southern oder Northern Blot-Analysen eingesetzt werden, unter Verwendung des computergestützten ImageMaster-Kalibrierungsprogramms (Amersham) erfolgen. Hierzu werden Analysegele mit $\frac{1}{20}$ des Restriktionsansatzes (Southern Blot) , bzw. 10 μl nichtabgeglicher Gesamt-RNS (Northern Blot) hergestellt und die erhaltenen Banden mittels ihrer Ethidiumbromid-Fluoreszenz-Intensität abgeglichen.

3.I.6 Transfer und Fixierung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Nukleinsäuren werden nach elektrophoretischer Auftrennung in Agarose-Gelen für die Hybridisierung mit markierten DNS-Sonden auf Nylonmembranen übertragen, da sie hier fixiert leichter handhabbar und der Hybridisierung besser zugänglich sind. Nylonmembranen haben gegenüber Nitrozellulosemembranen den Vorteil höherer Bindungskapazität und Haltbarkeit. Dies ermöglicht mehrmaliges Hybridisieren einer Membran, beispielsweise mit verschiedenen DNS-Sonden.

Einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle werden mittels Kapillarkräfte auf Nylonmembranen übertragen. Die Nukleinsäuren werden anschließend mittels Hitze (15 min, 120°C) und/oder UV-Kreuzvernetzung auf der Membran immobilisiert.

3.I.6.1 Southern Blot-Analyse

Gespaltene genomische DNS wird mittels Elektrophorese in Agarosegelen mittlerer Größe (12x14 cm, 110 ml, 0,5x TBE, 0,7% Agarose, 70 µg Ethidiumbromid) aufgetrennt (RT, 33 V, 18-20h). Das Gel wird mit angelegtem Fluoreszenz-Lineal fotografiert, um später die Größen hybridisierter DNS-Fragmente bestimmen zu können. Zur Erleichterung des Transfers auf die Membran wird die DNS durch Schwenken des Gels für 10 min depuriniert und anschließend denaturiert. Der Übertrag aus dem Gel auf die Nylonmembran erfolgt durch basischen Kapillar-Blot (nach Southern et al., 1975): dazu wird eine Glasplatte auf eine mit Transferlösung gefüllte Melaminschale gelegt, zwei 18 cm breite 3MM Whatman Papierstreifen werden unter der Glasplatte hindurchgeführt (Durchfeuchtung mit Transferpuffer) und dann über sie gezogen, so dass die Enden in den Puffervorrat reichen und die Bahnen glatt auf der Glasplatte liegen. Das Gel wird mit den Geltaschen nach unten auf die durchfeuchteten Bahnen gelegt und bündig mit Parafilmstreifen umlegt. Hierdurch wirken die Kapillarkräfte später nur im Bereich des Gels. Auf das Gel wird ein 12 x 14 cm großes Stück Nylon N⁺-Membran (Amersham) gelegt, die zunächst in A. bidest und dann in Transferlösung befeuchtet wird. Hierauf werden übereinander drei 12 x 14 cm große, befeuchtete 3MM Whatman-Papierstücke gelegt. Abschließend wird eine mindestens 10 cm dicke Schicht aus Zellstoffpapier aufgelegt. Diese wird mit einer Glasplatte und einem 500 g Gewicht stabilisiert und beschwert. Mit der Transferlösung, die durch die Kapillarkraft des Papierses angesogen wird, wird die DNS aus dem Gel auf die Membran übertragen und hier durch die positive Ladung der Membran gehalten. Der Transfer erfolgt für mindestens 12 h bei RT. Die Membran wird nach Blotabbau und Markierung der Lage der Geltaschen auf der Membranrückseite zweimal für 1 min in 2x SSC geschwenkt, getrocknet und die übertragene DNS durch UV-Kreuzvernetzung fixiert. Bis zur Hybridisierung wird die Membran zwischen 2 Lagen 3MM Whatman-Papier bei RT gelagert.

3.I.6.2 Northern Blot-Analyse

Gesamt-RNS wird durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese in Gelen mittlerer Größe (12 x 14 cm) aufgetrennt. Das Gel wird mit angelegtem Fluoreszenzlineal vermessen. Der Übertrag der RNS auf die Nylon N-Membran (Amersham) erfolgt im Gegensatz zum Southern Blot unter neutralen Bedingungen mittels 20x SSC, da es im basischen Milieu zur Hydrolyse der RNS durch die 2' Hydroxylgruppe käme. Das Gel wird 30 min in 20x SSC vorinkubiert. Der Blotaufbau entspricht dem des Southern-Kapillar-Blots (Ausnahme: als Transferlösung dient 20 x SSC, Membran und 3MM Whatmanpapier in Gelgröße werden in 2x SSC befeuchtet). Der Transfer erfolgt für 24 bis 48 h bei RT. Die Membran wird nach Blotabbau und Markierung der Lage der Geltaschen auf der Membranrückseite zweimal für 1 min in 2x SSC gewaschen und zur Immobilisierung der RNS für 15 min bei 120°C gebacken und UV-kreuzvernetzt. Die Lagerung der Membran erfolgt bei RT zwischen 3 MM Whatman-Papier.

3.I.7 Radioaktiver Nachweis von Nukleinsäuren

Durch Hybridisierung einzelsträngiger, radioaktiv markierter DNS-Moleküle können Nukleinsäuren komplementärer Sequenz auf Nylonmembranen nachgewiesen werden. Die Stabilität der durch Basenpaarungen entstehenden Hybridmoleküle ist vom Komplementaritätsgrad der beiden Moleküle abhängig. Die Stringenz, d.h. die Selektivität der Hybridisierung, wird durch die Temperatur beeinflusst. Liegt die Temperatur nahe am Schmelzpunkt ideal gepaarter Hybridmoleküle, kommen unspezifische Paarungen kaum vor. Durch Zugabe von Formamid, welches Wasserstoffbrücken-Bindungen destabilisiert, kann die Temperatur ohne Verlust der Stringenz auf 42°C gesenkt werden. Hierdurch werden die Arbeitsschritte erleichtert und die DNS-Moleküle weniger beschädigt als bei Temperaturen um 65°C.

3.I.7.1 Markierung von DNS-Sonden

Für die radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten, die als Sonden eingesetzt werden sollen (nach Feinberg und Vogelstein, 1984), wird α -³²P-dCTP eingesetzt. Die Markierung erfolgt mittels des Megaprime Labelling System Kits (Amersham). 25 bis 50 ng DNS werden in einem 1,5 ml Schraubdeckelgefäß mit A. bidest auf 31 μ l aufgefüllt, 5 μ l Nukleotidstartermoleküle (Nonamere) hinzugegeben und der Ansatz für 10 min bei 100°C (Wasserkocher) denaturiert. Der Ansatz wird zur Anlagerung der Startermoleküle auf RT abgekühlt und mit 10 μ l Markierungspuffer (dATP, dGTP, dTTP in Tris-HCl mit 2-Mercaptoethanol und Magnesiumchlorid), 2 μ l Klenow-DNS-Polymerase-Fragment [1 Enzymeinheit/ μ l] und 2 μ l α -³²P-dCTP versehen. Es erfolgt eine Inkubation von 30-45 min bei 37°C, in der das Klenow-Fragment die freien 3'-Enden der Startermoleküle unter Einbau der radioaktiv markierten Nukleotide komplementär zum jeweiligen Sonden-DNS-Strang verlängert. Nach der Markierung werden dem Ansatz 150 μ l TE-Puffer zugegeben und nichteingebaute Nukleotide und Startermoleküle wie unter 3.I.8.2 beschrieben, entfernt. Die Aktivität wird durch Vermessen von 2 μ l der aufgereinigten Sonde im Szintillationszähler bestimmt. Für Hybridisierungen in einem Volumen von 10 ml sollte die Gesamtaktivität mindestens 1×10^6 Zerfallsereignisse pro Minute betragen. Die Sonde wird bis zur Hybridisierung in einem Bleigefäß bei 4°C aufbewahrt.

3.I.7.2 Abtrennung freier Nukleotide durch Gelfiltrationschromatographie

In Reaktionsansätzen verbleibende, freie Nukleotide können mittels Gelfiltrationschromatographie von Polynukleotiden abgetrennt werden. Das Prinzip dieser Technik beruht auf dem Zurückhalten von Molekülen kleiner Größe in den Poren der hydratisierten Polymermoleküle der Säulenmatrix. Die Fraktion der höhermolekularen Probenbestandteile kann nicht in diese Poren eindringen und passiert die Säule schneller. Herstellung von Sephadex G-50-Säulen: Der Auslauf einer 1 ml Einmalspritze wird mit silikonisierter Glaswolle (ohne Silikonisierung würde DNS an die Glaswolle binden) verstopft und die Kanüle mit der Sephadex G-50-Lösung luftblasenfrei gefüllt. Die Säule wird in ein 13 ml Reaktionsgefäß gestellt, wobei die Spitze der Spritze in einem offenen 2 ml Reaktionsgefäß steckt. Unmittelbar vor Aufbringen des Sondenmarkierungsansatzes wird die Säule durch 5-minütiges Zentrifugieren (RT; 1500 x g) verdichtet. Das 2 ml Reaktionsgefäß mit dem abzentrifugierten TE-Puffer wird gegen ein neues 2 ml Reaktionsgefäß ausgetauscht, die Säule mit dem aufgetragenen Markierungsansatz hineingestellt und für 5 min bei 1500 x g zentrifugiert. Die im Reaktionsgefäß aufgefangenen, radioaktiv markierten Sonden-Polynukleotide werden weiterverwendet, die Säule mit den abgetrennten freien und niedermolekularen Oligo-Nukleotiden entsorgt.

3.I.7.3 Hybridisierung von membrangebundenen Nukleinsäuren mit markierten Sonden

Vorhybridisierung:

Die Nylonmembran mit gebundenen Nukleinsäuren wird mit der DNS/RNS-Seite nach innen gerollt und in eine Hybridisierungsröhre gelegt. Für die verwendeten Membranen von 12 x 14 cm werden Hybridisierungsröhren mittlerer Größe verwendet. Es werden 10 ml auf 42°C erwärmte Hybridisierungslösung und 50 µl denaturierte, gescherte Heringssperma-DNS hinzugefügt. Letztere dient zur Verminderung unspezifischer Bindungen der markierten Sonde ("Blockieren") an die Membran. Die Vorhybridisierung erfolgt für 3 bis 18 h bei 42°C.

Hybridisierung:

Die Prähybridisierungslösung wird durch 10 ml auf 42°C erwärmte Hybridisierungslösung ausgetauscht. Denaturierte markierte Sonden- und Heringssperma-DNS (100°C, 10 min) werden hinzugefügt. Die Hybridisierung erfolgt für 16 bis 24 h bei 42°C im Rollinkubator.

3.I.7.4 Waschen

Die Hybridisierungslösung wird entsorgt und die Membran zunächst für 10 min bei 42°C mit 2 fach SSC / 0.1% SDS in der Hybridisierungsröhre gewaschen. Anschließend erfolgen mehrer Waschschrte mit abnehmender SSC-Konzentration in verschließbaren Plastikschüsseln bei 60°C (Wasserschüttelbad) zur Entfernung unspezifisch gebundener und überschüssiger Sonde.

15 min	2,0 x SSC/ 0,1% SDS
2 x 15 min	1,0 x SSC/ 0,1% SDS
2 x 10 min	0,5 x SSC/ 0,1% SDS
2 x 10 min	0,2 x SSC/ 0,1% SDS
2 x 5 min	0,1 x SSC/ 0,1% SDS

Das Waschen wird beendet, wenn weder die Aktivität der Membran weiter abnimmt, noch die Waschlösung messbare Strahlung aufweist. Die Aktivität der Membran wird ab dem ersten Waschschrte bei einer 0,5x SSC-Konzentration gemessen und anschließend wird jeweils entschieden, ob weiter Waschschrte durchgeführt werden. Der Membran wird nach Beenden des Waschens luftblasenfrei in Plastikfolie eingeschweißt.

3.I.7.5 Autoradiographie

Die eingeschweißte Membran wird zwischen zwei Röntgenfilmen (Röntgenfilm X-OMAT AR; Kodak) in einer Filmkassette bei -70°C gelagert. Der obere Film wird nach 1 Tag Exposition entwickelt, der untere, je nach Signalstärke des ersten Films, nach 2 bis 28 Tagen. Anhand der Taschenmarkierung auf dem Filter und der Lage der Signale kann die Größe der Fragmente bestimmt werden.

3.I.8 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis und Falona, 1987) stellt eine *in vitro*-Methode zur gezielten Vervielfältigung von DNS-Sequenzen dar. Sie nutzt basale Mechanismen der DNS-Replikation: durch ausgewählte Startermoleküle wird eine einzelsträngige DNS-Matrize von einem festgelegten Startpunkt aus mittels einer DNS-Polymerase verlängert. Nach Hybridisierung von denaturierter Matrizen-DNS und Startermolekül, verlängert die DNS-Polymerase die Startermoleküle am 3' Ende. Durch die Wiederholung von Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Synthesephasen in kurzen Abständen (PCR-Maschine), kommt es bevorzugt zur exponentiellen Vervielfältigung der DNS-Sequenz, die von den gewählten Startermolekülen begrenzt wird. Auf

Grund der für die Denaturierung und spezifische Hybridisierung nötigen hohen Temperaturen, nutzt man für die PCR DNS-Polymerasen aus thermophilen Bakterien. Eine PCR-Reaktion sollte möglichst spezifisch (Amplifikation von nur einem Produkt) und effizient (viel Produkt innerhalb weniger Amplifikationszyklen) sein.

3.1.8.1 Erzeugung der *cx43K258stop* Mutation (hier: Verwendung als interne Sonde)

Durch Verwendung geeigneter Startermoleküle können genetische Veränderungen in genomische DNS eingebracht werden. Hier erfolgte das Einbringen der *cx43K258stop* Mutation durch den Austausch eines Adenins durch ein Thymin an Position 772 der kodierenden Region des *cx43* Gens (Startermolekül 43-trun-04). Zudem wird unmittelbar hinter dem neu erzeugten Stop-Kodon eine *Cla* I Restriktionsendonuklease Erkennungsstelle eingebracht. Dieses PCR-Produkt wird für die Herstellung des Zielgenvektors *Cx43K258stop* und als internen *cx43* Sonde in Southern Blot-Hybridisierungen eingesetzt.

Tabelle 3.6: Erzeugung der veränderten kodierenden *cx43* Region

PCR-Ansatz (2 µl <i>G143</i> + 48 µl):	PCR-Programm (Cloning <i>Cx43K258stop</i>):				<i>cx43K258stop</i> - Amplikon: 770 bp
	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	
21,6 µl H ₂ O	1	94°C	5 min	1	
5,0 µl 10x PCR-Puffer	2	94°C	15 sec	25	
5,0 µl 25 mM MgSO ₄	3	60°C	30 sec	25	
4,0 µl 10 mM dNTP-Mix	4	72°C	45 sec	25	
0,2 µl P1 43-trun-03	5	72°C	5 min	1	
0,2 µl P2 43-trun-04	6	8°C	∞	1	
1,0 µl Pwo-Polymerase					

3.1.8.2 Nachweis von einzelnen DNS-Sequenzabschnitten in heterologen Nucleinsäuregemischen:

Durch sequenzspezifische Amplifikation können einzelne DNS-Sequenzabschnitte in heterologen Nucleinsäuregemischen nachgewiesen werden. Bei dieser Anwendung der PCR müssen die begrenzenden Abschnitte der zu amplifizierenden Sequenz bekannt sein. Aus diesem Bereich werden die Startermoleküle gewählt. Die Proben werden nach der Reaktion gelelektrophoretisch analysiert.

Tabelle 3.2: Nachweis der homologen Rekombination von *cx43K258stop* in ES-Zellen

PCR-Ansatz (25 µl DNS + 25 µl):	PCR-Programm (<i>Cx43K258stop</i>):				<i>cx43WT</i> -Amplikon: 2,4 kb <i>K258stop</i> -Amplikon: 2,0 kb
	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	
16,6 µl H ₂ O	1	96°C	10 min	1	
5,0 µl 10x PCR-Puffer	2*	90°C*	∞*	1	(„Hot-start“-PCR. 25 µl
4,0 µl 25 mM MgCl ₂	3	94°C	1 min	40	Proteinase K enthaltendes DNS-
1,0 µl 10 mM dNTP-Mix	4	66°C	1 min 30 sec	40	Lysat wird zunächst 15 min
0,2 µl P1 TV43tr-HO	5	72°C	2 min	40	hitzeinaktiviert, bevor der
0,2 µl P2 TV43WT-RO	6	72°C	10 min	1	Reaktionsmix bei 90°C
0,5 µl Taq-Polymerase	7	4°C	∞	1	zugegeben (markiert mit *) und
					die PCR fortgesetzt wird.

Tabelle 3.3: Nachweis des *cx43K258stop* Allels in genomischer DNS transgener Mäuse

PCR-Ansatz (2 µl DNS + 23 µl):		PCR-Programm (KAMA):				<i>cx43WT</i> -Amplikon: 800 bp <i>K258stop</i> -Amplikon: 400 kb
		Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	
17,1 µl	H ₂ O	1	95°C	5 min	1	
2,5 µl	10x PCR-Puffer	2	94°C	30 sec	40	
2,0 µl	25 mM MgCl ₂	3	62°C	45 sec	40	
0,5 µl	10 mM dNTP-Mix	4	72°C	1 min	40	
0,2 µl	P1 Cx43delCT-HO3	5	72°C	10 min	1	
0,2 µl	P2 delCT-RO	6	8°C	∞	1	
0,5 µl	Taq-Polymerase					

Tabelle 3.4: Nachweis des *cx43WT* Allels in genomischer DNS transgener Mäuse

PCR-Ansatz (2 µl DNS + 23 µl):		PCR-Programm (KAMA):				<i>cx43WT</i> -Amplikon: 381 bp
		Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	
17,35 µl	H ₂ O	1	95°C	5 min	1	
2,5 µl	10x PCR-Puffer	2	94°C	30 sec	40	
1,75 µl	25 mM MgCl ₂	3	62°C	45 sec	40	
0,5 µl	10 mM dNTP-Mix	4	72°C	1 min	40	
0,2 µl	P1 Cx43-HO2	5	72°C	10 min	1	
0,2 µl	P2 Cx43-RO4	6	8°C	∞	1	
0,5 µl	Taq-Polymerase					

Tabelle 3.5: Nachweis des *cx43del* Allels in genomischer DNS transgener Mäuse

PCR-Ansatz (2 µl DNS + 23 µl):		PCR-Programm (KAMA):				<i>cx43del</i> -Amplikon: 700 bp
		Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	
15,2 µl	H ₂ O	1	94°C	2 min	1	
2,5 µl	10x PCR-Puffer	2	92°C	1 min	35	
4,0 µl	25 mM MgCl ₂	3	65°C	1 min	35	
0,4 µl	10 mM dNTP-Mix	4	72°C	1,5 min	35	
0,2 µl	P1 43del-forward	5	65°C	2 min	1	
0,2 µl	P2 43del-reverse	6	72°C	10 min	1	
0,5 µl	Taq-Polymerase	7	8°C	∞	1	

3.II.1 Herstellung kompetenter Bakterien

E. coli Bakterien sind in seltenen Fällen in der Lage, DNS aus dem Kulturmedium durch Zellwand und -membran hindurch aufzunehmen (Transformation). Durch besondere Behandlungen von *E. coli* Bakterien des Stamms XL I blue (nach Hanahn, 1983), kann die Effizienz dieses Prozesses um ein Vielfaches gesteigert werden. Die Bakterien werden dann als (transformations-) kompetent bezeichnet.

Von einer einzelnen XL I blue-Bakterienkultur werden 2,0 ml YT⁺⁺ Kultur inokuliert und üN kultiviert (225 Upm; 37°C). Eine ¹/₁₀₀ Verdünnung der Kultur wird durch 1,5-3,5 h Inkubation bei 37°C in die exponentielle Phase des Wachstums gebracht. Diese Vorkultur wird zu 100 ml vorgewärmten YT⁺⁺ Medium pipettiert und die Hauptkultur wird bis zu einer Optischen Dichte_{600nm} von 0,45 bis 0,55 aufgezo-gen. Die Kultur wird in zwei 50 ml Schraubdeckelgefäße überführt, auf Eis gestellt und nach 5 min sedimentiert (5 min, 4°C, 6000 x g). Alle folgenden Arbeitsschritte werden im Kühllabor mit vorgekühlten Lösungen bei 4°C durchgeführt. Das Sediment wird in 10 ml Transformationspuffer I resuspendiert (Strudelmischer), 10 min auf Eis inkubiert und erneut

sedimentiert (5 min, 4°C, 6000 x g). Die sedimentierten Bakterien werden in je 2 ml Transformationspuffer II resuspendiert (Strudelmischer) und je 100 µl in vorgekühlte 1,5 ml Schraubdeckelgefäße gefüllt. Die Bakterien werden sofort schockgefroren (in Methanol/Trockeneis oder in flüssigem Stickstoff) und bei -70°C gelagert.

3.II.2 Transformation kompetenter Bakterien mit zirkulärer Plasmid-DNS

100 µl auf Eis aufgetauter kompetenter Bakterien werden für eine Transformation eingesetzt. Die Bakterien werden zur DNS gegeben, durchmischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Darauf erfolgt ein Hitzstoß bei 42°C für 1½ min. Die Ansätze werden auf Eis abgekühlt, jeweils 900 µl vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben und die Ansätze für 45-60 min bei 37°C inkubiert (225 Upm). Anschließend werden die Transformationsansätze auf LB-Nährboden mit Ampicillin ausplattiert. Zunächst werden 150 µl ausplattiert, anschließend werden die restlichen Bakterien sedimentiert, in 50 µl Überstand resuspendiert und auf einem weiteren Nährboden ausplattiert. Die Inkubation der Selektionsnährböden erfolgt für 12-20 h bei 37°C.

3.III Methoden der Zellkultur

3.III.1 Zellkultur von ES-Zellen

Die Kultivierung embryonaler Stammzellen der Maus der Linie HM1 erfolgt in Heraeus-Inkubatoren in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Alle Zentrifugationen erfolgten bei 1200 x g für 5 min bei RT. Die unter der Sterilbank erfolgenden Arbeiten werden mit Ausnahme der verwendeten Glas-Pasteur-Pipetten mit Einmal-Plastik-Materialien durchgeführt. Die HM1-Zellen werden auf Gelatine-beschichteten Kulturschalen kultiviert. Dazu werden die jeweiligen Kulturflächen vor dem Aussäen der Zellen mit 0,1% Gelatine beschichtet, überschüssige Gelatine wird nach 10 min entfernt.

3.III.1.1 Auftauen von ES-Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Ampullen mit gefrorenen Zellen werden schnell auf 37°C erwärmt (Wasserbad). Die Zellsuspension wird zu 9 ml vorgewärmtem Normalmedium gefüllt, durchmischt und sofort sedimentiert. Das Zellsediment wird in einem angemessenen Volumen Medium resuspendiert und auf eine gelatinisierte Kulturschale gewählter Größe ausgesät.

3.III.1.2 Passagieren von ES-Zellen

Nach vollständiger Abnahme des Kulturmediums wird der Zellrasen zur Entfernung aller Mediumreste zweimal mit PBS⁻ (¹/₃ des Kulturvolumens) gewaschen. Zur Entfernung von PBS⁻-Resten wird der Zellrasen mit Trypsin gewaschen (¹/₇ des Kulturvolumens). Die Zellen werden durch Zugabe von Trypsin (¹/₇ des Kulturvolumens) und 2 bis 5-minütige Inkubation bei 37°C vom Kulturgefäßboden abgelöst und vereinzelt. Letzteres kann durch Schütteln und Klopfen des Kulturgefäßes unterstützt werden. Durch Zugabe von Kulturmedium (dreifache Menge des eingesetzten Trypsins) wird die tryptische Reaktion beendet und die Zellen werden anschließend sedimentiert. Sollen die vereinzelt Zellen unter verschiedenen Bedingungen weiterbehandelt werden, wird die Zellsuspension zuvor im gewählten Verhältnis auf zwei 15 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt.

3.III.1.3 Elektroporation von ES-Zellen zur homologen Rekombination

Eine Methode, um Zellen mit DNS zu transfizieren, ist die Elektroporation. Dabei werden die Zellen einem elektrischen Puls ausgesetzt, wodurch kurzzeitig Poren in der Plasmamembran entstehen, durch die exogene DNS ins Zytosol gelangen kann. Zellen, die diese DNS stabil in ihr Genom integrieren (Potter et al. 1984), können im Folgenden durch geeignete Selektionsbedingungen angereichert werden.

Vorbereitung der zu transfizierenden DNS

250 µg der endotoxinfrei präparierten Zielgenvektor-DNS werden in einem Volumen von 500 µl mit 200 Einheiten der gewählten Restriktionsendonuklease linearisiert. So wird der in der vorliegenden Arbeit verwendete Zielgenvektor *Cx43K258stop* unmittelbar 5' zum Beginn der langen 5' *cx43*-Homologieflanke mittels der Restriktionsendonuklease *Not I* linearisiert. Die DNS wird mittels Natriumacetat gefällt, und bis zum Tag der Elektroporation in 300 µl endotoxinfreiem 70% Ethanol bei -20°C gelagert. Der Ethanol wird unter der Sterilbank abgenommen, die DNS luftgetrocknet und in 100 µl sterilfiltriertem, endotoxinfreiem TE-Puffer gelöst.

Vorbereitung der Ausgangszellen

Für eine effiziente Transfektion mit 250 µg DNS sollten zwischen 20 und 35 Millionen Zellen für eine Elektroporation eingesetzt werden. Dazu wird Ausgangszellklon 53 mit Normalmedium bis auf T75-Kulturkolben expandiert. Am Tag der Elektroporation werden die Zellen vom Kulturgefäßboden gelöst und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Die vereinzelt Zellen werden sedimentiert und in 700 µl sterilem HPS⁻ aufgenommen.

Elektroporation

Die Zellsuspension wird mit der linearisierten DNS vermischt und in eine Elektroporationsküvette (4 mm, AGS) überführt. Die Elektroporation wird für 0,1 sec bei 3,0 µF und 0,8 kV durchgeführt. Die Zellen werden im Anschluß unter der Sterilbank für 10 min bei RT inkubiert.

3.III.1.4 Selektion und Expansion von 6-Thioguanin resistenten ES-Zellklonen

Da die homologe Rekombination in Fall des zweiten Schrittes des doppelten Genersatzes in HM1-Zellen zum Verlust des *hprt*-Minigens führen soll, wird im Folgenden gegen dieses Enzym des Purin-Wiederverwertungsweges selektioniert. Zur Erhöhung der Ausbeute an nicht-identischen ES-Zellklonen werden die elektroporierten Zellen direkt nach der Transfektion in sechs Unterchargen (α , β , γ , δ , ϵ und π) aufgeteilt und im Weiteren getrennt voneinander expandiert, bzw. der Selektion ausgesetzt. Die Selektion zur Anreicherung homolog rekombinierter ES-Zellklone ist eine Negativselektion auf das HPRT-Protein. Da die *hprt*-mRNA über mehrere Tage stabil ist, wird die Selektion mittels 6-Thioguanin erst nach fünf Tagen begonnen. Um die Ausbeute an 6-Thioguanin resistenten Klonen nicht durch Gap Junction-vermittelten Bystander-Effekt zu verringern, werden auf einer Selektionsschale (10 cm Kulturschale) maximal 3,0 Millionen Zellen ausgesät. Hierdurch umgeht man das Absterben homolog rekombinierter Klone, welche noch die über mehrere Tage stabile mRNS des *hprt*-Minigens exprimieren. Am Tag 5 nach der Elektroporation werden die Zellen auf 10 cm-Kulturschalen ausgesät und unter 6-Thioguanin-Selektion gesetzt. Das Selektionsmedium wird erstmals 4 Tage nach dem Aussäen gewechselt, dann jeden dritten Tag. Die Selektionsbedingungen werden für die isolierten Klone bis zum Einfrieren aufrechterhalten, wobei das Medium ab der Isolierung jeden Tag gewechselt wird. Die auf die Vertiefung von 48-Loch-Kulturschalen isolierten ES-Zellklone werden jeweils über 4-6 Passagen bis auf 10 cm-Kulturschalen und T25-Kulturkolben expandiert.

3.III.1.5 Isolierung von ES-Zellklonen

Die Isolierung von ES-Zellklonen erfolgt halbsteril unter Beobachtung mit einem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung mittels Kolbenhubpipette. Ein Klon wird durch vorsichtiges Schaben mit der Pipettenspitze am Rand der Kolonie vom Boden des Kulturgefäßes gelöst, in einem Volumen von 150 µl aufgesogen und in die Vertiefung einer 48-Loch-Schale überführt. Durch Mischen wird die Kolonie gut vereinzelt. Die Kulturvertiefung wird schließlich mit frischem Selektionsmedium aufgefüllt.

3.III.1.6 Einfrieren von ES-Zellen

Hierzu werden die Zellen vereinzelt, sedimentiert und in 1¹/₂ ml bzw. 3 ml Medium resuspendiert. Es wird das gleiche Volumen Einfrier-Medium (2x) zugefügt und die Zellsuspension zu je 1 ml in 3 oder 6 Einfrierampullen aufgeteilt. Die Zellen werden mittels des 1°C/min Einfriersystems (Nalgene) schonend eingefroren. Die Zellen werden hierbei zunächst für 24 h in 2-Propanol bei –70°C schonend eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert. Alternativ werden Zellen auf Eis transportiert und mittels Einfrierstutzen direkt in der Stickstoff-Gasphase eingefroren.

3.III.1.7 Karyotyp-Bestimmung

Zur Gewinnung möglichst vieler Metaphasen-Chromosomen nutzt man die Wirkung des Alkaloids Colchicin: es verhindert die Verlängerung von Mikrotubuli und somit auch die Ausbildung des Spindelapparates (“Spindelgift”), ohne sich auf den Kondensationsgrad der Metaphasenchromosomen auszuwirken. Die anschließende Behandlung mit hypotoner Salzlösung führt zum Quellen der Zellen, so dass die Zellen durch Auftropfen aus größerer Höhe auf den Objektträgern aufplatzen und die freiliegenden Chromosomen nach Anfärbung mikroskopisch analysiert werden können. Das Medium eines konfluenten T25-Kulturkolbens wird gegen 2 ml Demecolcine-Medium ([100 pg/ml]; Sigma) ausgetauscht. Nach 50 minütiger Inkubation (5% CO₂, 37°C) werden die Zellen vereinzelt und sedimentiert. Die Zellen werden in 4 ml 0,56% KCl-Lösung resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach Sedimentierung werden die Zellen in 2 ml eiskaltem Methanol/Eisessig [3:1] gelöst, 5 min bei RT inkubiert und erneut sedimentiert. Dies wird dreimal wiederholt, danach werden die in 1 ml Methanol/Eisessig gelösten Zellen aus 50 cm Höhe auf entfettete Objektträger getropft. Nach Lufttrocknung erfolgt die Färbung der Chromosomen mittels Giemsa-Lösung. Nach 2-minütiger Inkubation in der Färbelösung werden die Objektträger zweimal für 2 min in A. bidest differenziert. Die getrockneten Präparate werden mit 3 Tropfen Corbit-Balsam (Hecht) versehen und mit Deckgläschen versiegelt. Die Auswertung der Präparate erfolgt am Zeiss-Axiophot unter 630 facher Vergrößerung. Aufnahmen werden mittels des Computerprogramms KS100 (Zeiss) gespeichert und computergestützt ausgewertet (Corel Photo-Paint 8.0).

3.III.2 Zellkultur von HeLa-Zellen

Die Kultivierung von HeLa-Zellen erfolgt in Heraeus-Inkubatoren in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 10 % CO₂-Gehalt. HeLa-Zellen werden auf unbeschichteten Kulturschalen kultiviert.

3.III.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

HeLa-Wildtyp Zellen werden in D10-Medium gehalten, welches alle 2-4 Tage gewechselt wird, wobei meist nach dieser Zeit auch ein Vereinzeln der Zellen durchgeführt wird. Vereinzelt werden

HeLa-Zellen bei einer Konfluenz von etwa 90% durch Trypsinierung und anschließende Ausplattierung in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:10. Dazu wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und anschließend etwa $\frac{1}{10}$ des Kulturvolumens an HeLa-Trypsin zugegeben. Nach einer Inkubation von 2 min bei 37°C wird das Trypsin durch Zugabe von D10-Medium inaktiviert und die sich in Suspension befindlichen Zellen in der entsprechenden Verdünnung neu ausplattiert. Die neuen Kulturschalen werden anschließend mit frischem HeLa-D10-Medium auf das entsprechende Kulturvolumen aufgefüllt.

3.III.2.2 Einfrieren von HeLa-Zellen

Zum Einfrieren von Kulturzellen werden die Zellen einer 10 cm Schale nach dem Trypsinieren in 10 ml Medium aufgenommen und in 15 ml Röhrchen überführt. Diese Suspension wird zentrifugiert (5 min, 800 Upm, RT) und die sedimentierten Zellen in 900 µl frischem D10-Medium aufgenommen und resuspendiert. Diese Suspension wird zu in einer beschrifteten Einfrierampulle vorgelegten 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) pipettiert und nach Verschließen der Ampulle kurz gemischt. Mit der Ampulle wird genauso verfahren, wie für ES-Zellen beschrieben. Auch das Auftauen erfolgt wie oben beschrieben, nur dass die für HeLa-Zellkultur spezifischen Medien verwendet werden.

3.III.2.3 Stabile Transfektion von HeLa-Wildtyp Zellen

HeLa-Wildtyp Zellen werden mit Hilfe der Lipofektion stabil transfiziert. Hierzu wird TfxTM verwendet, eine Mixtur synthetischer, kationischer Lipidmoleküle, welche mit Plasmid-DNS in wässriger Phase mit DNS beladene Micellen ausbilden. Diese können mit der Plasmamembran verschmelzen, wobei der DNS-Inhalt durch Endozytose ins Zellinnere und schließlich in den Zellkern gelangen kann. 10 µg linearisiertes Plasmid werden in 6 ml serumfreies D10-Medium pipettiert und gründlich vermischt. Hierzu werden 60 µl Tfx-20 (Promega) pipettiert und der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert. Parallel wird das Medium von den zu transfizierenden Zellen entfernt und der zu 40-60% konfluente Zellrasen mit PBS⁻ gewaschen. Hierauf wird der DNS/Tfx-20/D10-Medium-Ansatz gegeben und für 45 min inkubiert (10% CO₂, 37°C). Anschließend werden weitere 6 ml D10-Medium zugefügt und die Zellen für 24h inkubiert (10% CO₂, 37°C). Die Zellen werden am folgenden Tag im Verhältnis 1:3–1:10 auf Kulturschalen vereinzelt und einer Puromyzin-Selektion ausgesetzt. Zellklone, welche die Plasmid-DNS stabil ins Genom integriert haben, können so auf Grund des vorhandenen Puromyzin-Selektionsgens nach ca. 2 Wochen isoliert werden.

3.III.2.4 Analyse der Kopplung zwischen Connexin-exprimierenden HeLa-Zellen

Diese Analysen wurden entsprechend den Angaben von Goldberg et al. (1995) durchgeführt. Zusammengefasst werden zunächst die hinsichtlich ihrer Kopplungseigenschaften zu untersuchenden HeLa-Connexin Transfektanten nach Trypsinierung in Suspension mit dem Farbstoff DiI (Molecular Probes) sowie einem Calceinester (Molecular Probes) inkubiert. Beide Stoffe können passiv die Lipiddoppelschicht durchdringen. Hiernach wird jedoch DiI in die Plasmamembran eingelagert, während der Calceinester durch zytosolische Esterasen zum fluoreszierenden, membranimpermeablen Calcein umgesetzt wird. Dieser Farbstoff kann durch die meisten Gap Junction Kanäle passiv diffundieren. Die markierten Zellen werden im Verhältnis 1:1000 auf unmarkierte Zellrasen von HeLa-Wildtyp und HeLa-Connexin Transfektanten ausgesät. Findet eine funktionale, Gap Junction vermittelte Kopplung statt, kann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops die Ausbreitung von Calcein von gleichzeitig markierten DiI-positiven Zellen zu unmarkierten Empfängerzellen des Zellrasens dokumentiert werden. Um die Ausbildung

von Gap Junction Kanälen zwischen ausgesäten Zellen und den Zellen des empfangenden Zellrasens zu ermöglichen, werden die Ansätze vor der Fluoreszenzmikroskopie-gestützten Auswertung zunächst mindestens 2 h im Brutschrank (10% CO₂, 37°C) inkubiert.

3.IV Erzeugung, Haltung und Handhabung transgener Mäuse

Die in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden nach den Vorgaben des geltenden Tierschutzgesetzes nach vorheriger Genehmigung durch die Bezirksregierung Köln durchgeführt (Aktenzeichen 23.203.2 BN 49, 28/94 und 15/96 sowie 50.203.2 BN 49, 32/01 mit dem Titel „Untersuchung des Einflusses defekter interzellulärer Kommunikation auf die Tumorentstehung, Organentwicklung und Physiologie von Mäusen“). Zur Organentnahme werden adulte Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, Neugeborene und bis zu zwei Wochen alte Tiere dekapitiert oder durch Isofluran-Inhalation getötet. Die isolierten Organe werden nach Entnahme entweder auf Trockeneis oder in flüssigem Stickstoff eingefroren oder sofort unter Verwendung verschiedener Methoden fixiert.

3.IV.1 Zucht- und Haltungsbedingungen von Mäusen

Die Mäuse werden in offenen Tierställen bei einem über das Jahr konstanten Licht-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Die für die jeweiligen Käfiggrößen vorgesehenen Besatzdichten werden eingehalten und die Tiere zweimal wöchentlich in saubere Käfige umgesetzt. Für die Bestimmung des embryonalen Entwicklungsstadiums wird von einer Kopulation zur Mitte der Dunkelphase ausgegangen. Verpaarungen werden durch die gemeinsame Haltung eines Männchens mit 1-2 Weibchen in einem Käfig angesetzt. Erfolgreiche Verpaarungen werden zu Beginn der nächsten Lichtphase anhand eines als Vaginalpfropf in der Vagina des Weibchens verbliebenen Ejakulats erkannt. Die Mitte der Lichtphase nach der Kopulation wird als 0,5 dpc (*dies post coitum*) definiert.

3.IV.2 Superovulation von C57BL/6 Spenderweibchen

Durch diese Hormonbehandlung wird eine vermehrte Follikelreifung und ein koordinierter Eisprung induziert und es können bis zu 20 Blastozysten aus einem stimulierten Weibchen isoliert werden. Hierzu werden Weibchen vor Einsetzen des natürlichen Zyklus im Alter von 4 Wochen verwendet. Zur Mitte des Lichtzyklus werden je Weibchen 100 µl FSH-Lösung (5 U) intraperitoneal injiziert. Etwa 47 Stunden später wird der Eisprung durch eine intraperitoneale Injektion von 100 µl hCG-Lösung (5 U) synchron ausgelöst. Anschließend werden die so behandelten Weibchen für eine Verpaarung eingesetzt und der Verpaarungserfolg am nächsten Morgen bestimmt.

3.IV.3 Injektion von ES-Zellen in Blastozysten und Retransfer in scheinchwangere Weibchen

Die Erzeugung transgener Mäuse aus embryonalen Stammzellen erfolgte mittels der Technik der Blastozysten-Injektion (Nagy et al., 2003; früher Hogan et al., 1994). Superovulierte C57BL/6-Weibchen (schwarze Fellfarbe) werden mit C57BL/6 Männchen verpaart und die Blastozysten 3,5 Tage nach der Kopulation isoliert. In die isolierten Blastozysten werden unter einem Mikroskop homolog rekombinierte HM1-ES-Klon-Zellen (aus Blastozysten „agouti“-farbener Mäuse stammend) injiziert. Diese injizierten Blastozysten werden in den Uterus von scheinchwangeren NMRI-Weibchen (weiße Fellfarbe) operativ implantiert, die diese manipulierten Embryonen austragen und die resultierenden Jungtiere großziehen. Scheinchwangere Weibchen werden durch

Verpaarung mit vasktomierten und daher sterilen Männchen erhalten. Diese Versuche wurden durchgeführt von Ina Fiedler.

3.IV.4 Überprüfung der Keimbahngängigkeit

Je nach Beteiligung der ES-Zellen an der Entwicklung des Embryos entstehen mehr oder weniger mosaikartige, chimäre Mäuse, wobei das Verhältnis von agoutifarbenem zu schwarzem Fell eine Auskunft über den Chimärismusgrad gibt. Chimären mit einem >70 % Agoutianteil werden mit C57BL/6 Mäusen verpaart, um bei Keimbahngängigkeit der ES-Zellen in der Hälfte der agoutifarbenen Nachkommen das homolog rekombinierte Transgen zu erhalten. Die in den ES-Zellen vorliegenden agouti-Allele wirkt gegenüber den Fellfarb-Allelen des C57BL/6-Stammes dominant. Die Keimbahngängigkeit kann folglich an agoutifarbenen Nachkommen aus dieser Kreuzung erkannt werden. Mit diesen Nachkommen können durch gezielte Verpaarungen transgene Mauslinien etabliert werden.

3.IV.5 Zucht homozygot mutierter Mäuse

Die agouti-farbene Nachkommenschaft aus Verpaarungen zwischen keimbahngängigen Chimären und C57BL/6 Mäusen wird mittels PCR-Analyse auf die heterozygote Anwesenheit des Transgens überprüft. Hierfür werden den Tieren im Allgemeinen nach der Entwöhnung, im Alter von 4 –5 Wochen, kleine Stücke der Schwanzspitze entfernt und hieraus die genomische DNS isoliert. Nach der Verpaarung heterozygot mutierter Mäuse untereinander sollten entsprechend der Medelianischen Aufspaltungsregel zu 50% heterozygot mutierte und jeweils 25% Wildtyp und homozygot mutierte Mäuse hervorgehen. Tritt diese Verhältnis nach der Geburt einer statistisch relevanten Anzahl von Jungtieren nicht auf, bzw. werden kaum oder keine adulten homozygoten Tiere erhalten, müssen unmittelbar postnatale Tiere oder embryonale Tiere charakterisiert werden, um den Zeitpunkt des Todes homozygoter Tiere zu ermitteln. Hierzu werden verpaarte heterozygote Weibchen hinsichtlich der Begattung kontrolliert und eine einsetzende Schwangerschaft über Gewichtskontrolle festgestellt. Bei postnatal letalen Phänotypen werden die Tiere eines Wurfes unmittelbar nach der Geburt individuell mittels Filzschreiber markiert, Gewichtsveränderungen mehrfach täglich dokumentiert und von gestorbenen Tieren sowie von überlebenden Tieren vor Auswachsen des Felles (nach ca. 5 Tagen) Proben für die PCR-Analytik genommen. Bestätigt sich ein postnatal lethaler Phänotyp können PCR-Analysen auch schon über Schwanzspitzen-DNS der neugeborenen Tiere durchgeführt und homozygote Tiere teilweise vor ihrem Tod identifiziert werden. Ermittelt sich ein pränatal lethaler Phänotyp werden schwangere heterozygote Mütter zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Gestation getötet, Embryonen isoliert und die PCR-Analytik anhand der Emryonalhüllen der individuellen Tiere durchgeführt.

3.V Funktionale Analysen an transgenen Tieren *in toto*

3.V.1 Analyse der Funktionalität der epidermalen Barriere von neonatalen Tieren

Die epidermale Barriere wird durch terminal differenzierte Keratinozyten ausgebildet und ist lebenswichtig für das Leben *ex utero*, da sie das Austrocknen und zugleich das Eindringen toxischer Stoffe und Mikroorganismen über die Körperoberfläche verhindert. Die Unversehrtheit dieser Barriere kann über das nicht erfolgende Eindringen von Farbstoffen / Farbstoffvorläufern funktional überprüft werden.

3.V.1.1 Analyse der Toluidinblau-Penetration

Diese Analyse wird modifiziert nach Hardman et al. (1998) durchgeführt. Neugeborene Tiere im Alter von 1-4 Tagen werden durch Isofluran Inhalation getötet und Schwanzspitzen für PCR-Analytik abgetrennt. Die Tiere werden in einer aufsteigenden Methanol-Serie inkubiert (Verdünnungen in PBS⁻, 25%, 50%, 75% und 100%, jeweils 1 min), 1 min in PBS⁻ äquilibriert und dann für 15 min in 0,2% Toluidinblau (in Wasser gelöst) gefärbt. Hiernach werden die Tiere jeweils dreimal für 1 min in 90% Ethanol und danach kurz in Wasser gewaschen. Penetration der epidermalen Barriere, sichtbar durch deutliche Blaufärbung, wird sofort mittels einer Digitalkamera, montiert auf einem Binokular, dokumentiert.

3.V.1.2 Analyse der X-Gal Penetration

Diese Analyse wird modifiziert nach Hardman et al. (1998) durchgeführt. Statt unfixierter Tiere wurden hier Tiere verwendet, die zuvor schon hinsichtlich der Toluidinblau-Penetration durch die epidermale Barriere analysiert worden waren. Die Tiere werden zunächst zur Auswaschung der Ethanol, in dem die Tiere gelagert worden waren, 3 mal für 20 min in LacZ-Waschlösung inkubiert. Hiernach werden die Tiere üN bei 37°C lichtgeschützt in LacZ-Substratlösung inkubiert. Bei Durchdringen der epidermalen Barriere wird das in der LacZ-Substratlösung enthaltene X-Gal bei niedrigem pH-Wert durch die zahlreich in der Epidermis vorkommenden endogenen β -Galactosidasen in ein blaues Präzipitat umgesetzt. Am nächsten Morgen werden die Tiere hinsichtlich ihrer Blaufärbung photographisch mittels einer auf ein Binokular, montierten Digitalkamera dokumentiert.

3.V.2 EKG Messungen an transgenen Tieren

Als EKG versteht man das im zeitlichen Verlauf aufgezeichnete Kurvenabbild der bioelektrischen Potentiale, bzw. Potentialdifferenzen, die bei Erregungsausbreitung und -rückbildung im Herzen entstehen. Die Ableitung dieser Potentiale erfolgt mit Hilfe von Elektroden von der Körperoberfläche oder durch eingebrachte Elektroden direkt vom Herzen. Das gewonnene Kurvenbild wird durch zahlreiche diagnostisch auswertbare Faktoren beeinflusst und lässt Rückschlüsse auf Erregungsbildungs-, Erregungsleitungs- und Erregungsrückbildungsstörungen zu.

3.V.2.1 EKG-Messungen an neonatalen Tieren

Neonatale Tiere werden nach Hagendorff et al. (1999) EKG Messungen unterzogen. Dazu werden Oberflächen EKGs mit 6 Ableitungen auf einem Mehrkanal-Verstärker aufgezeichnet und in digitale Signale umgewandelt. EKG-Kanäle werden verstärkt, zwischen 10 und 100 Hz gefiltert und mit einer Rate von 1 kHz aufgezeichnet. Serielle EKG Messungen werden von Tieren im Alter

zwischen 1 und 6 Tagen nach der Geburt aufgezeichnet. Hiervon werden spontane Herzzykluslänge, Herzschlagfrequenz, Dauer der P-Welle, PQ-Intervall, QRS-Dauer und QT-Intervall nachträglich (offline) bestimmt. Aus 300 bis 1200 Herzzyklen der 6 Ableitungen werden Signal-gemittelte EKG-Profile (SAECG, Signal averaged ECG) berechnet. Auf dieser Grundlage wurden die im Anschluss beschriebenen Zeiten gemessen. Die QRS Dauer ist das Intervall zwischen Beginn der Q-Zacke und Rückkehr der S-Zacke zur isoelektrischen Linie. Das QT-Intervall wird gemessen als der Zeitraum vom Beginn der Q-Zacke bis zum Ende der T-Welle, definiert als Rückkehr der T-Welle zur Grundlinie. Das QT-Intervall wird nachträglich bezüglich der Herzfrequenz korrigiert (QT_C), entsprechend Mitchell et al. (1998). Diese Analysen wurden zusammen mit Alexander Ghanem (Medizinische Klinik und Poliklinik II, Innere Medizin – Kardiologie/Pneumologie, Bonn) durchgeführt.

3.V.2.2 Telemetrische Langzeit-EKG-Messungen bei adulten Mäusen

Für den operativen Eingriff der Transmitter-Implantation werden Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketamin/Xylazin narkotisiert. Nacken und oberer Rücken werden mittels Epilierungscreme von Haaren vollständig befreit. Durch einen etwa 2 cm langen Querschnitt durch die Nackenhaut und Entfernung störender Ligamente wird der subkutane Bereich für den Einschub des Transmitters freigelegt. Durch kleine Hautschnitte im Bereich der Vorderextremitäten können die Ableitungselektroden von hier aus mittels dünner Pinzetten in die gewünschte Ableitungsposition I (Einthoven et al., 1913) gezogen werden. Die eröffneten Hautregionen werden unter Verwendung nicht resorbierbarer Nähseide vernäht. Nach einer Erholungszeit von 14 Tagen werden Langzeit-EKG-Daten über einen Zeitraum von 24 h am Stück aufgezeichnet. Nach Beendigung einer Messreihe werden die Transmitter wieder aus den Versuchstieren entfernt. Die Säuberung der Ableitungselektroden erfolgt in einem Gemisch aus PCR-Puffer (Promega) und Proteinase K-Stammlösung (10 μ l/500 μ l) bei 55°C üN. Vorbereitete EKG-Transmitter werden zur Sterilisation vor der nächsten Implantation üN in 2 % Glutaraldehyd-Lösung in physiologischer Kochsalzlösung eingelegt. Vor der Implantation werden sie mindestens dreifach für je 60 min in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Während der Messungen werden die Mäuse in einem separaten Raum stressfrei unter einem 12 h hell / 12 h dunkel Rhythmus gehalten. Zur Aufzeichnung der Ableitungen werden Mäuse nach Transmitter-Implantation in ihrem Käfig zur Signalaufnahmen auf eine RPC-1 Empfängerplatte gestellt, die über einen "Analog Output Adapter" an einen Analog-Digital-Wandler angeschlossen wird. Dieser ist an einen Apple Macintosh Rechner mit zugehöriger PowerLab Software angeschlossen. Die EKG-Signale werden mit einer Rate von 1-2 kHz aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgt offline manuell und wurde anschließend von Dr. Harold van Rijen (Utrecht, Niederlande) überprüft. Diese Messungen wurden zusammen mit Dr. Dominik Eckhardt (Institut für Genetik, Bonn) durchgeführt.

3.V.3 Herz-Echokardiographie an adulten transgenen Tieren

Die Echographie nutzt Ultraschall (1-5 MHz) zur Darstellung. Dabei werden gebündelte Ultraschallwellen aus einem Schallkopf als kurze Impulse durch die Haut „eingestrahlt“ und an Haut und Gewebe- bzw. Organschichtgrenzen reflektiert. Diese reflektierten Wellen werden vom piezoelektrischen Empfänger als Echos im Schallkopf aufgenommen, der in Sendepausen gleichzeitig als Empfänger dient. Hier werden die Schallwellen in Elektronenstrahlen umgesetzt und nach Verstärkung auf einem Leuchtschirm, bzw. nach Umwandlung in ein digitales Signal Computer-gestützt aufgezeichnet. Zur Vorbereitung der Echokardiographie werden Mäusen Haare im Bereich des Brusttraumes vollständig mittels Epilierungscreme entfernt. Tiere werden für den Zeitraum der Messungen mit Servoflourane anästhesiert. Ultraschall-Messungen werden im M-(Motions-Modulation: Zeit-Bewegung-Betrieb; spezifische Herzultraschalldiagnostik) und B-

(Brightness-Modulation; zweidimensionale, lichtmodulierte Darstellung des Echos in Form energie- und intensitätsproportionaler, helligkeitsvariabler Lichtpunkte) Modus in der Ebene der Papillarmuskel des linken Ventrikels durchgeführt. Dies wird möglich durch eine in zwei Richtungen erfolgende, schichtweise Abtastung durch zeilenförmige Richtungsänderung des Schallkopfes (Multielement-Transduktor). Hierdurch entsteht sofort ein sichtbares Bild. In der parasternalen Orientierung wird zudem darauf geachtet, dass Aufnahmen in der Ebene der Aortenklappen und in der längsten Herzachse durchgeführt werden. Durchgeführt wurden die Messungen mit einem HDI-5000 Echokardiograph (Philips Medical Systems, Bothell, WA, USA), ausgestattet mit einem 15 MHz-Schallkopf. Diese Analysen wurden durch Dr. Klaus Tiemann (Medizinische Klinik und Poliklinik II, Innere Medizin – Kardiologie/Pneumologie, Bonn) durchgeführt.

3.V.4 Statistische Auswertung

Wenn nicht anders vermerkt, sind die Messdaten als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung oder dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Für die statistischen Auswertungen wird das Programm GraphPad Prism (Graphpad Software Inc.) verwendet. Vergleiche von mehr als zwei unterschiedlichen Gruppen erfolgen mittels Ein-Wege-ANOVA und post-hoc Tuckey Test. In allen Fällen werden Wahrscheinlichkeitswerte von $p < 0,05$ als statistisch signifikant bewertet.

3.VI Histologische und elektronenmikroskopische Analysen

Gewebeproben werden stets aus frisch präparierten Tieren gewonnen. Bei Vergleichen zwischen Tieren verschiedener Genotypen werden Geschwistertiere verwendet.

3.VI.1 Histologische Analysen

3.VI.1.1 Anfertigung von Paraffin-Schnitten

Neonatale oder adulte Gewebe werden entsprechend der Organgröße fixiert. So werden von frisch präparierter Epidermis Dermis-Reste mittels Pinzetten entfernt, die Epidermis wird in PBS⁻ gewaschen und 2 Stunden bei Raumtemperatur in 4% PFA fixiert oder 30 min bei RT in 4% PFA und anschließend üN bei 4°C in 2% PFA. Größere Organe werden *in toto* oder in Teilen üN bei 4°C in 4% PFA, unter Wechsel des Fixans nach 2h, fixiert. So werden adulte Herzen mindestens in 2 Hälften (Längs- oder Querschnitt) geteilt. Am nächsten Tag werden die Proben mehrfach in PBS⁻ gewaschen. ÜN erfolgen Entwässerung und Infiltration mit flüssigem Paraffin mittels des Paraffin-Gewebeinfiltrationsautomat TP 1020. Hierbei werden die Proben in gefensterter Plastikkassetten eingeschlossen und mittels eines Schwenkkorbes in ständiger Bewegung unter Vakuum sukzessive einer ansteigenden Ethanolreihe, Xylol und flüssigen Paraffin ausgesetzt. Am nächsten Morgen werden die Präparate mit Hilfe der Paraffinausgießstation EG 1140H in Metallgießformen in Paraffin eingebettet. Schnitte in der Dicke von 5 µm werden mittels des Paraffin-Schnitt-Transfersystems mit Rotationsmikrotom HM 360 hergestellt. Aus dem 42°C warmen Wasser-Auffangbecken werden die Schnitte nach Streckung mit Hilfe eines Pinsels auf Objektträger aufgenommen und luftgetrocknet. Die Schnitte werden bei RT gelagert.

Tabelle 3.7: verwendetes Entwässerungs- und Paraffinierungsprogramm

Reagenz	Vakuum	Durchmischungsbewegung	Verweildauer
60% Ethanol	+	+	2 h
70% Ethanol	+	+	2 h
80% Ethanol	+	+	2 h
96% Ethanol	+	+	1 h
96% Ethanol	+	+	1 h
100% Ethanol	+	+	1 h
100% Ethanol	+	+	1 h
Xylol	+	+	1 h
Xylol	+	+	1 h
Paraffin	+	+	2 h
Paraffin	+	+	2 h

3.VI.1.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Paraffinschnitten

Paraffinschnitte werden zunächst entparaffiniert und rehydratisiert. Dazu werden Objektträger 1 ½ min in Xylol und anschließend für je 1 min in absolutem, 96%, 90%, 80%, 70, 60% und 50% Ethanol inkubiert. Nach 5 min Inkubation in A. bidest erfolgt eine 10 sec Kernfärbung in Hämatoxylin-Lösung. Die Präparate werden unter fließendem Wasser differenziert und anschließend für 5 min in warmen Wasser nachgebläut. Hiernach erfolgt für 15 – 30 min eine Zytoplasmafärbung mittels Eosin-Lösung. Anschließend werden die Präparate mit fließendem Wasser differenziert. Darauf werden die Präparate entwässert, wobei Objektträger für jeweils 30 sec in 60%, 70%, 80%, 90%, 96% und absolutem Alkohol sowie Xylol inkubiert werden. Präparate werden mittels Entellan eingedeckelt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Anfertigung und Analyse HE-gefärbter Präparate erfolgten mit Ausnahme der Analyse neonataler Herzen und adulter Ovarien (s.u.) selbständig.

3.VI.1.3 Picrosiriusred-Färbung von Paraffinschnitten

Zur Darstellung von fibrotischem Infarktgewebe adulter Herzen werden entparaffinierte und rehydrierte Paraffinschnitte zunächst unter einem Abzug für 5 min bei RT mit Phosphomolybdän-Lösung gebeizt. Hiernach folgt eine Färbung in Picrosiriusred-Lösung unter einem Abzug für 1 ½ Stunden bei RT. Die Differenzierung erfolgt durch zweimaliges Waschen in 0,01 N Salzsäure und A. bidest für je 1 min. Anschließend werden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe und Xylol für je 30 sec dehydriert und mit Entellan eingedeckelt. Die Auswertung erfolgt lichtmikroskopisch.

3.VI.1.4 Histologie neonataler Herzen

Neonatale Tiere im Alter von 1-5 Tagen nach der Geburt werden durch Dekapitation getötet und der Brustraum eröffnet. Nach Entfernung des vorderen Rippenkörpers werden Herz und Lunge zusammen mittels Pinzette entnommen. Unter einem Binokular werden die Lungenlappen und der Thymus unter Erhalt des Herzgefäß-Baumes abpräpariert. Neonatale Herzen werden üN bei 4°C in 4% PFA rotierend in Schraubdeckelgefäßen fixiert. Am nächsten Tag werden die Proben mehrfach in PBS⁻ gewaschen, in 70% Ethanol gelagert und zur weiteren histologischen Analyse zu Dr. Jung-Sun Kim nach Seoul, Korea (University of Ulsan, College of Medicine) verschickt. Hier erfolgte für die neonatalen Herzen Routine-Histologie durch Einbettung in Paraffin, Anfertigung von Längsschnitten der Herzen und HE-Färbung.

3.VI.1.5 Histologie adulter Ovarien

Adulte Weibchen werden hinsichtlich ihres Zyklus kontrolliert und im Östrus werden Ovarien präpariert. Die analytische Histologie erfolgte mittels HE-gefärbter Paraffinschnitte durch Dr. Ruth Grümmer (Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Essen).

3.VI.1.6 Histologie neonataler Speiseröhren an Semidünnschnitten

Neonatale Ösophagi wurden durch Prof. Volker Herzog (Institut für Zellbiologie, Bonn) präpariert. Proben werden in Karnovsky-Lösung fixiert, am nächsten Tag 3 x 5 min in Cacodylatpuffer gewaschen und für 1 Stunde mit 2% Osmiumsäure nachfixiert. Nach 6 Waschschrritten in A. bidest werden die Präparate für 1 ½ h im Dunklen mittels 4% Uranylazetat kontrastiert. Nach weiteren 6 Waschschrritten in A. bidest werden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 90%, absolut und absolut mit Molekularsieb; je 10 min) dehydriert. Die Präparate werden für je 10 min in Propylenoxyd inkubiert und die Infiltration von Epon-Propylenoxyd-Lösung erfolgt in A. bidest. Am nächsten Tag wird das Propylenoxyd abgedampft und die Präparate in Einbettungsgießformen für 2 h bei RT in Epon-Einbettungslösung eingebettet. Anschließend wird das Eponharz für 24 h bei 60°C ausgehärtet. Glasmesser werden aus Glasstreifen an einem Glasmesser-Brecher gebrochen und als Schnittauffänger werden an jedem Messer Plastikschieffchen angebracht. Semidünnschnitte werden mit Glasmessern an einem Ultramikrotom hergestellt und in einem Wassertropfen auf Objektträger überführt. Zum Strecken der Präparate werden die Objektträger auf eine 70°C Heizplatte gelegt und angetrocknet. Die Färbung der Präparate erfolgt als Schnellfärbung nach Trumpf et al. (1961). Die Präparate werden 1-3 min auf einer 60°C warmen Heizplatte mit je einem Tropfen 0,1% Toluidinblau-Lösung in basischem Milieu (hierdurch muß das Einbettmedium nicht entfernt werden) inkubiert und der Färbungserfolg unmittelbar lichtmikroskopisch überprüft. Anschließend werden die Objekte in A. bidest differenziert, getrocknet und eingedeckelt. Die Auswertung erfolgt lichtmikroskopisch. Die Herstellung der Präparate erfolgte durch Ute Kukulies (Institut für Zellbiologie, Bonn).

3.VI.2 Elektronenmikroskopische Analysen

3.VI.2.1 Transmissions-Elektronenmikroskopie neonataler Epidermis

Für diese Analysen wird die Rückenhaut neonataler Tiere wie unter 3.V.1.6 beschrieben fixiert und eingebettet. Von den in Epon eingebetteten Präparaten werden mittels eines Diamantmessers an einem Ultramikrotom Ultradünnschnitte angefertigt. Diese Schnitte werden auf Metallträgernetzen aus Nickel aufgefangen, die mit 0,8% Formvar in Chloroform beschichtet sind. Die aufgefangenen Schnitte werden zunächst für 20 min mit 4% Uranylazetat und anschließend für 15 min mit 2,5% Bleicitrat-Lösung in CO₂-armer Atmosphäre nachkontrastiert. Abschließend werden die Trägernetze mit A. bidest gespült und getrocknet. Die Auswertung erfolgt mittels eines Transmissions-Elektronenmikroskopes, ausgestattet mit einem LaB₆ Filament bei 80 kV. Die Anfertigung und Auswertung der Präparate erfolgte durch Manuela Saathoff (Institut für Zellbiologie, Bonn).

3.VI.2.2 Raster-Elektronenmikroskopie neonataler Epidermis

Ganzhaut-Epidermisstücke in der Größe von 1,0 x 0,5 cm werden in 4% PFA, 2% Glutaraldehyd in PBS⁻ (pH 7,2) fixiert und bis zur Analyse durch Dr. Gregor Kirfel (Institut für Zellbiologie, Bonn) im Fixans gelagert. Die Proben werden 5 x für 3 min in PBS⁻ gewaschen und über eine aufsteigende Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 2 x absolut und 2 x absolut Molekularsieb Ethanol) mit jeweiliger Verweildauer von 10 min entwässert. Dabei wird darauf geachtet, dass die Waschschrritte unter ständigem Verbleib der Proben in Flüssigkeit erfolgen. Nach Überführung der

Proben in einen Spezialhalter werden die Gewebe in der Druckkammer eines Kritischer-Punkt-Trockners getrocknet. Die Kritische-Punkt-Trocknung erfolgt ohne feste Phasengrenze zwischen flüssiger und gasförmiger Phase, wodurch Artefaktbildung durch Oberflächenspannungskräfte des organischen Materials vermieden wird. Die getrockneten Präparate werden mit Leitsilber (Plano) auf spezielle Halter aufgebracht und mittels eines Sputter-Coaters 208 HR mit einer 2 nm dicken Platin-Palladium-Schicht überzogen. Dies dient einer besseren Leitfähigkeit der Proben, indem Aufladungen durch den Elektronenstrahl an der Oberfläche durch diese Schicht aus Edelmetall reduziert werden. Die Untersuchung erfolgte mittels eines Feldemissions-Raster-Elektronenmikroskopes durch Dr. Gregor Kirfel (Institut für Zellbiologie, Bonn).

3.VII Isolierung und Nachweis von Proteinen

3.VII.1 Isolierung von Proteinen

3.VII.1.1 Isolierung von Proteinen für Immunoblot-Analysen

Isolierung von Proteinen aus HeLa-Zellen

Von konfluent bewachsenen Zellkulturschalen (10 cm Durchmesser) wird das Medium entfernt und der Zellrasen zweimal mit PBS⁻ gewaschen. 200 µl 1x SDS-Probenpuffer inklusive 1x Complete werden zugefügt. Mit Hilfe eines sterilen Gummischabers wird das Lysat vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und in ein Schraubdeckel-Gefäß überführt. Die Probe wird auf Eis gestellt und anschließend in einem auf 4°C vorgekühlten Ultraschallbad bis zur Klärung beschallt. Es werden für die Protein-Konzentrationsbestimmung 2 µl Lysat entnommen. Die Lagerung erfolgt bei -70°C.

Isolierung von Proteinen aus Geweben

Gewebe wird unmittelbar nach der Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Um reine Epidermis zu erhalten, wird neonatale Haut zuvor für ½ – 2 min in 60°C warmem PBS⁻ inkubiert. Adulte Haut wird für 30 min in Dispase-Lösung bei 37°C inkubiert. Nach diesen Behandlungen lässt sich die Epidermis jeweils einfach von der Dermis trennen. Gefrorene Gewebe werden anschließend mit flüssigem Stickstoff in Schraubzylinder überführt und mittels eines gekühlten Stößels zerstoßen. Das Gewebepulver wird in vorgekühlte Schraubdeckel-Gefäße überführt und auf Trockeneis zur Lyophylle transportiert. Hier wird das Gewebe in offenen Gefäßen für mindestens 4 h lyophilisiert. Das Gewebepulver wird bei -70°C gelagert und bei Bedarf in einem berechneten Volumen 1x SDS-Probenpuffer inklusive 1x Complete gelöst und mittels Beschallung in einem Ultraschallbad oder mittels Ultraschallspitze möglichst bis zur Klärung gebracht. Gewebelysate mit schlechter Lösbarkeit werden anschließend mehrmals durch 22G-Kanülen gezogen, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Es werden für die Protein-Konzentrationsbestimmung 2 µl Lysat entnommen. Gewebelysate werden bei -70°C gelagert.

3.VII.1.2 Isolierung von Proteinen für Immunpräzipitationen

Nach Entfernen des Mediums werden Zellrasen (3,5 cm Kulturschale) zweifach mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen. Danach werden 250 µl kalter RIPA-Puffer inklusive 1x Complete zugefügt, die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes entfernt und in ein Schraubdeckelgefäß überführt. Das Lysat wird 20 min auf Eis inkubiert und währenddessen mindestens 4 x für 20 sec in einem vorgekühlten Ultraschallbad bis zur Klärung beschallt. Das Lysat wird anschließend 30 min bei 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Während das Sediment Kerntrümmer und Membranreste enthält, befinden sich im Überstand in erster Linie zytosolische und durch Detergenzien aus Membranen gelöste Proteine. Es werden für die Protein-

Konzentrationsbestimmung 2 µl Lysat entnommen, die restliche Probe wird für die Immunpräzipitation verwendet.

3.VII.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten erfolgt mittels des „Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination“ (Sigma) entsprechend den Angaben des Herstellers spektroskopisch. Zu vergleichende Proben für die Immunoblot-Analyse werden volumetrisch mittels 1 x SDS-Probenpuffer auf selbe Konzentrationen gebracht.

3.VII.3 Immunoblot-Analysen

Zu vergleichende Gewebelysate gleicher Konzentration sowie bei Bedarf 10 µl HeLa-Zellysate werden bis zur Klärung Ultraschall-behandelt und Bromphenolblau sowie β-Mercaptoethanol werden dem SDS-Probenpuffer bis zur Laemmli-Probenpuffer (Laemmli, 1970)-Konzentration beigemischt. Für die Analyse von Connexinproteinen in Epidermis und Herz werden 50 oder 100 µg Gewebelysate eingesetzt. Für die Analyse von epidermalen Differenzierungsmarkern werden 2 µg (Filaggrin in neonataler Epidermis), 5 µg (Keratin 1, Keratin 5, Loricrin in neonataler Epidermis) oder 20 µg (Loricrin und Filaggrin in adulter Epidermis) Gewebelysate eingesetzt. Die Lysate werden mittels denaturierender, diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Hierfür werden 1,5 mm dicke Gele mit 4 - 12,5 % Polyacrylamidgehalt und die Elektrophoresekammern "Mighty Small II" (Hoefer) verwendet. Im Anschluss erfolgt ein Elektrotransfer der Proteine (1 - 2 h, 4°C, 100 V) unter Verwendung der "Blotting-Chamber Mighty-Small II" (Bio-Rad) aus dem Gel auf Nitrozellulosemembranen. Zur Überprüfung der Proteinbeladung und des Proteinübertrages folgten eine Inkubation des Proteingels in Coomassie-Färbelösung (30 min, RT, Wippe) und eine anschließende Entfärbung in Coomassie-Entfärber. Das weitere Vorgehen richtet sich nach der finalen Signaldetektion mittels Chemilumineszenz oder ¹²⁵I-markiertem Protein A.

3.VII.3.1 Immunoblot mittels Chemilumineszenz-Nachweis

Nach dem Elektrotransfer von Proteinen wird die Nitrozellulosemembran (Hybond-ECL, Amersham) mindestens 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in Immunoblot-Blockierungslösung (Connexin-Proteine, ZO-1) oder 1 x Roti-Block in PBS⁻ (Haut-Differenzierungsmarker) schwenkend inkubiert. Die primären Antikörper werden in der entsprechenden Lösung entweder über Nacht bei 4°C (Connexin-Proteine, ZO-1) oder für 1 h bei RT (Haut-Differenzierungsproteine) rotierend inkubiert. Zur Minimierung der Menge an einzusetzenden Antikörpern kann das Inkubationsvolumen durch Einschweißen der Membran mit Antikörperverdünnung in Plastikfolie minimiert werden. Die Membran wird anschließend dreimal für 10 min in Immunoblot-Waschlösung oder PBS⁻ gewaschen. Die Inkubation mit für die ersten Antikörper speziesspezifischen sekundären Antikörpern, die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind, erfolgt bei RT für 30 min schwenkend in Immunoblot-Blockierungslösung oder 1 x Roti-Block in PBS⁻. Nach dreimaligen Waschen in Immunoblot-Waschlösung oder PBS⁻ werden die Membranen zweimal in Chemilumineszenzlösung „ECL-Plus“, angesetzt nach Herstellerangaben, für 5 min bei RT schwenkend inkubiert, wobei die Membran nach dem ersten Schritt gewendet wird. Die Membran wird zwischen 3MM Papier getrocknet, zwischen Plastikfolie in eine Röntgenkassette eingelegt und aufgelegte Röntgenfilme im Dunkelraum mittels Entwicklermaschine entwickelt. Membranen können für mehrere Immunoblots verwendet werden. Dazu werden sie nach der Chemilumineszenz-Reaktion bei 4°C in PBS⁻ gelagert und bei Bedarf mit Abzieh-Lösung entsprechend den Angaben des Herstellers behandelt. Nach erneuter Blockierung kann die Membran wiederverwendet werden.

3.VII.3.2 Immunoblot mittels ¹²⁵I-markierten Protein A

Nach dem Elektrotransfer wird die Nitrozellulosemembran (0,45 µm, Schleicher und Schüll) 2 h bei RT in 1 x Roti-Block in PBS⁻ blockiert. ÜN erfolgt die Inkubation mit primären Antikörpern bei 4°C rotierend in 1 x Roti-Block in PBS⁻. Am nächsten Tag wird die Membran dreimal in 1 x Roti-Block in PBS⁻ gewaschen. Der Blot wird in einem geeigneten Gefäß mit 4 ml 1 x Roti-Block in das Isotopenlab gebracht und unter einem Abzug hinter ¹²⁵I-abschirmendem Plexiglas werden 10 µl ¹²⁵I-markiertes Protein A zugegeben. Nach 2 stündiger Inkubation wird die Membran mindestens 4 Mal für 20 min mit 1 x Roti-Block in PBS⁻ gewaschen. Nach Trocknung wird die Membran zwischen zwei Butterbrot-Papierstreifen in eine Röntgenkassette eingelegt und in der Dunkelkammer Röntgenfilme unter- und aufgelegt. Die Entwicklung der Filme nach 1-3 Wochen erfolgt mittels Entwicklermaschine.

3.VII.4 Immunpräzipitation

3.VII.4.1 Immunpräzipitation

Der Überstand des Zelllysates in RIPA-Puffer wird mit 40 µl Sepharose-4B Gel versetzt und 2 h bei 4°C rotierend vorinkubiert. Durch anschließende Zentrifugation werden hierbei unspezifisch an Sepharose bindende Proteine sedimentiert. Der Überstand wird zu einem Gemisch aus 10 µl Protein A-Sepharose und 2 µl Antikörper pipettiert, welches bereits 30 min auf Eis stehend vorinkubiert hat. Die Inkubation erfolgt drehend bei 4°C üN. Komplexe aus Antigen, Antikörper und Protein A-Sepharose werden sedimentiert. Das Sediment wird dreimal mit 500 µl RIPA-Waschpuffer und einmal mit A.bidest gewaschen. Das Sediment wird mit 15 µl 1xLaemmli-Probenpuffer versetzt. Nach Inkubation bei 65°C, was zu einer Trennung der Verbindungen zwischen Antigen, Antikörper und Protein A-Sepharose führt, wird Protein A-Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand in der SDS-PAGE eingesetzt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationen wurden durch Dr. Stephanie Urschel (Institut für Genetik, Bonn) durchgeführt.

3.VII.4.2 Protein-Halbwertzeit-Bestimmung an HeLa-Lysaten mittels Pulse-Chase-Analyse

HeLa-Zellen werden wie durch Hertlein et al. (1998) beschrieben metabolisch für 1 h mit ³⁵S-Methionin markiert. Das Medium wird gegen nicht-radioaktives ausgetauscht, in dem sich zusätzlich 15 mg/l Methionin befinden (Endkonzentration Methionin: 45 mg/l). Zellen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Markierung in RIPA-Puffer geerntet. Nach Abnahme von 2 µl Lysat für eine Proteinbestimmung werden Connexine immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Fixierung wird das Gel mit Amplify behandelt, getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen. Densitometrische Signale der digitalisierten Autoradiographie werden mittels der Imagemaster 2.0 Software (Amersham) bestimmt und gegen die Proteinkonzentration der für die Immunpräzipitation eingesetzten RIPA-Lysate abgeglichen (IOD, „intensity of optical density“: Intensität der optischen Dichte). Der korrigierte densitometrische Werte für eine chase-Phase von 0 h wird als 100% definiert. Die Logarithmen der korrigierten IOD Werte werden zum Erstellen einer Regressionsgerade eingesetzt ($\ln \text{IOD} = a + bx$) unter Benutzung der „GraphPad prism“ Software (GraphPad). Die Protein-Halbwertzeit wird aus der Steigung der Regressionsgerade aus mindestens 3 unabhängigen Pulse-Chase Analysen ermittelt.

3.VII.4.3 Analyse der cAMP-abhängigen Phosphorylierung von Connexinen an HeLa-Lysaten

Vier HeLa-Zellkulturen gleicher Konfluenz werden verwendet. Hierbei wird die Hälfte der Ansätze mittels ^{35}S -Methionin metabolisch bezüglich ihrer Proteine und die andere Hälfte mittels ^{32}P -ortho-Phosphat hinsichtlich ihrer Phosphorylierung markiert. Diese Gruppen werden gleichzeitig jeweils in zwei Unterchargen aufgeteilt, wobei die eine mittels Dibutyl-cAMP (Sigma) stimuliert wird und die andere nicht. Dibutyl-cAMP gelangt durch passive Diffusion in Zellen und wird hier zu cAMP umgesetzt. Von allen 4 Ansätzen werden RIPA-Zellysate hergestellt und je 2 μl für spätere Proteinkonzentrationsbestimmung abgenommen. Die Zellysate werden einer Immunpräzipitation unterzogen. Die Präzipitate werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele nach Trocknung einer Autoradiographie unterzogen. Die ^{35}S -Signale geben Aufschluß über die Menge an immunpräzipitierten Protein in den Ansätzen, die ^{32}P -Signale über den Grad der Phosphorylierung mit und ohne cAMP-Stimulierung. Zudem wird nach Abklingen der radioaktiven Zerfälle eine Proteinbestimmung durchgeführt. Hierdurch wird untersucht, ob die Zugabe von Dibutyl-cAMP einen Einfluss auf die Gesamtmenge an exprimierten Proteinen hat.

3.VII.5 Immunfluoreszenz-Analysen

3.VII.5.1 Herstellung von Präparaten für Immunfluoreszenz-Analysen

Herstellung von Kryoschnitten

Kryoschnitte werden von Geweben angefertigt, die unmittelbar nach der Präparation auf Trockeneis eingefroren worden sind. Epidermispräparate werden dabei zunächst gestreckt in einem Tropfen TissueTec (Sakura) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Schnitthanfertigung werden die Gewebe bei -20 - -30°C mittels TissueTec auf Träger montiert und im Kryostat zu Schnitten von 5 - 10 μm Dicke prozessiert. Die Temperatur von Objekt und Messerblock (Kammer) wird entsprechend der Präparat-Anforderungen eingestellt. Schnitte werden auf SuperFrost Plus-Objektträger aufgenommen, mindestens 30 min luftgetrocknet und bei -70°C gelagert.

Herstellung von HeLa-Zell-Präparaten

Zunächst werden Glasdeckgläschen vorbehandelt, damit HeLa-Zellen effizient auf diesen kultiviert werden können. Dazu werden in einer Glaspetrischale (Durchmesser 10 cm) 50 Deckgläschen (Durchmesser 10 mm) bei RT für 5 min in Aceton schwenkend inkubiert. Nach Abgießen des Acetons werden die Deckgläschen luftgetrocknet und für 3 – 4 h in 15 ml 2% Natriumcarbonat-Lösung schwenkend bei RT inkubiert. Anschließend wird 5 x kurz mit A. bidest gewaschen und danach 5 x für je 30 min. ÜN wird nochmals in frischem A. bidest gewaschen und am nächsten Tag ganztags mit mindestens 4 Wasserwechseln. Hiernach werden die Schalen mit möglichst vereinzelt liegenden Deckgläschen üN in einen Trockenschrank gestellt. Am nächsten Tag werden 3MM Papiere in der Größe des Petrischalenbodens eingelegt. Auf diese werden die vereinzelt Deckgläschen gelegt, die Schale verschlossen, mit Alu-Folie umwickelt und trockensterilisiert. Unter einer Sterilbank werden die Deckgläschen in die Vertiefungen von 24-Loch-Schalen verteilt und hierauf HeLa-Zellen kultiviert. Vor einer Immunfluoreszenz-Analyse wird das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS⁻ gewaschen

3.VII.5.2 Immunfluoreszenz-Analysen mit primären Antikörpern aus Kaninchen

Kryoschnitte werden vor der Analyse in PBS⁻ rehydratisiert, HeLa-Zellen-bewachsene Deckgläschen wie unter 3.VI.5.1 beschrieben, vorbereitet. Präparate werden 10 min bei RT mit 100% Ethanol fixiert. Anschließend wird je dreimal die Hälfte des Volumens gegen PBS⁻

ausgetauscht und die Präparate 5 min schwenkend bei RT inkubiert. Darauf werden die Proben dreimal für je 2 min in PBS⁻ schwenkend inkubiert. Für Präparate mit hohem Hintergrund-Anfärbung wird eine 30 sec Fixierung in 3,7% Formalin Fixierungslösung in PBS⁻ mit 3 anschließenden Waschschritten in PBS⁻ angeschlossen. Proben werden mindestens für 2 h bei RT, bei Antikörpern mit hohem Hintergrund auch üN bei 4°C, in Immunfluoreszenz-Blockierungslösung schwenkend inkubiert. Die Inkubation mit den ersten Antikörpern erfolgt für primäre Connexin- und ZO-1 Antikörper üN bei 4°C, für primäre Antikörper gegen Hautdifferenzierungsmarker für 1 – 2 h bei RT in den unter 2.X angegebenen Verdünnungen in Immunfluoreszenz-Blockierungslösung. Die Präparate werden anschließend dreimal für 20 min bei RT in PBS⁻ gewaschen. Sekundäre, gegen die konstante Region von Kaninchen-Antikörpern gerichtete, fluorochromierte Antikörper werden in der angemessenen Verdünnung (2.X) in PBS⁻, 0,1% Triton-X100 zusammen mit 1:2000 verdünnter Zellkern-Färbelösung angesetzt und die Präparate hiermit 45 min bei RT inkubiert. Die Proben werden dreimal für 20 min in PBS⁻ gewaschen, zweimal kurz in A. bidest und einmal in 70% Ethanol getaucht. Die getrockneten Präparate werden mittels Permafluor eingedeckelt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Parallel werden für jeden untersuchten Genotyp Kontroll-Präparate, unter Aussparung der ersten Antikörper, angefertigt, um unspezifische Signale der sekundären Antikörper zu überprüfen.

3.VII.5.3 Immunfluoreszenz-Analysen mit primären Antikörpern aus Maus

Auf Grund der hohen Hintergrund-Fluoreszenz bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern aus Maus auf Mausgewebe wird für diese Analysen das Mouse-on-mouse Kit (M.O.M.TM, Vector Laboratories) verwendet. Die hohe Hintergrund-Anfärbung liegt an der gleichzeitigen Erkennung von endogenen Mausantikörpern durch sekundäre, gegen den F_c-Anteil von Maus-Antikörpern gerichtete Antikörper. Die Blockierung wird mittels „M.O.M.TM Mouse Ig Blocking Reagent“ entsprechend den Angaben des Herstellers für 1 h bei RT durchgeführt. Zudem werden primäre und sekundäre Antikörper, letztere inklusive einer 1:2000 Verdünnung von Hoechst-Farbstoff zur Zellkernanfärbung, nicht in PBS mit 0,1% Triton X100, sondern in „M.O.M.TM-Diluent“ entsprechend den Angaben des Herstellers angesetzt. Die primären Antikörper werden in den unter 2.X angegebenen Verdünnungen angesetzt und die Präparate hiermit üN bei 4°C inkubiert, die sekundären, gegen die konstante Region der aus Mäusen stammenden, fluorochromierten Antikörper entsprechend verdünnt für eine Stunde bei RT inkubiert. Bei Doppelimmunfluoreszenzen mit primären Antikörpern aus Kaninchen werden diese in den unter 2.X angegebenen Verdünnungen gleichzeitig mit den primären Antikörpern aus Kaninchen und entsprechend auch die sekundären, gegen die konstante Region von Kaninchen gerichteten, fluorochromierten Antikörpern eingesetzt. Beim Einsatz von primären Antikörpern aus Maus erfolgt in jedem Fall neben der 100% Ethanol-Fixierung auch eine Fixierung mit 3,7% Formalin Fixierungslösung in PBS⁻.

3.VII.5.4 Immunfluoreszenz-Analysen der Zellproliferation in neonataler Epidermis

Hierfür werden neugeborene Tiere mit BrdU-Injektionslösung injiziert, entsprechend 50 µg pro Gramm Körpergewicht. Die Injektion erfolgt im Nackenbereich. Zwei, 24 oder 48 Stunden nach der Injektion werden die Tiere getötet und Hautproben für Kryoschnitte isoliert. Die Detektion von während der Zellteilung in die DNS inkorporiertem BrdU erfolgt an Kryoschnitten entsprechend den Angaben des Herstellers mittels eines primären, gegen BrdU gerichteten, monoklonalen Antikörper aus Maus. Im Unterschied zu der unter 3.IV.5.3 beschriebenen Vorgehensweis erfolgt die primäre Fixierung jedoch mit saurem Ethanol.

4. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung und Analyse einer Mauslinie, die im *cx43* Locus eine verkürzte kodierende Region trägt. Erzeugt werden sollte diese transgene Mauslinie mittels des doppelten Genersatzes in HM1 embryonalen Stammzellen der Maus und anschließender Blastozysteninjektion homolog rekombinierter ES-Zellklone. Parallel dazu sollte, als Testsystem zum Nachweis und zur funktionellen Analyse, das carboxyterminale verkürzte Cx43 Protein in HeLa-Zellen transfiziert werden. Als Mutation wurde Cx43K258stop gewählt. Hierbei sollte das für Lysin kodierende Kodon 258 der kodierenden Region in ein Stopkodon umgewandelt werden.

4.I Analyse der Cx43K258stop Mutation im HeLa-Zellkultur System

Durch Expression der Cx43K258stop Mutation in HeLa-Zellen sollte ein leicht zugängliches Testsystem geschaffen werden. Dieses sollte insbesondere zur Überprüfung bestehender Antikörper auf deren Erkennung der verkürzten Cx43 Isoform in Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analysen verwendet werden. Zudem konnten mit Hilfe dieses Systems die Gap Junction vermittelten Kopplungseigenschaften und biochemischen Merkmale des mutierten Connexins wie Halbwertszeit und Phosphorylierbarkeit überprüft werden. Die Klonierung des Expressionsvektors *pBEHpac::Cx43K258stop* war bereits in der Diplomarbeit (Maass, 1999) erfolgt. Die Transfektion von HeLa-Wildtyp Zellen erfolgte vor Beginn der vorliegenden Arbeit durch Birgit Bockemühl.

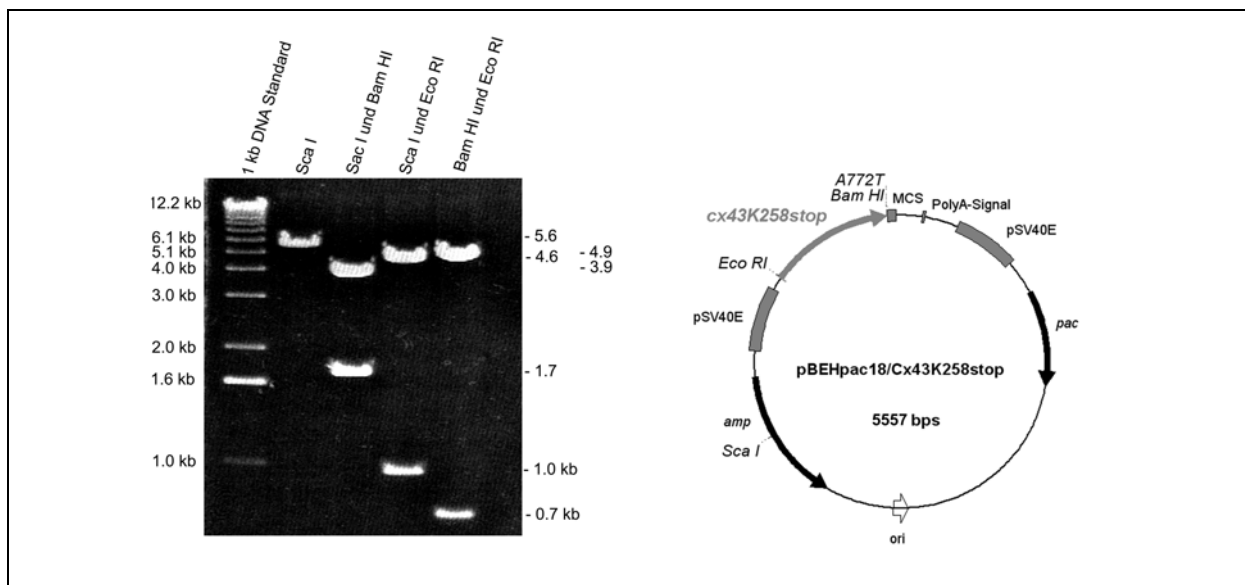


Abb. 4.1: Restriktionsanalyse des Expressionsvektors pBEHpac18::Cx43K258stop

Der Expressionsvektor *pBEHpac18::Cx43K258stop* wurde durch Einsatz der angegebenen Restriktionsendonukleasen sowie durch Sequenzierung der eingebrachten kodierenden Region (Diplomarbeit Maass, 1999) analysiert. MCS: multiple Klonierungsstelle, PolyA-Signal: eukaryotische Sequenz zur Termination der Transkription und zur Polyadenylierung aus SV40-Virus, pSV40E: Promotor und Verstärkerelemente aus SV40-Virus, pac: Puromycin-Resistenzgen, amp: Ampicillin-Resistenzgen, ori: Ursprung zur Replikation in *E. coli*.

4.I.1 Herstellung Cx43K258stop exprimierender HeLa-Zellen

Die verkürzte Form der kodierenden Region des *cx43* Gens wurde mittels PCR-Mutagenese erzeugt und in den Expressionsvektor *pBEHpac18* eingeführt. Der eingebrachte Bereich umfasste die für die Aminosäuren 1 bis 257 kodierende Region des *cx43* Gens (Abb. 4.1). Durch den Ersatz eines Adenins gegen ein Thymin an Basenposition 772 der kodierenden Region war hierzu das für Lysin kodierende Kodon 258 in ein Stopkodon umgewandelt worden.

4.I.2 Cx43K258stop lokalisiert in HeLa-Zellen ebenso wie Cx43 in die Plasmamembran

Auf Deckgläschen kultivierte HeLa-Wildtyp Zellen sowie HeLa-Cx43 und HeLa-Cx43K258stop Transfektanten wurden fixiert und mit dem primären Antikörper Cx43-L2 inkubiert. Diese polyklonalen, affinitätsgereinigten Antikörper aus Kaninchen (Yeager und Gilula, 1992) sind gegen ein Epitop aus der zweiten Hälfte der zytoplasmatischen Schleife des Cx43 Proteins gerichtet. Im Gegensatz zu den in der eigenen Arbeitsgruppe durch Christian Schlieker erzeugten polyklonalen Antikörpern Cx43-CS (Schlieker, Diplomarbeit 2000) gegen ein Epitop aus dem Ende der C-terminalen Domäne des Cx43 Proteins konnte somit die

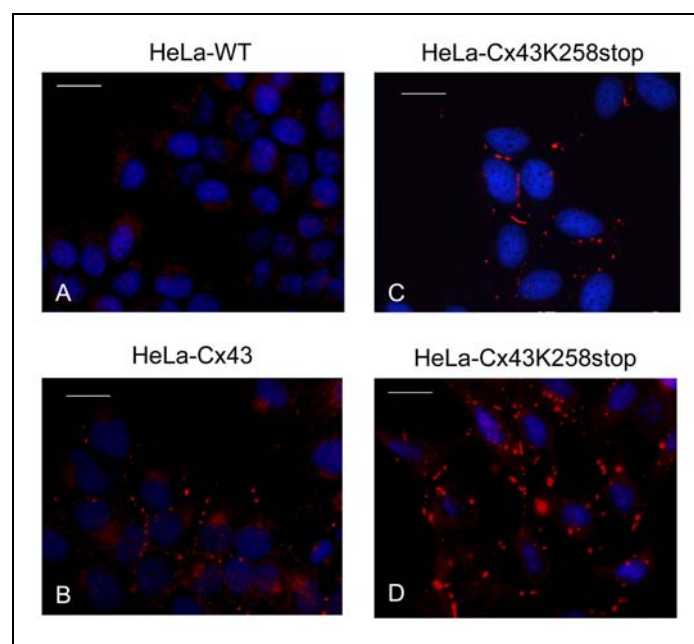


Abb. 4.2: Immunfluoreszenz Analytik an HeLa-Zellen

Fixierte HeLa-WT (A), HeLa-Cx43 (B) und HeLa-Cx43K258stop Zellen (C, D) wurden mittels der polyklonalen primären Antikörper Cx43-L2 aus Kaninchen untersucht. Während in Wildtyp HeLa-Zellen nur unspezifische Hintergrund-Signale nachgewiesen wurden, ließen sich für HeLa-Cx43 und HeLa-Cx43K258stop Zellen im Bereich benachbarter Zellgrenzen spezifische Signale nachweisen. Signale für Cx43K258stop Protein waren größer als diejenigen für das Cx43 WT Protein.

Balken: 20 µm.

verkürzte Isoform Cx43K258stop nachgewiesen werden. Während HeLa-Wildtyp Zellen nur schwache, diffus im Zytoplasma verteilte, unspezifische Signale aufwiesen (Abb. 4.2 A), zeigten sowohl HeLa-Cx43 (Abb. 4.2 B) als auch HeLa-Cx43K258stop (Abb. 4.2 C, D) Transfektanten spezifische Signale im Bereich ihrer Zellgrenzen. Wie Cx43 wurde auch das verkürzte Cx43K258stop Protein hauptsächlich in der Plasmamembran nachgewiesen. Die immunpositiven Signale schienen in den HeLa-Cx43K258stop Zellen eine größere Fläche einzunehmen.

4.I.3 Cx43K258stop zeigt die selben heterotypischen Kopplungseigenschaften wie Cx43

Auf Grund der beschriebenen Einflüsse von zytoplasmatischen Connexindomänen auf das homo- und heterotypische Kopplungsverhalten (Haubrich et al., 1996) wurden mittels der DiI-Calcein-Methode diese Eigenschaften qualitativ zwischen Cx43 und Cx43K258stop HeLa-Zelltransfektanten verglichen. Diese markierten Zellen wurden anschließend auf Rasen von Wildtyp HeLa-Zellen und von verschiedenen HeLa-Connexin Transfektanten ausgesät. Die Ansätze wurden hinsichtlich der Calcein-Ausbreitung von den markierten Zellen in unmarkierte Zellen als funktionale Überprüfung von Gap Junction vermittelter interzellulärer Kopplung analysiert. Wie HeLa-Cx43 Transfektanten zeigten auch Cx43K258stop exprimierende HeLa-Zellen Ausbreitung von Calcein zu unmarkierten HeLa-Cx43 (Abb. 4.3 A, E), HeLa-Cx43K258stop (Abb. 4.3 B, F), HeLa-Cx37 (Abb. 4.3 C, G) und HeLa-Cx45 Transfektanten (Abb. 4.3 D, H), nicht aber zu HeLa-Zellen, die kein Connexin (Abb. 4.4 A, F) oder aber die Connexine Cx26 (Abb. 4.4 B, G), Cx31 (Abb. 4.4 C, H), Cx32 (Abb. 4.4 D, I) oder Cx40 (Abb. 4.4 E, K) exprimierten. Die Ausbreitung von Calcein über heterotypische Gap Junction Kanäle zwischen Cx43K258stop und Cx37 bzw. Cx45 exprimierenden HeLa-Zellen (Abb. 4.3 G, H) erschien größer als im Fall von Cx43 (Abb. 4.3 C, D). Qualitativ ließen sich keine Unterschiede in den Eigenschaften der heterotypischen Kopplung zwischen Cx43 und Cx43K258stop für die analysierten Connexinpartner feststellen. Cx43K258stop Connexone bilden somit ebenso wie Cx43 Connexone funktionale homotypische Gap Junction Kanäle untereinander aus und zeigen heterotypische Kopplung mit Cx43 Connexonen. Ebenso wie Cx43 Halbkanäle bilden Cx43K258stop Connexone heterotypische Gap Junction Kanäle mit Zellen aus, die Cx45 oder Cx37 exprimieren, nicht aber mit HeLa-Zellen, die Cx26, Cx31, Cx32 oder Cx40 ausprägen.

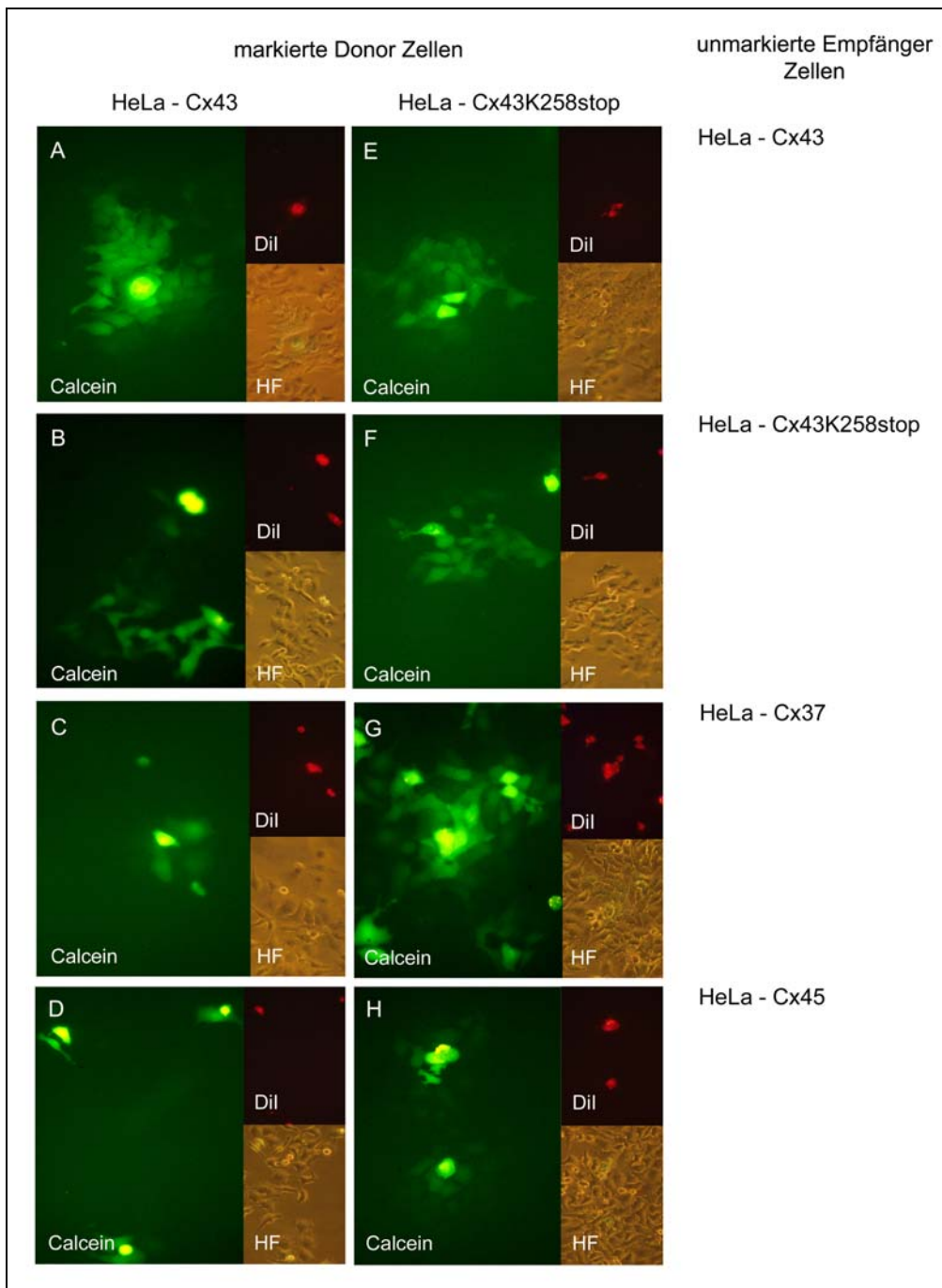


Abb. 4.3: Vergleich der Kopplungseigenschaften zwischen Cx43 und Cx43K258stop Teil 1

Auf Zellrasen von unmarkierten HeLa-Cx43 (A, E), Cx43K258stop (C, F), Cx37 (E, G) und Cx45 Transfektanten (D, H) wurden im Verhältnis 1:1000 DiI und Calcein markierte HeLa-Cx43 (A-D) oder Cx43K258stop Transfektanten (E-H) ausgesät. DiI diente als Marker für die ausgesäten Zellen, intrazelluläres Calcein konnte durch Gap Junction Kanäle in benachbarte Zellen diffundieren. Zur Abschätzung der Zelldichte wurde zudem jeweils eine Hellfeldaufnahme angefertigt. Cx43 und Cx43K258 zeigte wechselseitig eine Ausbildung von funktionalen heterotypischen Gap Junction Kanälen (B, E), vergleichbar zur jeweils homotypischen Kopplung (A, F). Beide Cx43-Isoformen zeigten eine Ausbildung funktionaler heterotypischer Gap Junction Kanäle mit Cx37 (C, G) sowie Cx45 (D, H) exprimierenden HeLa-Transfektanten. Der Grad der Calcein-Ausbreitung erschien im Fall der heterotypischen Kopplung zwischen Cx43K258 und Cx37 bzw. Cx45 höher als für Cx43 zu sein. HF: Hellfeldaufnahme

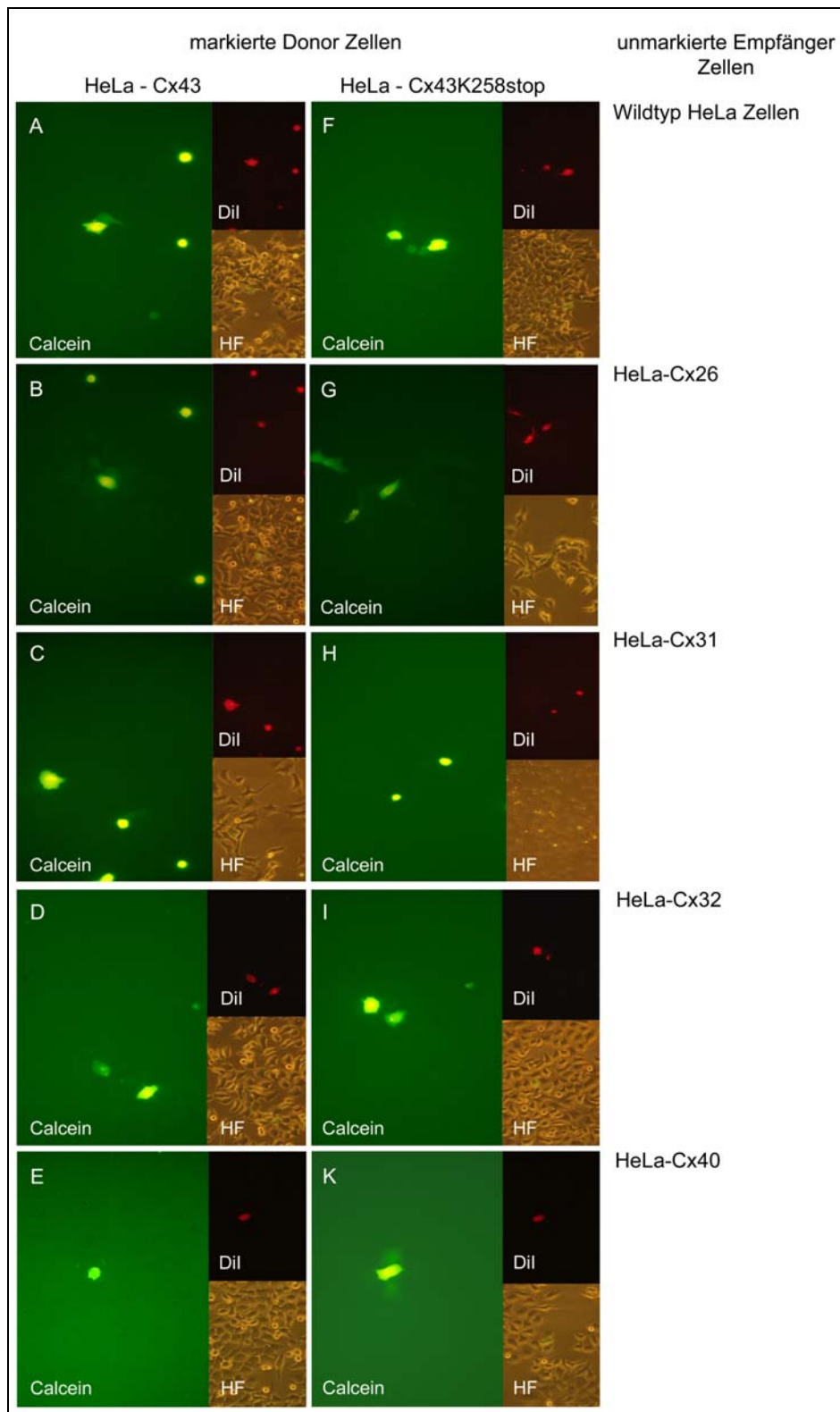


Abb. 4.4: Vergleich der Kopplungseigenschaften zwischen Cx43 und Cx43K258stop Teil 2

Auf Zellrasen von unmarkierten Wildtyp HeLa-Zellen (A, F), -Cx26 (B, G), -Cx31 (C, H), -Cx32 (D, I) und -Cx40 Transfektanten (E, K) wurden im Verhältnis 1:1000 Dil und Calcein markierte HeLa-Cx43 (A-E) oder HeLa-Cx43K258stop Transfektanten (F-K) ausgesät. Cx43 und Cx43K258 zeigten keine Ausbildung funktionaler heterotypischer Gap Junction Kanäle mit Wildtyp HeLa-Zellen (A, F), Cx26 (B, G), Cx31 (C, H), Cx32 (D, I) sowie Cx40 (E, K) exprimierenden HeLa Transfektanten. Die schwache Ausbreitung von Calcein (A, B, C, F, G, I, K) kann auf schwache endogene Expression von Cx45 in HeLa-Zellen rückgeführt werden. HF: Hellfeldaufnahme.

4.I.4 Proteinanalytik von Cx43K258stop

4.I.4.1 Cx43K258stop wird als ein Protein des Molekulargewichtes von 28kD gebildet

Lysate von HeLa-Cx43 und HeLa-Cx43K258stop Transfektanten wurden nach Auftrennung mittels SDS-PAGE über ein Spannungsfeld auf Nitrozellulose-Membranen überführt und diese mit den Antikörpern Cx43-L2 inkubiert. Nach Inkubation mit Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörpern und ECL-Reaktion waren auf den entwickelten Filmen (Abb. 4.5) Signale für HeLa-Cx43 Lysat zu erkennen, die der unphosphorylierten (P^0) sowie den beiden phosphorylierten Isoformen des Cx43 Proteins (P^1 - P^2) entsprachen. Für HeLa-Cx43K258stop Lysat war nur ein Signal in der erwarteten Höhe von 28 kD zu erkennen. Auf Grund der schwächeren Expression der HeLa-Cx43K258stop Transfektanten konnten höhermolekulare, auf Phosphorylierung rückführbare Signale weder nachgewiesen noch ausgeschlossen werden.

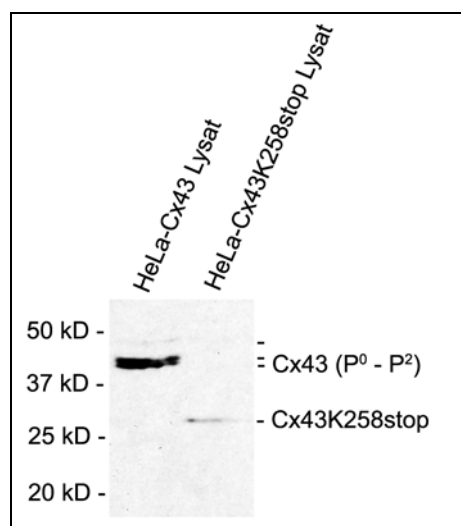


Abb. 4.5: Western Blot Analyse von HeLa-Lysaten

50 μ g HeLa-Cx43 und HeLa-Cx43K258stop Lysat wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran geblottet und mit den polyklonalen Antikörpern Cx43-L2 aus Kaninchen inkubiert. Nach Inkubation mit gegen Kaninchen gerichteten, Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörpern aus Ziege wurden immunreaktive Signale auf der Membran mittels Chemilumineszenz nachgewiesen.

HeLa-Cx43 Lysat zeigte die erwarteten Signale von unphosphoryliertem Cx43 in der Höhe von 41 kD (P^0) sowie die Signale des ein- oder mehrfach phosphorylierten und somit höhermolekularen 44 und 46 kD Cx43 (P^1 - P^2).

HeLa-Cx43K258stop Lysat zeigte ein Signal in der Höhe von 28kD. Phosphorylierte Formen waren für die verkürzte Isoform nicht erkennbar.

4.I.4.2 Cx43K258stop kann cAMP-abhängig schwach phosphoryliert werden

Der C-Terminus von Cx43 besitzt zahlreiche Konsensusmotive für Phosphorylierungen durch verschiedene Proteinkinasen (Musil et al., 1990). Belegt sind unter anderem Phosphorylierungen durch die cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA). Um zu untersuchen, ob die verbliebene, potentielle PKA-Erkennungsstelle Serin244 in Cx43K258stop genutzt werden kann, wurden HeLa-Cx43K258stop Transfektanten in Gegenwart und in Abwesenheit von Dibutyl-cAMP (db-cAMP) kultiviert. Um auszuschließen, dass db-cAMP eine Veränderung der Cx43K258stop Proteinmenge bewirkt, wurde die Hälfte der stimulierten und nicht-stimulierten Ansätze metabolisch mit ^{35}S -

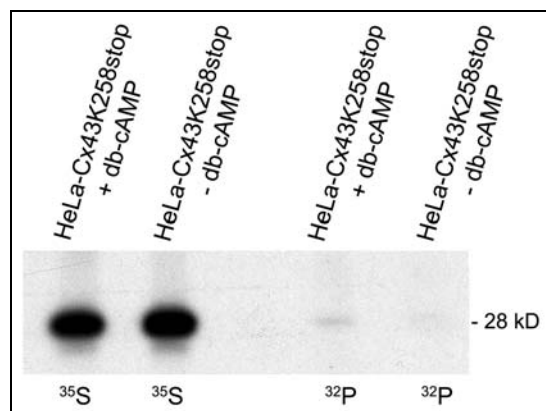


Abb. 4.6: cAMP-abhängige Phosphorylierung von Cx43K258stop

HeLa-Cx43K258stop Zellen wurden in Gegenwart und ohne Dibutyl-cAMP (db-cAMP) kultiviert. Gleichzeitig wurde je die Hälfte der Zellen mit ^{35}S -markiertem Methionin oder ^{32}P -Orthophosphat inkubiert. Cx43K258stop wurde anschließend mittels der Antikörper Cx43-L2 immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Autoradiographie gleicher Mengen von Immunpräzipitat über SDS-PAGE (vgl. Intensität der ^{35}S -Signale) wurde in Anwesenheit von db-cAMP in Höhe von 28 kD ein schwaches ^{32}P -Signal nachgewiesen. Ohne db-cAMP-Stimulation war auch nach langer Expositionszeit kaum Signal nachweisbar. Dies bedeutet, dass auch noch die verkürzte Cx43-Isoform eine PKA-abhängige Phosphorylierung zeigt (durchgeführt und zur Verfügung gestellt durch Dr. S. Urschel, Bonn).

Methionin markiert. Die zweite Hälfte der Ansätze, wiederum mit und ohne db-cAMP Stimulation, wurde mit ^{32}P -Orthophosphat inkubiert. Aus den Lysaten der Zellen wurde mit den Antikörpern Cx43-L2 Cx43K258stop immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE wurde das getrocknete Gel einer Autoradiographie unterzogen. Anhand des ^{35}S -Signals konnte überprüft werden, dass vergleichbare Cx43K258stop-Proteinmengen aus den Ansätzen mit und ohne db-cAMP-Stimulation immunpräzipitiert worden waren (Abb. 4.6, linke Hälfte). Zudem ergaben nachträgliche Proteinbestimmungen, dass die Gesamtproteinmengen in db-cAMP stimulierten und unstimulierten Ansätzen unverändert waren. Phosphorylierung, erkennbar durch das ^{32}P -Signal in der Autoradiographie (Abb. 4.6, rechte Hälfte), war in den db-cAMP-stimulierten Ansätzen, jedoch kaum in den unstimulierten Immunpräzipitaten erkennbar. Hierdurch wurde eine verstärkte Phosphorylierung von Cx43K258 durch Aktivierung der PKA belegt.

4.I.4.3 Cx43K258stop Protein hat gegenüber Cx43 eine verlängerte Halbwertszeit

Der C-Terminus ist an der Regulation der Halbwertszeit des Cx43 Proteins beteiligt. So konnte 2003 durch Thomas et al. auch belegt werden, dass Tyrosinrest 286 essentiell für den endosomalen/lysosomalen Abbau von Cx43 ist. Der Austausch dieses Aminosäurerestes gegen Phenylalanin führte zu einem Anstieg der Halbwertszeit um das Dreifache auf über 6 Stunden. Da auch Y286 durch die Cx43K258stop Mutation deletiert wurden, sollte die Halbwertszeit der verkürzten Cx43-Isoform bestimmt werden. Dazu wurden vergleichende Pulse-Chase Experimente mit HeLa-Cx43 und HeLa-Cx43K258stop Zellen durchgeführt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach ^{35}S -Methionin Markierung wurde Cx43 oder Cx43K258stop aus Zelllysaten immunpräzipitiert, gleiche Mengen Präzipitat wurden mittels

SDS-PAGE aufgetrennt und getrocknete Gele einer Autoradiographie unterzogen (Abb. 4.7). Während Cx43-Protein die aus der Literatur bekannte *in vitro* Halbwertszeit von 2,0 Stunden zeigt, wurde für Cx43K258stop eine Halbwertszeit von 4,2 Stunden ermittelt.

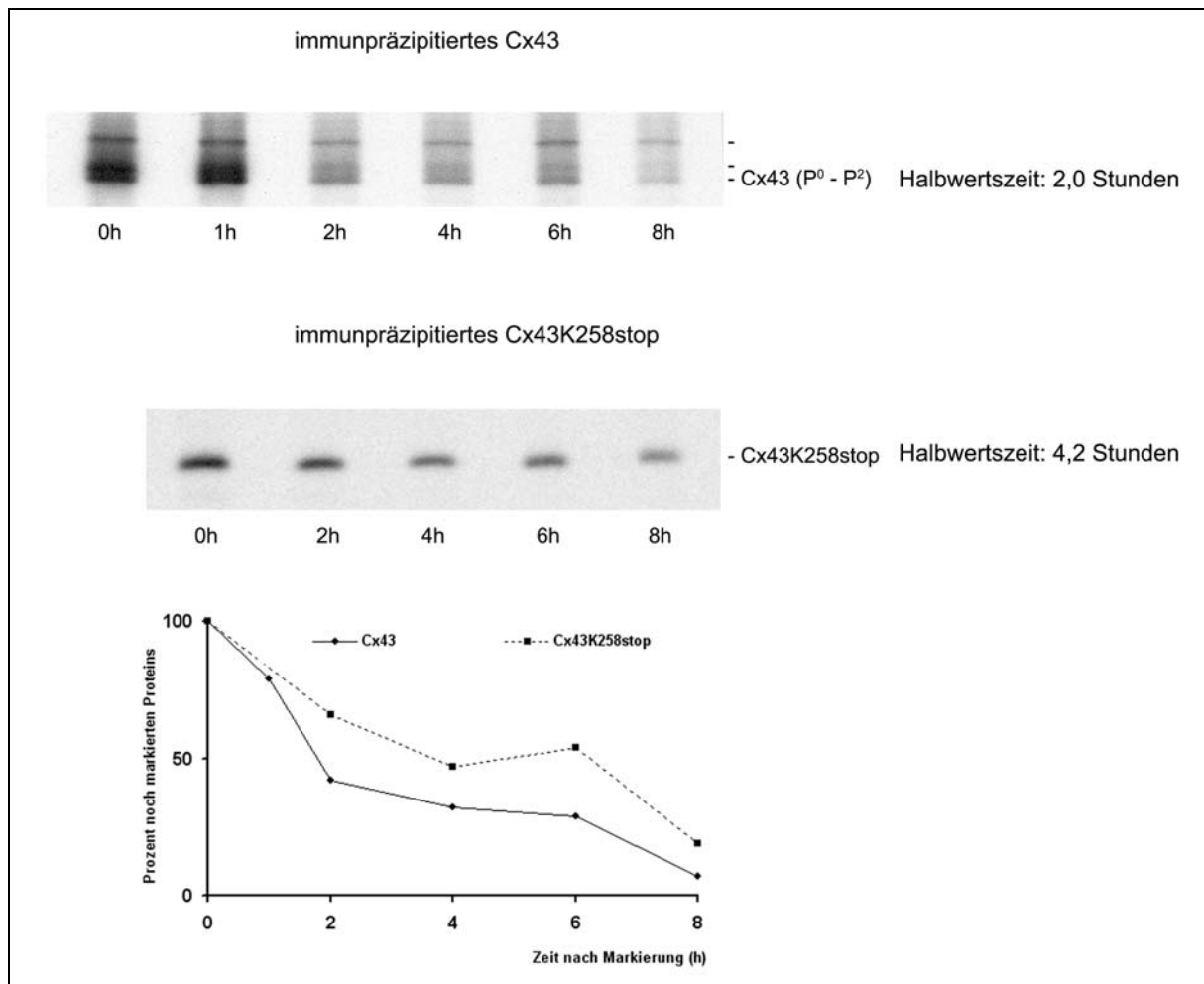


Abb. 4.7: Halbwertszeitbestimmung von Cx43K258stop Protein mittels Pulse-Chase Experiment

HeLa-Cx43 und HeLa-Cx43K258stop Transfektanten wurden mittels ³⁵S-Methionin markiert, und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beendigung der radioaktiven Markierung wurde Cx43 bzw. Cx43K258stop immunpräzipitiert. Bei Auftrag gleicher Mengen Präzipitats zeigte Cx43 Protein (oben) nach zwei Stunden nur noch die halbe Intensitätsstärke des ³⁵S-Signals wie zu Beginn der Analyse (0h). Im Gegensatz hierzu betrug die Halbwertszeit des Cx43K258stop Proteins (Mitte) 4,2h. Die Bestimmung der Halbwertszeit erfolgte densitometrisch. Die Signalintensität der gescannten Autoradiographie-Signale (intensity of optical density, IOD) wurde zur Gesamtproteinmenge der Lysate korreliert, wobei der Wert nach 0 Stunden „chase“ als 100% gewertet wurde. Die Logarithmen der korrelierten IOD Werte und die Parameter der Funktion $\ln IOD = a + bx$ wurden bestimmt (unten). Die genaue Halbwertszeit wurde anhand der Steigung der ermittelten Regressionsgerade als Mittelwert von mindestens drei Experimenten bestimmt. (Versuche durchgeführt und Ergebnisse zur Verfügung gestellt durch Dr. S. Urschel, Bonn)

4.II Erzeugung der transgenen Mauslinie Cx43K258stop

Zur Erzeugung der transgenen Mauslinie Cx43K258stop musste die gewünschte Mutation zunächst in embryonale Stammzellen der Maus eingebracht werden. Als Strategie wurde hierzu der doppelte Genersatz in HM1-Zellen gewählt (Abb. 4.8). Es konnten hierfür bestehende ES-Zellklone eingesetzt werden, die bereits ein *hprt*-Minigen in einem *cx43*-Allel tragen (Plum et al., 2000). Für die zweite homologe Rekombination im *cx43* Locus wurde ein Zielgenvektor ("Cx43K258stop") entwickelt, welcher die Mutation des Lysinkodons 258 in ein Stopkodon (A772T) beinhaltet. Zur Erleichterung des späteren Nachweises (PCR- und Southern Blot-Analysen an ES-Zell-DNS; Antikörper-Nachweis in Geweben) und zur Umgehung einer Fehlexpression durch Durchlesen des Stopkodons, wurde zudem der 3' von der Mutation liegende kodierende Bereich des *cx43* Gens deletiert. Mittels Blastozysteninjektion wurden anschließend homolog rekombinierte ES-Zellen zur Erzeugung der transgenen Cx43K258stop Mauslinie eingesetzt.

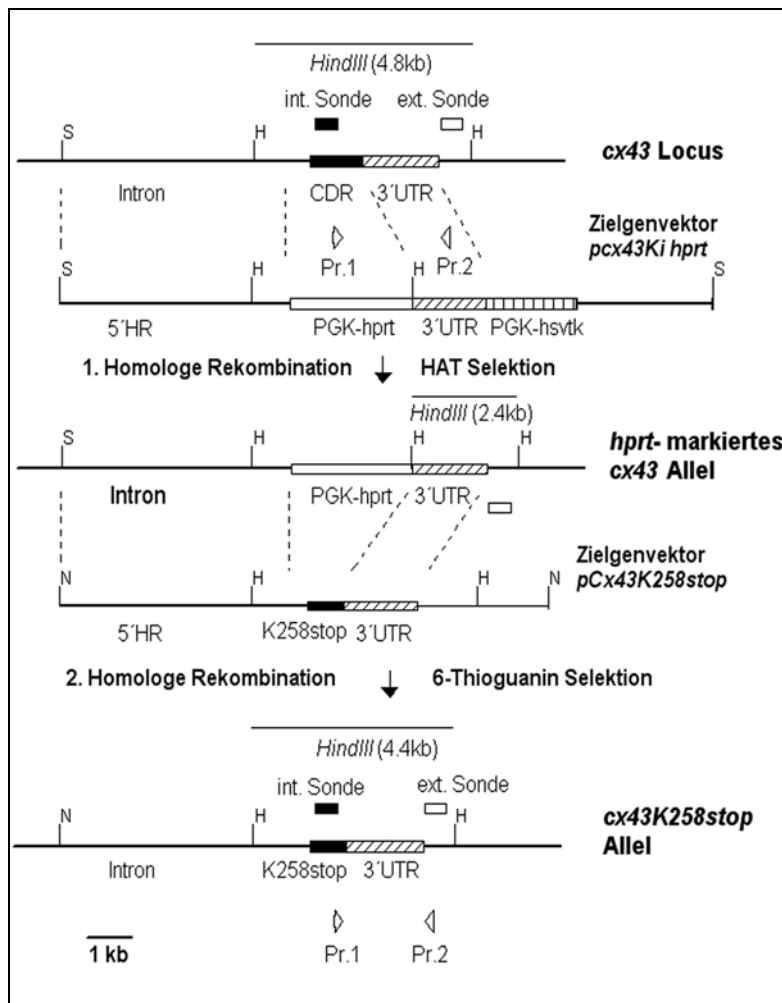


Abb. 4.8: Strategie des doppelten Genersatzes zur Erzeugung des *cx43K258stop* Allels

Durch die erste homologe Rekombination in *hprt*-defizienten HM1 embryonalen Stammzellen war die *cx43* kodierende Region durch eine PGK-*hprt*-Kassette ersetzt worden (Plum et al., 2000). Bei der zweiten homologen Rekombination wurde in der vorliegenden Arbeit die PGK-*hprt*-Kassette durch eine verkürzte *cx43* kodierende Region ersetzt. Homolog rekombinierte ES-Zellklone wurden mittels 6-Thioguanin durch Negativselektion gegen HPRT isoliert und mittels PCR- und Southern Blot-Analytik überprüft.

S: *Sac* I, H: *Hind* III, N: *Not* I, int.: intern, ext.: extern, CDR: kodierende Region, UTR: untranslatierte Region, HR: homologe Region, PGK-*hprt*: Phosphoglycerat-Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase-Minigen, PGK-hsvk: Phosphoglycerat Kinase-Herpes simplex Virus Thymidin Kinase-Minigen, Ki: knockin, HAT: Hypoxanthin-Aminopterin-Thymin, Pr.: PCR-Startermolekül

4.II.1 Herstellung des Zielgenvektors “*Cx43K258stop*“

4.II.1.1 Klonierungsstrategie zur Erzeugung des Zielgenvektors *Cx43K258stop*

Für die homologe Rekombination im *hprt*-markierten *cx43*-Allel des Ausgangsklones 53 sowie für die Erzeugung der gewünschten Mutation im *cx43* Locus musste der Zielgenvektor *Cx43K258stop* (vgl. Abb. 4.11 und 4.12) folgende Eigenschaften aufweisen:

Verkürzte *cx43*-kodierende Region

Aus Mangel an geeigneten Restriktionsendonuklease-Schnittstellen wurde zur Klonierung der verkürzten *cx43*-kodierenden Region ein PCR-Mutagenese-Ansatz gewählt. Für die Mutagenese-PCR wurden Startermoleküle entwickelt, die den gewünschten Bereich amplifizierten, am 3' Ende des PCR-Produkts eine neue *Cla* I Restriktionsschnittstelle einführen und zum Austausch des Adenins an Position 772 der kodierenden Region von *cx43* gegen ein Thymin führten (Abb.4.9).

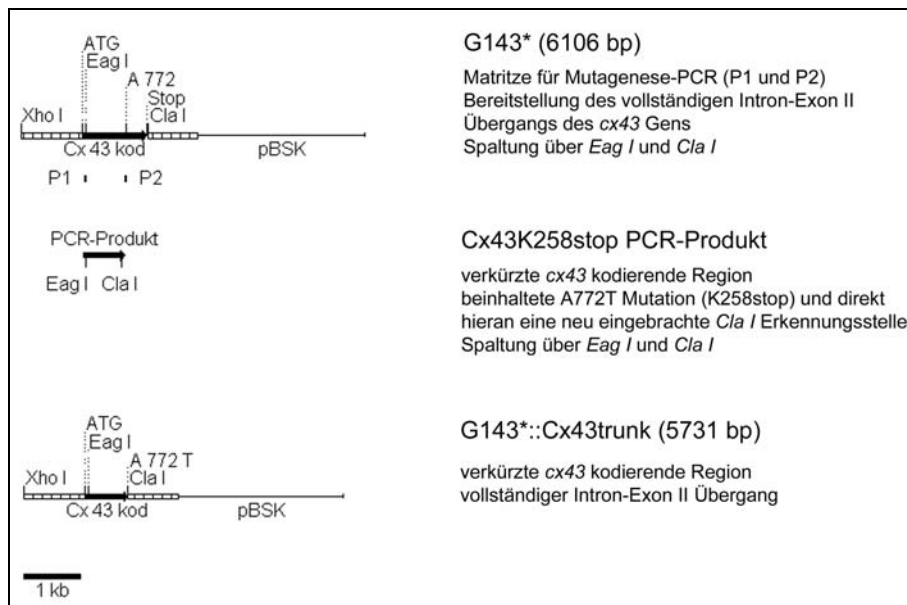


Abb. 4.9: PCR-Mutagenese und Wiederherstellung des *cx43* Intron-Exon II Übergangs

P1: Starter-Oligonukleotid 43-trun-03; P2: Starter-Oligonukleotid 43-trun-04, Sequenz beinhaltet A772T Mutation sowie die neu einzubringende Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease *Cla* I. Für die Erzeugung des gewünschten Amplikons wurde *G143** Plasmid-DNS als Matrize eingesetzt. Zur Synthese wurde das PCR-Programm „Cloning *Cx43K258stop*“ verwendet.

Wiederherstellung des Intron-Exon II Bereiches

Gegenüber den Zielgenvektoren *Cx43 target.1-2* (Plum et al., 2000) sollte der Vektor *Cx43K258stop* einen korrigierten 5' Homologiebereich besitzen, um die fehlenden 397 bp aus dem Intron-Exon II Übergang wieder einzubringen (vgl. verkürztes *cx43* Intron in *pcx43Ki hprt* und *hprt*-markiertem *cx43* Allel in Abb. 4.8). Diese Basenpaare sind essentiell, da sie die Spleißakzeptorstelle, den pyrimidinreichen Abschnitt und die Verzweigungsstelle für die Ausbildung des Lariats beim Spleißen der *cx43* prä-mRNA beinhalten. Die Deletion

wurde behoben, indem das PCR-Produkt der verkürzten *cx43* kodierenden Region zunächst nach einer *Eag I/Cla I*-Restriktionsspaltung in den Vektor *G143** (ausführliche Vektorkarte im Anhang) eingebracht wurde, welcher den vollständigen *cx43* Intron-Exon II beinhaltet (vgl. Abb. 4.9 und 4.11).

Ausreichend große Homologiebereiche und Linearisierbarkeit

Für eine effiziente homologe Rekombination sind 5-8 kb genomische Sequenz nötig (Stacey, 1996). Da die zuvor beschriebenen Einschränkungen behoben wurden, konnten die genomischen *cx43* Homologiebereiche aus einer modifizierten Version des Zielgenvektors *Cx43 target.2* verwendet werden, welcher bereits für das Einbringen der *cx32* kodierenden Region in den *cx43* Locus verwendet worden war (Plum et al., 2000). Dieser Vektor ließ sich unmittelbar vor Beginn des 5' Homologiebereiches statt durch *Sac I* (*Cx43 target.2*) durch *Not I* (*Cx43 target.2**, Theis et al., 2001) linearisieren (Abb. 4.10). Eine Linearisierung mittels *Sac I* hätte nicht erfolgen können, da sich innerhalb der verkürzten kodierenden Region von *cx43K258stop* zwei Erkennungsstellen für diese Restriktionsendonuklease befinden. Aus dem Vektor *G143*::Cx43trunk* sollte die verkürzte *cx43*-kodierende Region mit umgebender 5' untranslatierter Sequenz mittels *Xho I/Cla I* Restriktionsspaltung gewonnen und in den Zielgenvektor *Cx43 target.2** eingebracht werden.

Die ersten beiden Punkte wurden bereits durch Klonierungen innerhalb der Diplomarbeit (Maass, 1999) erfolgreich durchgeführt. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war somit nur noch das Einbringen der verkürzten *cx43* kodierenden Region mit stromaufwärtsliegendem Intron-Exon II-Bereich in den mittels *Not I* linearisierbaren Vektor *Cx43 target.2** (ausführliche Vektorkarte im Anhang) durchzuführen.

Der resultierende Vektor *Cx43K258stop* sollte somit die verkürzte *cx43* kodierende Region, den *cx43* Intron-Exon II Übergang und insgesamt 6,6 kb flankierende genomische Sequenz für die homologe Rekombination im *cx43*-Locus besitzen und mittels *Not I* am Beginn der 5' Homologie linearisierbar sein.

4.II.1.2 Herstellung des Basis-Homologievektors *Cx43 target.2***

Zum gerichteten Einbringen der verkürzten *cx43* kodierenden Region und des *cx43* Intron-Exon II Übergangs wurde im Vektor *Cx43 target.2* eine der vorhandenen *Xho I*-Erkennungsstellen entfernt. Von einem der nach Transformation erhaltenen bakteriellen Klone wurden größere Mengen Plasmid-DNS (Midi-Präparation) gewonnen und restriktionsanalytisch überprüft (Abb. 4.10 und Tabelle 4.1).

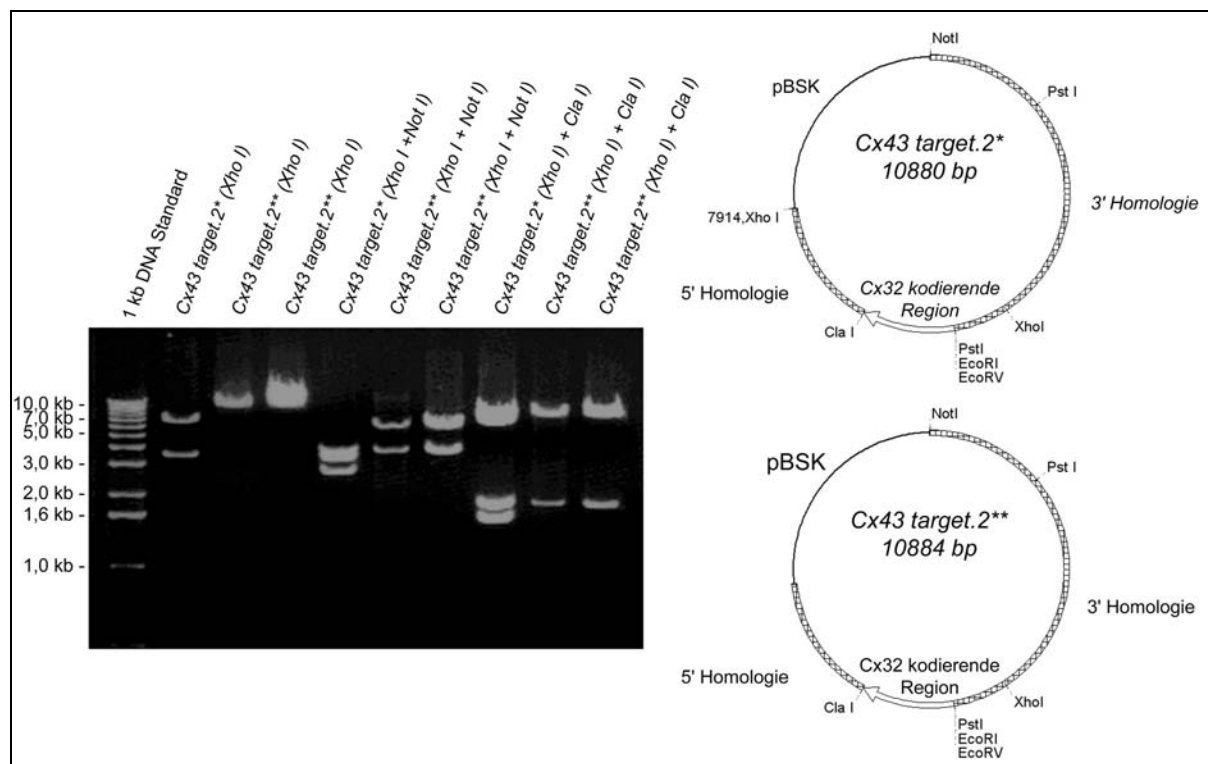


Abb. 4.10: Erzeugung und Überprüfung des Basis-Homologievektors *Cx43 target.2***

Zur Erleichterung der weiteren Klonierung wurde die *Xho I* Erkennungsstelle an Position 7914 des Zielgenvektors *Cx43 target.2** durch partiellen Verdau, Auffüllen der 5' überhängenden Enden und Religation entfernt. Zur Überprüfung auf Entfernen der gewünschten Erkennungsstelle wurden Ausgangsplasmid und zwei erhaltene Plasmidklone mit *Xho I*, *Xho I* und *Not I* sowie mit *Xho I* und *Cla I* restriktionsanalytisch überprüft. Erwartete Fragmentgrößen: siehe Tabelle 4.1.

Tabelle 4.1: Fragmentgrößen der Überprüfungsrestriktionen von *Cx43 target.2 und *Cx43 target.2*****

Restriktasen	<i>Cx43 target.2*</i> Fragmentgrößen	<i>Cx43 target.2**</i> Fragmentgrößen
<i>Xho I</i>	7367 bp, 3513 bp	10880 bp (linearisiert)
<i>Xho I</i> und <i>Not I</i>	4406 bp, 3513 bp, 2961 bp	6474 bp, 4404 bp
<i>Xho I</i> und <i>Cla I</i>	7367 bp, 1875 bp, 1638 bp	9005 bp, 1875 bp

4.II.1.3 Klonierung des Zielgenvektors *Cx43K258stop*

Da sich der letzte Klonierungsschritt trotz mehrmaligen Wiederholens nicht über eine vollständig gerichtete Zusammenführung zweier *Cla I* und *Xho I* gespaltener DNS-Fragmente durchführen ließ, wurde die Klonierung halb-gerichtet durchgeführt. Dazu wurden der Vektor *G143*::Cx43trunk*, welcher den *cx43* Intron-Exon II Übergang und die *cx43K258stop*-kodierende Region enthielt, und der Basis-Homologievektor *Cx43 target.2*** zunächst über Spaltung mit *Xho I* eröffnet. Die 5' überhängenden Enden wurden aufgefüllt, und die linearisierten Vektoren wurden mit *Cla I* gespalten (Abb. 4.11). Das 1,8 kb große Fragment der Restriktion von *G143*::Cx43trunk* sowie das 9,0 kb große Restriktionsfragment des Vektors *Cx43 target.2*** wurden anschließend zusammengeführt. Hierdurch wurde der Zielgenvektor *Cx43K258stop* erzeugt.

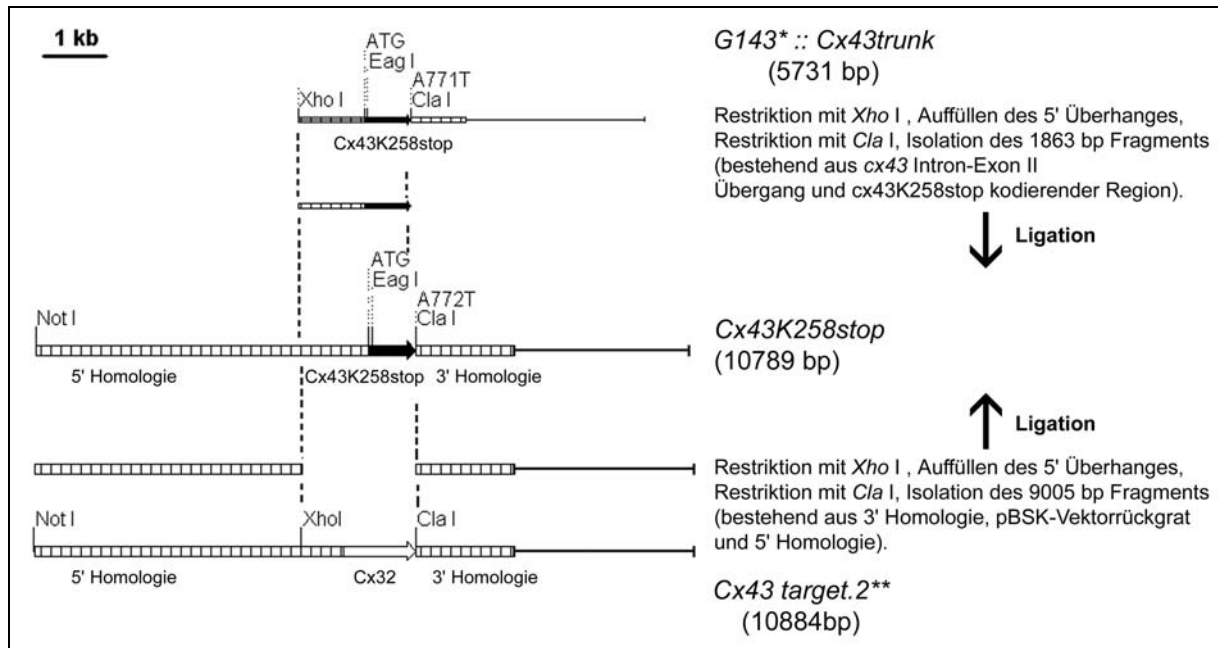


Abb. 4.11: Klonierung des Zielgenvektors *Cx43K258stop*

4.II.1.4 Überprüfung des Zielgenvektors *Cx43K258stop*

4.II.1.4A Restriktionsanalyse des Zielgenvektors

Restriktionsanalytik und zugehörige Vektorkarte der nach bakterieller Transformation erhaltenen Plasmid-DNS des Zielgenvektors *Cx43K258stop* sind in Abb. 4.12 und Tabelle 4.2 zu sehen. Eine bezüglich Restriktionsendonukleasen-Erkennungsstellen ausführlichere Vektorkarte findet sich im Anhang ().

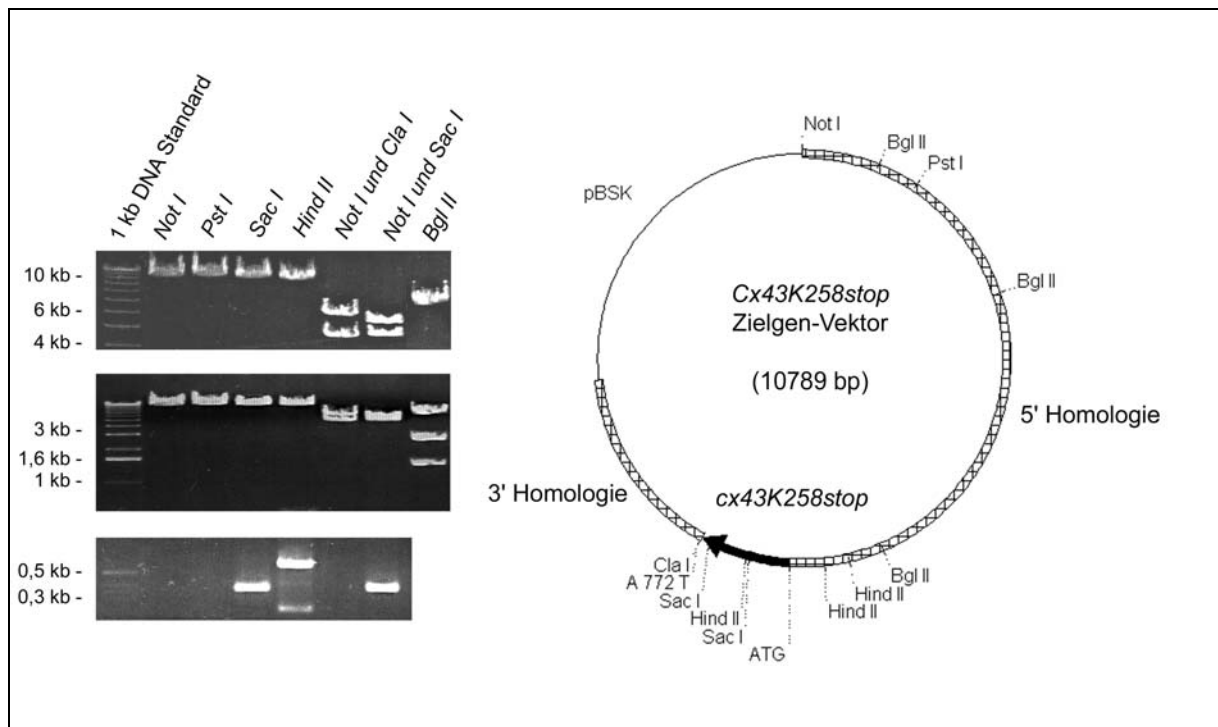


Abb. 4.12: Vektorkarte und Überprüfung des Zielgenvektors *Cx43K258stop* mittels Restriktasen

Tabelle 4.2: Fragmentgrößen der Überprüfungsrestriktionen von *Cx43K258stop*

Restriktasen	<i>Cx43K258stop</i> Fragmentgrößen
<i>Not</i> I	10789 bp (linearisiert)
<i>Pst</i> I	10789 bp (linearisiert)
<i>Sac</i> I	10442 bp, 347 bp
<i>Hind</i> II	9930 bp, 650 bp, 209 bp
<i>Not</i> I und <i>Cla</i> I	6271 bp, 4518 bp
<i>Not</i> I und <i>Sac</i> I	5835 bp, 4752 bp, 347 bp
<i>Bgl</i> II	6730 bp, 2559 bp, 1500 bp

4.II.1.4B Sequenzierung des Zielgenvektors

Der Zielgenvektor *Cx43K258stop* wurde unter Zuhilfenahme der bereits in der Diplomarbeit (Maaß, 1999) verwendeten Startermoleküle kommerziell sequenziert. Es wurden der Intron-Exon II Übergang, die Einbringung der Adenin zu Thymin Transversion an Position 772 der kodierenden Region zur Erzeugung der K258stop Mutation, das Einbringen der neuen *Cla* I Restriktionserkennungsstelle und der Übergang zum 3' untranslatierten Bereich überprüft. Es wurden keine Abweichungen von der erwarteten Sequenz gefunden (vgl. Anhang).

4.II.2 Herstellung des PCR-Testvektors "*PCR-Cx43K258stop*"

4.II.2.1 Klonierungsstrategie zur Herstellung des PCR-Testvektors *PCR-Cx43K258stop*

Die Polymerasekettenreaktion kann neben der Southern Blot-Hybridisierung dazu verwendet werden, genomische DNS auf homologe Rekombination eines Zielgenvektors zu untersuchen.

Der PCR-Testvektor, der zunächst für die Etablierung der PCR und später als Positivkontrolle der jeweiligen PCR-Reaktionen zur Analyse potentiell homolog rekombinierter ES-Zellklone verwendet wurde, sollte folgende Kriterien erfüllen:

1. gleicher Übergang zwischen 3' Bereich der verkürzten *cx43* kodierenden Region und der *cx43* 3' untranslatierten Region wie im Zielgenvektor *Cx43K258stop*. Aus dem stromaufwärts zur eingebrachten Mutation liegenden Bereich der kodierenden Region wurde das 5' bindende Startermolekül der PCR entwickelt.
2. Der 3' untranslatierte Bereich des *cx43*-Gens sollte gegenüber dem Fragment, das im Zielgenvektor *Cx43K258stop* als kurze Homologie eingesetzt wurde, im 3' Bereich verlängert sein. Aus dieser erweiterten Region wurde das 3' bindende Startermolekül der PCR abgeleitet.

Würde die PCR mit der genomischen DNS isolierter ES-Zellklone durchgeführt, erhielte man durch die Lage der Startermoleküle für das *cx43* Wildtyp Allel ein um etwa 400 bp größeres Amplikon als für das *cx43K258stop* Allel. Da in jedem Fall zumindest ein Amplikon gebildet

wird, ist somit auch die Möglichkeit des Verlustes von homolog rekombinierten ES-Zellklonen durch den Ausfall einzelner PCR-Reaktionen ausgeschlossen.

4.II.2.2 Klonierung des PCR Testvektors *PCR-Cx43K258stop*

Ausgangsvektoren für die Klonierung des PCR-Testvektors *PCR-Cx43K258stop* waren die Plasmide *Cx43 Sac I/Hind III* und *G143*::trunkCx43*. Die erweiterte 3' Homologie wurde über die unmittelbar an die *cx43K258stop* Mutation anschließende *Cla I* Restriktionstelle eingebracht (Abb 4.13). Der auf diese Weise erzeugte Vektor *PCR-Cx43K258stop* enthält somit den gleichen Übergang zwischen verkürzter *cx43* kodierender Region und *cx43*-3' untranslatiertem Bereich wie der Zielgenvektor *Cx43K258stop*. Zudem war die *Cx43*-3' untranslatierte Region gegenüber dem Zielgenvektor um 549 bp verlängert.

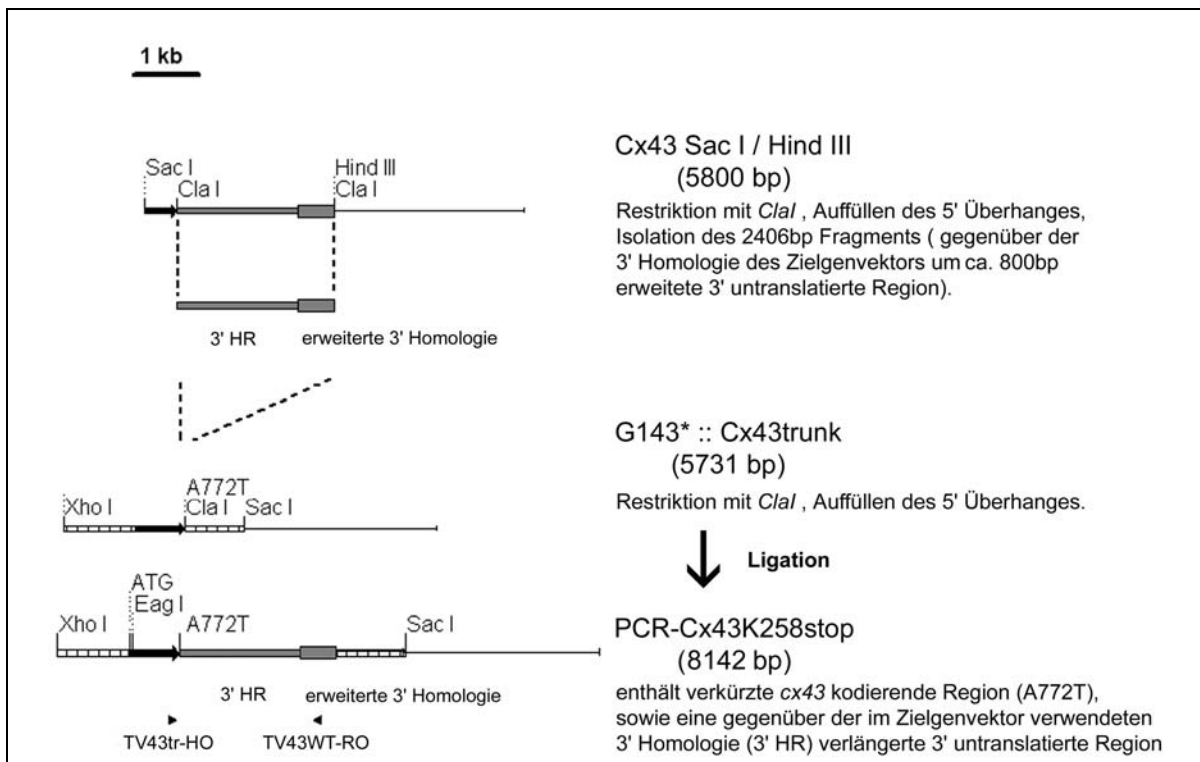


Abb. 4.13: Klonierung des PCR-Testvektors *PCR-Cx43K258stop*

4.II.2.3 Überprüfung des PCR-Testvektors mittels Restriktionsanalyse

Die Plasmid-DNS der nach Transformation erhaltenen bakteriellen Klone wurde mittels Restriktionsanalyse auf Einbau des Fragmentes der erweiterten 5' untranslatierten Region und richtige Orientierung der verknüpften Fragmente untersucht (Abb. 4.14 und Tabelle 4.3).

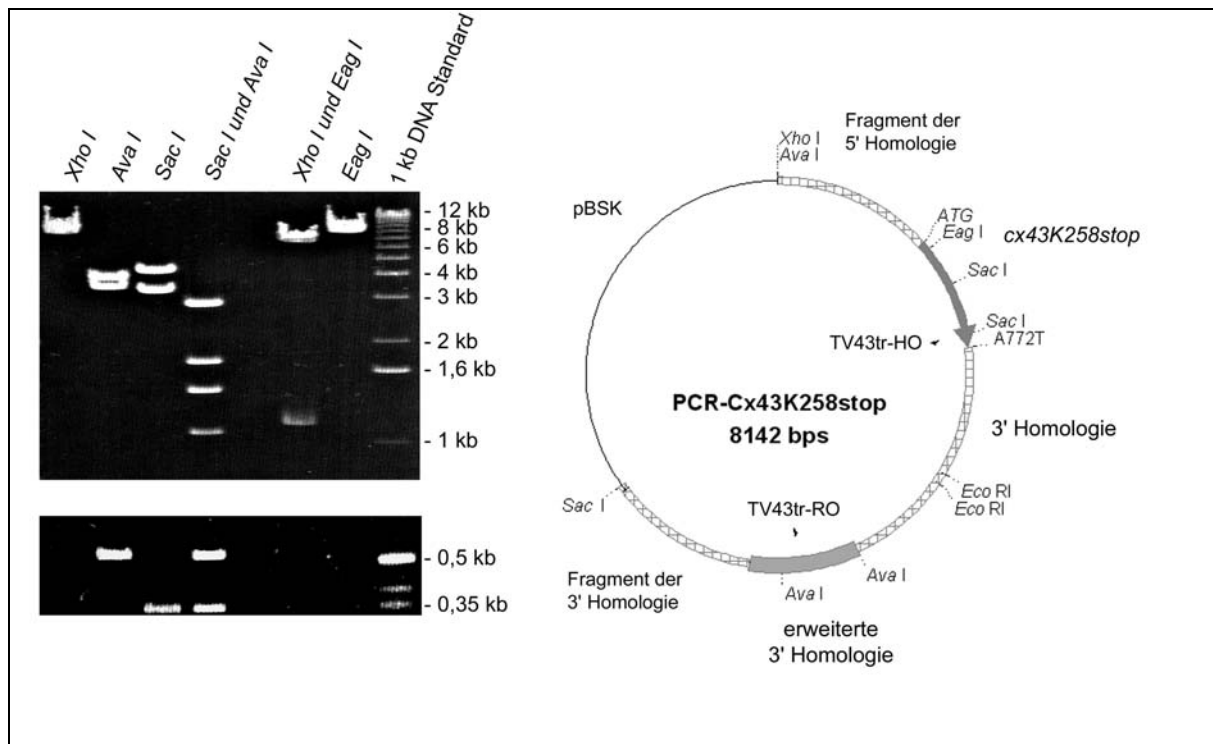


Abb. 4.14: Vektorkarte und Überprüfung des PCR-Testvektors *PCR-Cx43K258stop*

Tabelle 4.3: Fragmentgrößen der Überprüfungsrestriktionen von *PCR-Cx43K258stop*

Restriktasen	<i>PCR-Cx43K258stop</i> Fragmentgrößen
<i>Xho</i> I	8142 bp (linearisiert)
<i>Ava</i> I	4073 bp, 3520 bp, 549 bp
<i>Sac</i> I	4266 bp, 3329 bp, 347 bp
<i>Ava</i> I und <i>Sac</i> I	2841 bp, 1748 bp, 1425 bp, 1252 bp, 549 bp, 347 bp
<i>Xho</i> I und <i>Eag</i> I	6997 bp, 1145 bp
<i>Eag</i> I	8142 bp (linearisiert)

4.II.3 Etablierung der PCR Cx43K258stop

Für die PCR *Cx43K258stop* wurden die Startermoleküle TV43tr-HO und TV43tr-RO verwendet. TV43tr-RO hybridisiert im Bereich der erweiterten *cx43*-3' untranslatierten Region. Die Sequenz des im 5' Bereich bindenden Startermoleküls TV43tr-HO wurde unmittelbar stromaufwärts des Kodons K258 abgeleitet. Das durch die PCR mit dem Testvektor und später mit dem *cx43K258stop* Allel der genomischen DNS homolog rekombinierter Klone zu erhaltende Amplikon sollte eine Größe von rund 2,0 kb, das des *cx43 Wildtyp* Allels eine Größe von 2,4 kb haben. Mittels des etablierten PCR-Programms konnten Signale in Gegenwart von HM1-genomischer DNS bis zu einer Konzentration von mindestens 10 fg/ μ l eingesetzter Plasmid-DNS erreicht werden (siehe hierzu Abb. 4.15). Bei Anwesenheit von Wildtyp und Plasmid-DNS trat neben den erwarteten Signalen von 2,4 kb und 2,0 kb ein weiteres in der Höhe von 2,2 kb auf. Dabei handelte es sich vermutlich um ein Hybridmolekül aus einem Strang *cx43K258stop* und einem Strang *cx43* Amplikon, da die Gelelektrophorese nicht unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde. Die höhere

Signalintensität für das 2,0 kb Amplikon kann auf die bevorzugte Bildung dieses kleineren PCR-Produktes zurückgeführt werden.

4.II.4 Transfektion von ES-Zellen und Expansion 6-Thioguanin-resistenter Klone

Durch die Methode des doppelten Gensatzes wurde das *hprt*-Minigen im *cx43*-Locus gegen die *cx43K258stop*-Mutation der kodierenden Region des *cx43* Gens ausgetauscht. Insgesamt 288 6-Thioguanin resistente ES-Zellklone wurden zwischen Tag 7 und 13 der Selektion isoliert und auf Vertiefungen von 48-Loch-Kulturgefäßen überführt. Einunddreißig (siehe Tabelle im Anhang) der insgesamt einundvierzig mittels PCR-Analytik identifizierten homolog rekombinierten ES-Zellklone konnten weiter expandiert werden. Die restlichen ES-Zellklone ließen sich auf Grund ihres zu hohen Differenzierungsgrades nicht weiter kultivieren. ES-Zellklone wurden schließlich bis auf je einen T25 Kulturkolben und eine 10 cm Kulturschale expandiert. Die Zellen der T25 Kulturkolben wurden bis zum weiteren Gebrauch (Karyotypanalyse, Blastozysteninjektion) in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen der 10 cm Kulturschalen wurden zur Gewinnung genomischer DNS für die Southern Blot-Analyse verwendet.

4.II.5 Analyse der ES-Zellklone

Expandierte 6-Thioguanin resistente ES-Zellklone wurden im Folgenden charakterisiert:

1. Untersuchung auf homologe Rekombination des Zielgenvektors im *cx43*-Locus (4.II.5.1 und 4.II.5.3);
2. Feststellung des Euploidiegrads der homolog rekombinierten ES-Zellklone (4.II.5.2);
3. Untersuchung der homolog rekombinierten Klone auf Mehrfachintegration des Zielgenvektors *Cx43 K258stop* im ES-Zellgenom (4.II.5.3).

4.II.5.1 PCR-Analyse der 6-Thioguanin resistenten ES-Zellklone

Für die PCR-Analytik wurden jeweils 10 µl genomische DNS aus dem jeweiligen ES-Zellklon eingesetzt. Von 288 isolierten ES-Zellklonen zeigten 41 ein positives PCR-Signal. Da die Ethidiumbromid-Gelelektrophorese nicht unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde, erhielt man für homolog rekombinierte ES-Zellklone neben den erwarteten Signalen bei 2,4 kb für das Wildtyp-Amplikon und 2,0 kb für das *Cx43K258stop*-Amplikon auch ein Hybrid-Signal bei 2,2 kb (Abb. 4.14). Dies lässt sich durch die Hybridisierung aus einem einzelsträngigen DNS-Fragment eines *cx43* Wildtyp-Allel Amplikons und einem einzelsträngigen DNS-Fragment eines *cx43K258stop*-Allel Amplikons erklären. Da diese Hybridmoleküle auf 83 Prozent ihrer Gesamtlänge aus komplementären DNS-Einzelsträngen bestehen, verhalten sie sich in ihrer Laufeigenschaft in der

Ethidiumbromid-Agarosegelelektrophorese fast wie ein vollständig doppelsträngiges DNS-Molekül.

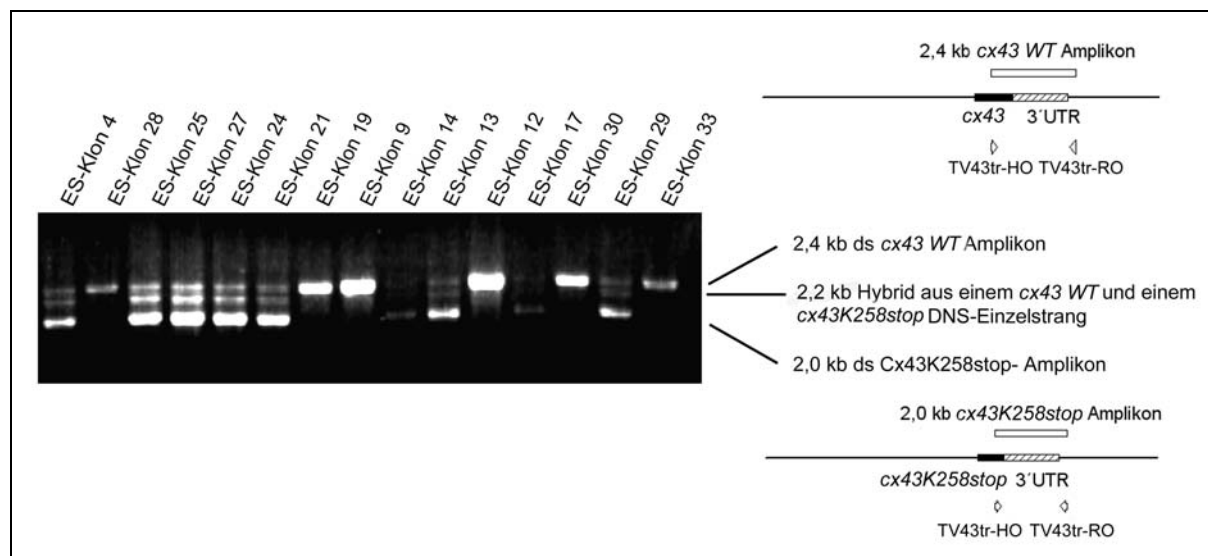


Abb. 4.15: Überprüfung der homologen Rekombination des *cx43K258stop*-Allels im *cx43* Locus von 6-Thioguanin resistenten ES-Zellklonen mittels PCR

Pro Tasche wurden 25 µl PCR-Reaktion mit genomischer DNS der angegebenen ES-Zellklone aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zu erkennen sind sechs Wildtyp-Revertanten, die ausschließlich ein Signal für das *cx43* Wildtyp-Allel von 2,4 kb Größe aufweisen (ES-Klone 28, 19, 9, 12, 30 und 33). Die übrigen ES-Zellklone zeigen zusätzliche Signale bei 2,0 und 2,2 kb. Diese Signale entsprechen doppelsträngigen DNS Fragmenten des *cx43K258stop*-Allels (2,0 kb) sowie einem Hybridfragment aus einem Strang *cx43* Wildtyp-Allel Amplikon und einem Strang *cx43K258stop*-Allel Amplikon (2,2 kb). Diese Klone haben somit ein Allel *cx43K258stop* homolog im *cx43* Locus rekombiniert. Entsprechend der Varianz in der Konfluenz der jeweils verwendeten ES-Zellklone zum Zeitpunkt der Gewinnung der genomischen DNS sind Unterschiede in der PCR-Signalintensität sowohl innerhalb der Wildtyp-Revertanten (vgl. ES-Zellklone 28 und 12) als auch innerhalb der homolog rekombinierten ES-Zellklone (vgl. ES-Zellklone 14, 29 und 27) zu erkennen.

4.II.5.2 Karyotyp-Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellklone

Auf Grund schlechter Erfahrungen mit mittels doppeltem Genersatz erhaltenen homolog rekombinierten ES-Zellklonen (Diplomarbeit Maass, 1999) wurden die nach PCR-Analytik homolog rekombinierten Klone zunächst auf ihren Euploidiegrad überprüft. Es wurden nur diejenigen ES-Zellklone analysiert, die zum Zeitpunkt des Einfrierens die beste Zellmorphologie in Form der Erhaltung eines undifferenzierten Erscheinungsbildes hatten (vgl. Anhang). Zur Karyotyp-Analyse wurden 10 Metaphasen-Kerne pro ES-Zellklon ausgewertet (Abb. 4.16 und Tabelle 4.4). ES-Zellklon 63 (Tabelle 4.4 und Abb. 4.16) wurde auf Grund des hohen Euploidiegrades für die Blastozysteninjektion ausgewählt.

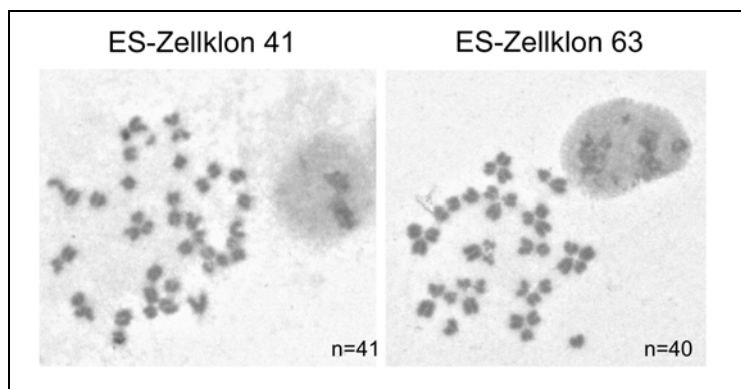


Abb. 4.16: Karyotyp-Analyse

Giemsa gefärbte Metaphasen Chromosomensätze wurden unter 63facher Objektiv-Vergrößerung fotografiert und ausgezählt. Während die meisten ES-Zellklone eine Anhäufung aneuploider Kerne mit 41-42 Chromosomen zeigten (siehe ES-Zellklon 41), zeigte ES-Zellklon 63 einen 90 prozentigen Euploidiegrad von 40 Chromosomen pro Kern.

Tabelle 4.4: Karyotyp-Auswertung von homolog rekombinierten ES-Zellklonen

ES-Zellklon	ausgezählte Metaphasen	Prozentsatz euploider	Fehler
	Kerne	Metaphasen Kerne	
13	8	12,5 %	+/-12,5 %
25	7	28 %	+/-14 %
29	9	22 %	+/-11 %
31	9	22 %	+/-11 %
41	10	40 %	+/-10 %
51	10	20 %	+/-10 %
63	10	90 %	+/-10 %
103	10	0 %	+/-10 %

4.II.5.3 Southern Blot-Analysen des homolog rekombinierten ES-Zellklones 63

Der ausgewählte ES-Zellklon 63 wurde mittels Southern Blot Hybridisierung auf einfache Integration und nochmals auf homologe Rekombination des Zielgenvektors im *cx43* Locus überprüft. Dazu wurde jeweils *Hind* III gespaltene genomische DNS von HM1 Wildtyp ES-Zellen, von ES-Zellklonen mit einem *cx43 Ki hpri*-Allel und von ES-Zellklon 63 untersucht (Abb. 4.17). Für Hybridisierungen mit der externen Sonde aus dem Bereich stromabwärts zur verwendeten *cx43* 3' homologen Region wurde für das *cx43 Wildtyp*-Allel ein Signal in der Fragmentgröße von 4,8 kb, für das *hpri*-markierte *cx43*-Allel in der Größe von 2,4 kb und für das *cx43K258stop*-Allel in der Größe von 4,4 kb erwartet. Für Hybridisierungen mit der internen Sonde, gewonnen aus den ersten 700 bp der kodierenden Region des *cx43* Gens, wurden Signale in der Höhe der Fragmentgröße von 4,8 kb für das *cx43 Wildtyp*-Allel und 4,4 kb für das *cx43K258stop*-Allel erwartet. Eine Zusammenfassung der zu erwartenden Fragmentgrößen sowie die entsprechend erhaltenen Southern Blot Signale bei Hybridisierung mit externer oder interner Sonde sind in Abb. 4.17 dargestellt. Durch die Ergebnisse der

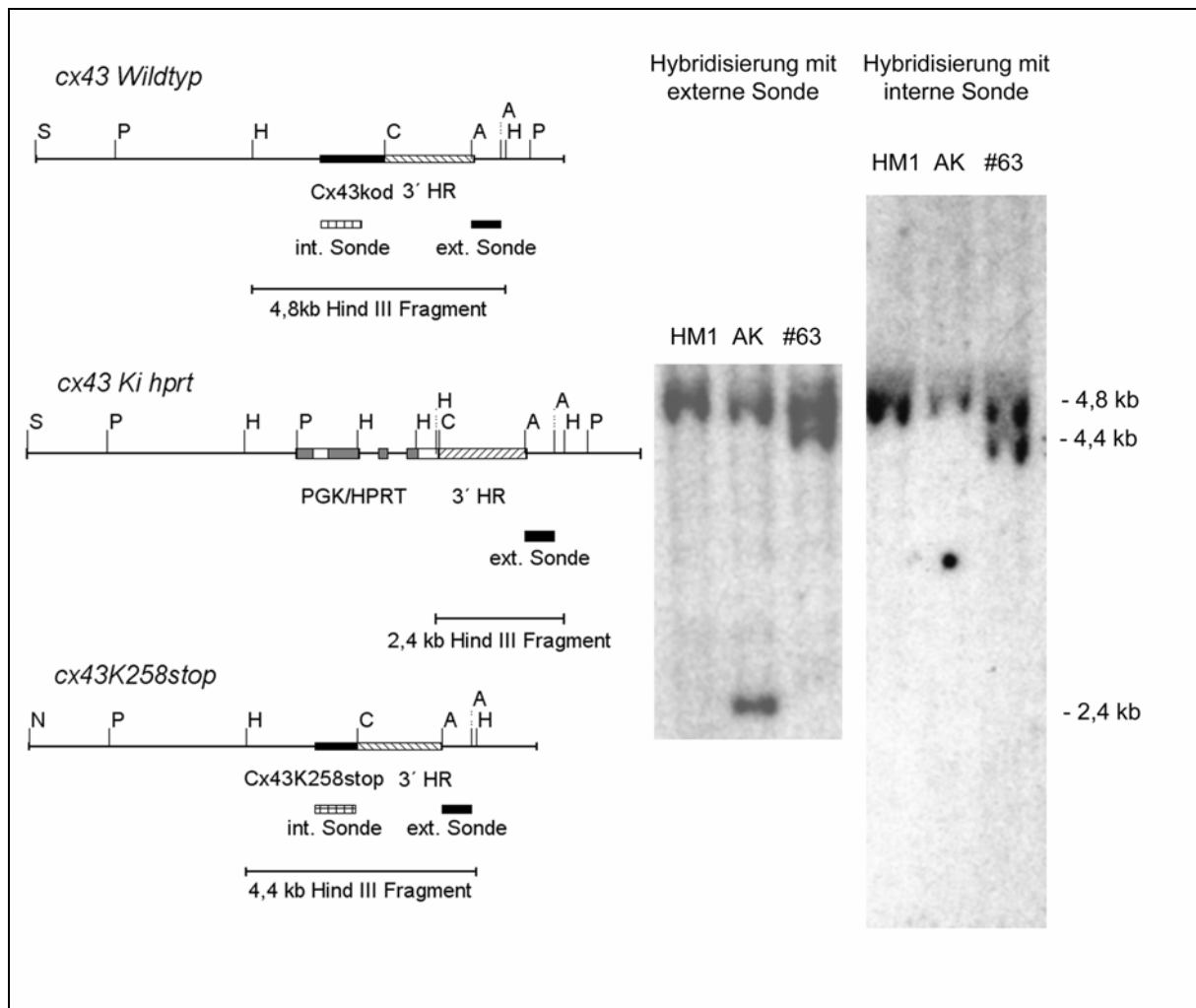


Abb. 4.17: zu erwartende Hybridisierungssignale und Ergebnisse der Southern Blot Analytik

Signale bei Hybridisierung mit externer Sonde: 4,8 kb (*cx43* Wildtyp-Allele), 2,4 kb (*hpri*-markiertes *cx43* Allele) oder 4,4 kb (für *cx43K258stop*-Allel). Signale bei Hybridisierung mit interner Sonde: 4,8 kb (*cx43* Wildtyp-Allel) oder 4,4 kb (für *cx43K258stop*-Allel).

HR: homologe Region, PGK/HPRT: *Hypoxanthin- phosphoribosy- transferase*-Minigen unter Phosphoglycerat-Kinase-Promotor, kod: kodierende Region; int: intern, ext.: extern, S: *Sac* I, P: *Pst* I, H: *Hind* III, C: *Cla* I, A: *Ava* I, N: *Not* I, HM1: *Hind* III gesplattene genomische DNS von HM1 Wildtyp ES-Zellen, AK: *Hind* III gesplattene genomische DNS von Ausgangsklon 53, #63: *Hind* III gesplattene genomische DNS von ES-Zellklon 63

Southern Blot Hybridisierung mit externer Sonde wurde die homologe Rekombination des Zielgenvektors im *cx43* Locus bestätigt. Die gleichstarke Intensität beider Signale schließt zudem aus, dass es sich um einen Mischklon aus Wildtyp Revertant und homolog rekombiniertem ES-Zellklon handelt, da in diesem Fall das *cx43* Wildtyp Signal eine stärkere Intensität aufgewiesen hätte. Die Ergebnisse der Hybridisierung mit interner Sonde schließen sowohl Mehrfachintegration im *cx43* Locus als auch weitere zufällige Integrationen des Zielgenvektors im Genom des ES-Zellklones #63 aus.

4.II.6 Erzeugung und Zucht von transgenen Mäusen mit verkürzter *cx43* kodierender Region

Nach Überprüfung des ES-Zellklons 63 hinsichtlich homologer Rekombination und Euploidie wurden aus diesen ES-Zellen mittels Blastozysteninjektion zunächst chimäre Mäuse erzeugt, aus denen schließlich die transgene Mauslinie Cx43K258stop etabliert und resultierende Tiere für Versuchszwecke eingesetzt wurden.

4.II.6.1 Erzeugung von chimären Tieren mittels Blastozysteninjektion homolog rekombinierter ES-Zellen

Im Zeitraum der vorliegenden Arbeit wurden zwei Reihen von Blastozysteninjektionen mit dem homolog rekombinierten HM1 Zellklon 63 durchgeführt. Dazu wurde dieser Zellklon je drei Tage pro Woche injiziert (Tabelle 4.5). Aus der ersten Reihe (10.-12.10.2000) kam es zu einer, aus der zweiten Reihe (07.-09.11.2000) zu drei Geburten. Von den 14 überlebenden Nachkommen aus Sv129P2/OlaHsd HM1-ES-Zellen und C57BL/6 Blastozysten zeigten zehn Tiere Fellfarben-Chimärismus (Abb. 4.18) zwischen 65 und 100 Prozent (Tabelle 4.6). Neun dieser Tiere waren Männchen. Nach Erreichen ihrer Geschlechtsreife wurden sie mit C57BL/6 Mäusen verpaart, wobei acht der Chimären (sieben Männchen und ein Weibchen) fertil waren und drei Männchen Keimbahn-Transmission der Cx43K258stop Mutation zeigten. Diese vererbten nach PCR-Analytik an 50 Prozent ihrer Nachkommen das mutierte *cx43K258stop* Allel. Keimbahn-Transmission lag dann vor, wenn Nachkommen einer Chimäre ein agouti-farbenes Fell besaßen.

Abb. 4.18: Cx43K258stop Chimäre

Chimäre E zeigte 100 Prozent Fellfarben-Chimärismus und war Keimbahn-Überträger der Cx43K258stop Mutation. Auf Grund des gemischten genomischen Hintergrundes (Sv129P2/OlaHsd) der embryonalen Stammzelllinie HM1, manifestierte sich die phänotypische Ausprägung in braunen (*agouti*) und weißen Anteilen des Fellkleides auf Grund verschiedener *agouti* Allele. Das *agouti*-Genprodukt, ein Polypeptid Antagonist des Melanocortin 1-Rezeptors, verschiebt phasenweise während des Haarwachszyklus die Pigmentproduktion von Eumelanin zu Phaemelanin (Jackson, 1997) Das Haarkleid erscheint hierdurch braun. Das *agouti* Gen kann in verschiedenen allelen Formen vorliegen, die jeweils zu einer veränderten Promotoraktivität führen, bis hin zu einer ständigen Produktion von Phaemelanin während des Haarwachstums. Dies kann zu einer gelb-weißlichen Fellfarbe führen (Duhl et al., 1994). Die Vorläuferzellen der Melanozyten entstammen der Neuralleiste und wandern während der Embryonalentwicklung in die Epidermis ein. Hierbei wandern relativ wenige Vorläuferzellen in den Rumpfbereich ein, so dass Nachkommen einer Neuralleistenzelle (eine Fellfarbe) einen sehr großen Bereich bevölkern können (Wilkie et al., 2002).



Tabelle 4.5: Durchgeführte Blastozysteninjektionen und Anzahl der chimären Tiere

Experiment	Datum der Injektion	Passagen-Anzahl der injizierten Zellen	Anzahl der pro Blastozyste injizierten Zellen	Anzahl der injizierten Blastozysten	Anzahl der in Ammen transferierten Blastozysten	Nachkommen (Anzahl der neonatal gestorbenen Tiere)	Anzahl der chimären Tiere (Geschlecht)
1 (S)	10.10.2000	38	19 +/- 2	39	20 und 19 in 2 Ammen	0	0
2 (S)	11.10.2000	39	19 +/- 2	20	20 in eine Amme	4 (2)	4 (m)
3 (S)	12.10.2000	38	15 +/- 2	24	12 in zwei Ammen	0	0
4 (N)	07.11.2000	42	21 +/- 2	48	24 in je 2 Ammen	2 (6)	1 (m)
5 (N)	08.11.2000	43	21 +/- 2	32	16 in je 2 Ammen	5 (7)	3 (m)
6 (N)	09.11.2000	43	21 +/- 2	21	21 in eine Amme	3 (6)	2 (m + w)

Pro Reihe wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen Injektionen in 3,5 dpc Maus-Blastozysten (C57BL/6) durchgeführt (Ina Fiedler).

S: Superovulation, N: Normalverpaarung, Amme: Scheinschwangere NMRI-Weibchen.

Tabelle 4.6: Beschreibung der erhaltenen Chimären

Chimäre	Geburt	Geschlecht	Anteil der Fellfarbe agouti	Fertilität	Keimbahn-Transmission
A	28.10.2000	männlich	100	ja	
B	28.10.2000	männlich	100	ja	ja
C	28.10.2000	männlich	100	ja	
D	28.10.2000	männlich	100	nein	
E	27.11.2000	männlich	100	ja	ja
F	27.11.2000	weiblich	85	ja	
G	25.11.2000	männlich	100	nein	
H	26.11.2000	männlich	70	ja	ja
I	26.11.2000	männlich	65	ja	
J	26.11.2000	männlich	70	ja	

4.II.6.2 Überprüfung transgener Mäuse mittels PCR-Analytik

Heterozygote Cx43K258stop Tiere wurden zunächst bis zur dritten Rückkreuzungsebene mit C57BL/6 Tieren verpaart. Später wurde auch die bereits bestehende Mauslinie Cx43del (Theis et al., 2001) ebenfalls zu mindestens 87,5 Prozent auf einen C57BL/6 genomischen Hintergrund rückgekreuzt. Diese Tiere exprimieren heterozygot nach genereller Deletion der kodierenden Region von *cx43* das Reportergen *lacZ*, welches für die β -Galaktosidase kodiert. Die unterschiedlichen allelen Formen des *cx43* Locus wurden mittels PCR-Analytik unterschieden (Abb. 4.19), wobei als Positivkontrolle die genomische DNS eines für die jeweilige Veränderung heterozygoten Tieres eingesetzt wurde. In der Cx43K258stop-PCR trat

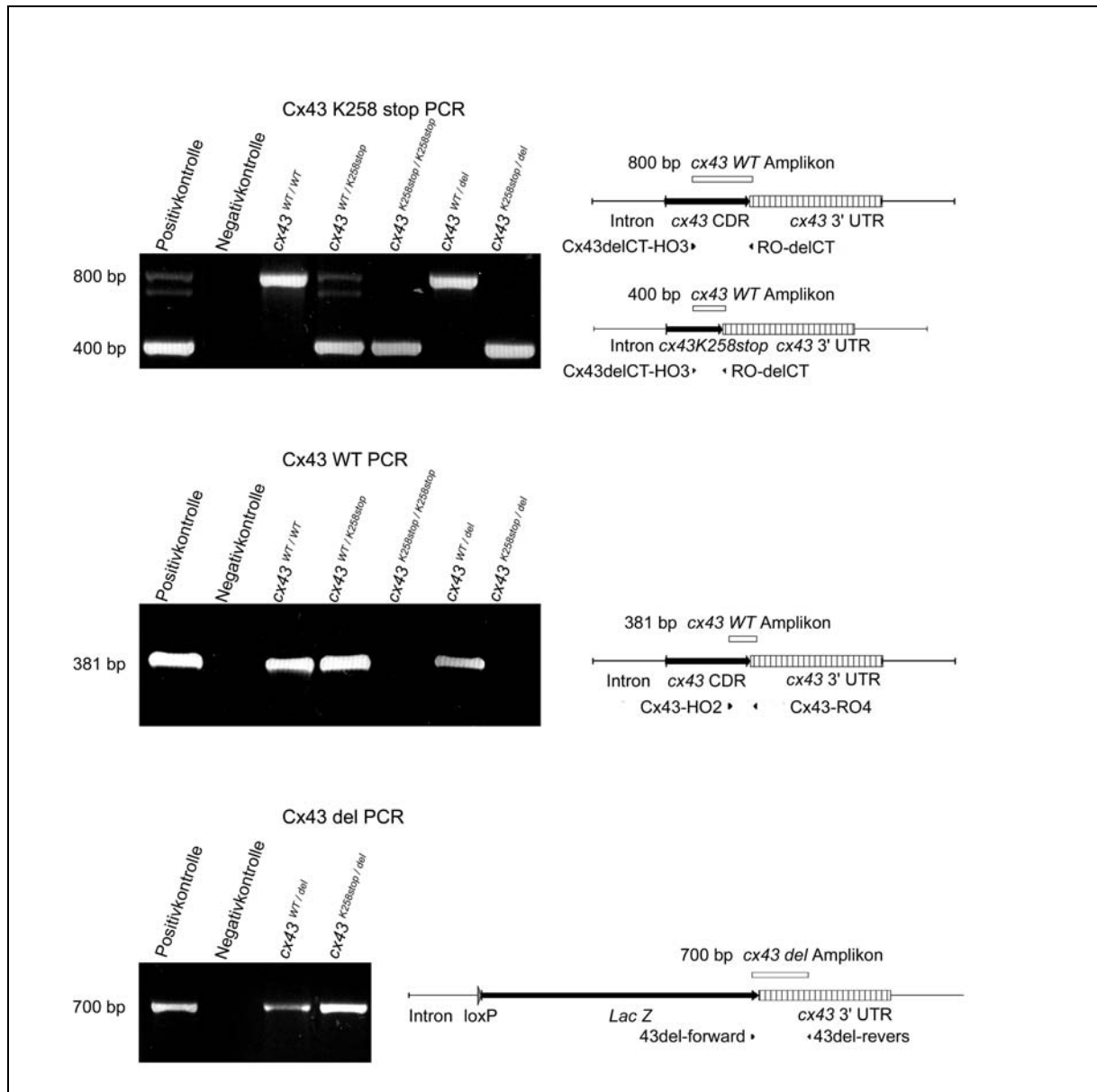


Abb. 4.19: PCR-Analytik transgener Mäuse

Genomische DNS transgener Tiere konnte mittels verschiedener PCR-Programme auf die verschiedenen allelen Formen des *cx43* Locus überprüft werden. In der **Cx43 K258stop PCR** wurde durch die Cx43delCT-HO3 und RO-delCT Startermolekül-Kombination für das *cx43 WT* Allel ein ca. 800 bp großes Amplikon und für das *cx43 K258stop* Allel ein ca. 400 bp großes Amplikon erzeugt. Da die PCR-Produkte nicht-denaturierend in Agarose-Gelelektrophoresen aufgetrennt wurden, wurde bei heterozygoten Tieren (vgl. Positivkontrolle und Genotyp *cx43^{WT/K258stop}*) ein zusätzliches Signal entsprechend eines doppelsträngigen DNS-Hybridmoleküles aus einem Einzelstrang *cx43 WT*- und einem Einzelstrang *cx43K258stop* Amplikon detektiert. In der **Cx43WT PCR** entstand nur in Anwesenheit eines *cx43WT* Allels, in der **Cx43del PCR** nur in Anwesenheit eines *cx43del*-Allels ein Amplikon.

wiederum bei heterozygoten Tieren ein zusätzliches Signal auf, entsprechend eines Hybridfragmentes aus einem Einzelstrang *cx43* Wildtyp-Amplikon (800 Basen) und einem Einzelstrang *cx43K258stop*-Amplikon (400 Basen). Da in diesem Fall nur 50 Prozent der Gesamtlänge aus komplementären DNS-Einzelsträngen bestand, verhielt sich das Hybridmolekül in seinem Laufverhalten in der Ethidiumbromid-Agarosegelelektrophorese nicht wie ein vollständig doppelsträngiges DNS-Fragment. Statt des Mittels von 600 bp zeigte

es ein Signal entsprechend eines doppelsträngigen DNS Fragmentes von rund 700 bp. Dies ist wahrscheinlich auf den Einfluß der rund 400 ungepaarten Basen des *cx43* Wildtyp-Amplikon Einzelstranges rückführbar. Das *cx43K258stop*-Amplikon zeigte eine höhere Signalintensität. Dies ist auf die bevorzugte Bildung dieses kürzeren Fragmentes und somit eine höhere Kopienanzahl rückführbar. Auf Grund der schwachen Signale für das *cx43 WT*-Amplikon wurde für potentiell homozygote *Cx43K258stop* Tiere zusätzlich die *Cx43WT* PCR durchgeführt. Durch die Hybridisierung des Sinn-Startermoleküls mit der *cx43* kodierenden Region in einem Bereich 3' zu Kodon 258 entstand somit für homozygote *Cx43K258stop* Tiere in dieser PCR kein Amplikon. Ein Amplikon in der Größe von 381 bp entstand nur bei Anwesenheit eines *cx43* Wildtyp Allels. In der *Cx43 del* PCR entstand nur bei Anwesenheit des *cx43 del* Allels ein rund 700 bp großes Amplikon, da das Sinn-Startermolekül aus der Sequenz des eingebrachten *lacZ* Gens abgeleitet wurde.

4.III Analyse der transgenen Mauslinie Cx43K258stop

4.III.1 Cx43K258stop Tiere zeigen eine stark reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit

Während heterozygote Cx43K258stop Tiere eine unveränderte Lebenserwartung zeigten, wurden bei Kreuzungen heterozygoter Tiere nicht die erwarteten 25 Prozent adulter homozygoter Cx43K258stop Tiere erhalten, sondern weniger als ein Prozent (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: Anzahl überlebender Tiere aus Heterozygoten-Verpaarungen in Abhängigkeit vom Genotyp

Gruppe	erw. Verhältnis	obs. Verhältnis	Anzahl an Tieren
überlebende Wildtyp Tiere	25 %	19,5 %	81
überlebende heterozygote Tiere	50 %	49,9 %	207
überlebende homozygote Tiere	25 %	0,7 %	3
postnatal letale Tiere	0 %	2,9 %	124

erw.: erwartet; obs.: beobachtet

Wurde der Prozentsatz an überlebenden Tieren entsprechend des Mendel'schen Verhältnisses für jeweils die Gesamtzahl an erwarteten Tieren berechnet (Abb. 4.20), ergaben sich für Wildtyp und heterozygote Cx43K258stop Tiere Überlebensraten von mindestens 75 Prozent. Von allen erwarteten homozygoten Cx43K258stop Tieren erreichten jedoch weniger als drei Prozent ein Alter von mindestens vier Wochen.

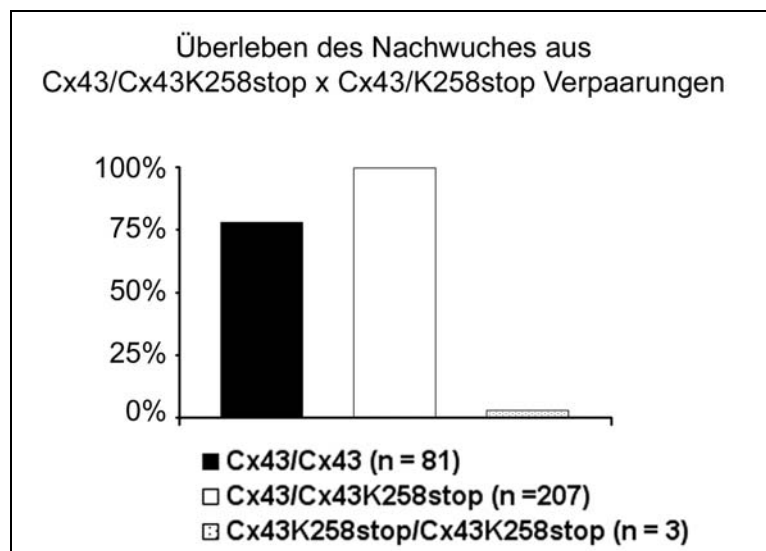


Abb. 4.20: Genotyp-korrelierte relative Überlebenswahrscheinlichkeit

Von allen geborenen Tieren (n=415) aus Cx43K258stop Heterozygoten-Verpaarungen überlebten von den insgesamt pro Genotypgruppe erwarteten Tieren über 75% aller Wildtyp und fast 100% aller heterozygoter Cx43K258stop Tiere. Von allen erwarteten homozygoten Cx43K258stop Tieren überlebten weniger als drei Prozent die ersten vier Lebenswochen.

4.III.2 DNS-, RNS- und Protein-Analytik an überlebenden adulten Cx43K258stop Tieren

4.III.2.1 Southern Blot-Analysen der genomischen DNS aus Cx43K258stop Tieren

Aus Lebergewebe adulter Tiere eines Wurfes wurde genomische DNS der drei verschiedenen Genotypen gewonnen und mittels *Hind* III gespalten. Elektrophoretisch aufgetrennte DNS-Fragmente wurden auf Nylonmembranen übertragen und mit radioaktiv markierten DNS-Fragmenten hybridisiert, die komplementär zu entweder einem genomischen Abschnitt 3' zur verwendeten 3' homologen Region (externe Sonde) oder aber zu den ersten 771 Basenpaaren der kodierenden Region (interne Sonde) waren (Abb. 4.21). Hierbei ergaben sich für das *cx43* Wildtyp Allel jeweils Hybridisierungssignale entsprechend DNS-Fragmenten von 4,8 kb Größe. Für das *cx43K258stop* Allel wurden die erwarteten Signale entsprechend einer Fragmentgröße von 4,4 kb nachgewiesen. Zusätzliche Signale waren sowohl bei Hybridisierung mit interner als auch mit externer Sonde nicht nachzuweisen. Auf Grund der schwächeren Konzentration der homozygoten genomischen Cx43K258stop DNS hatten die Hybridisierungssignale für diesen Genotyp eine schwächere Intensität.

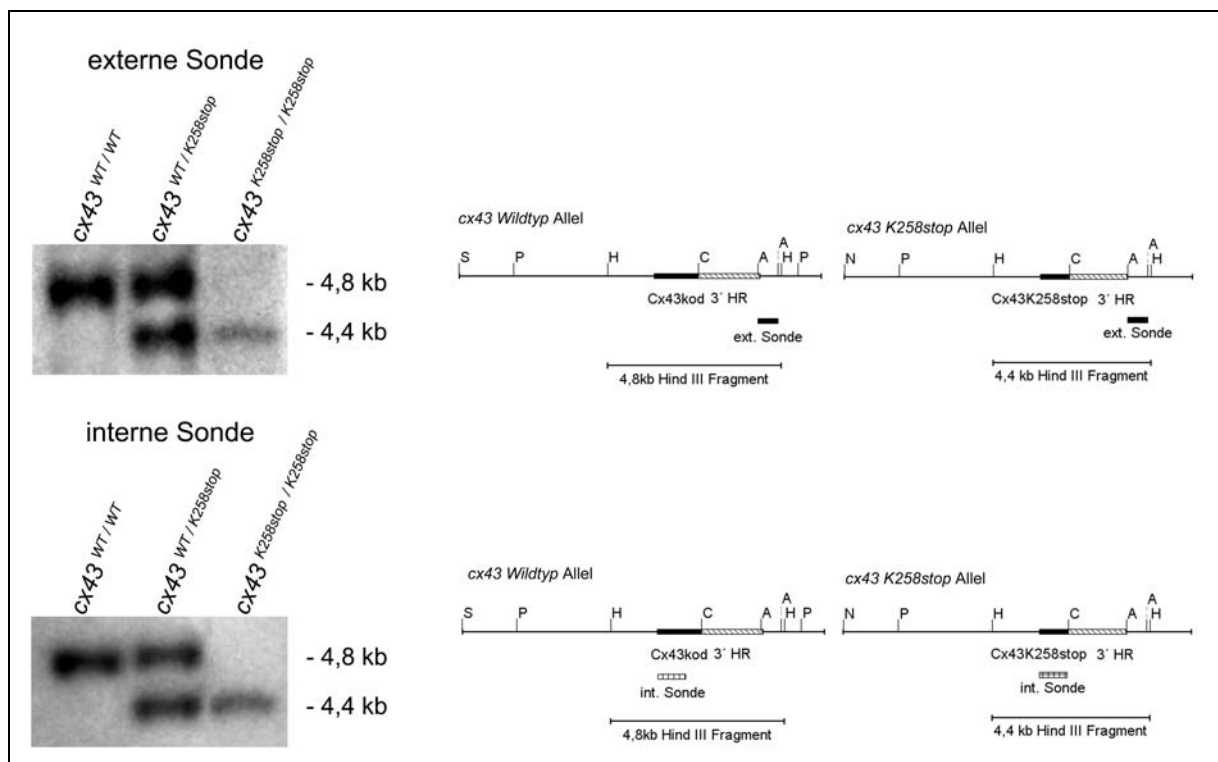


Abb. 4.21: Southern Blot-Analytik der genomischen DNS transgener Mäuse

Hind III gesplante genomische DNS von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Cx43K258stop Mäusen wurde Southern Blot-Hybridisierungen mit externer und interner Sonde unterzogen.

Da die aus der Leber von homozygoten Cx43K258stop Tieren gewonnene genomische DNS eine geringere Konzentration aufwies, war die Signalintensität für Hybridisierung mit externer und interner Sonde in diesem Genotyp schwächer. Zusätzliche Hybridisierungssignale neben den erwarteten von 4,8 kb für das *cx43* Wildtyp Allel und 4,4 kb für das *cx43K258stop* Allel traten nicht auf.

4.III.2.2 *Cx43K258stop* mRNA wird ebenso wie *cx43* mRNA exprimiert

Aus zwei Geweben mit hoher *cx43* Expression, Herz und Gehirn, sowie einem Gewebe mit schwacher *cx43* Expression, Leber, wurde Gesamt-RNS isoliert und einer Northern Blot-Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, zum *cx43* 3' UTR komplementären Sonde

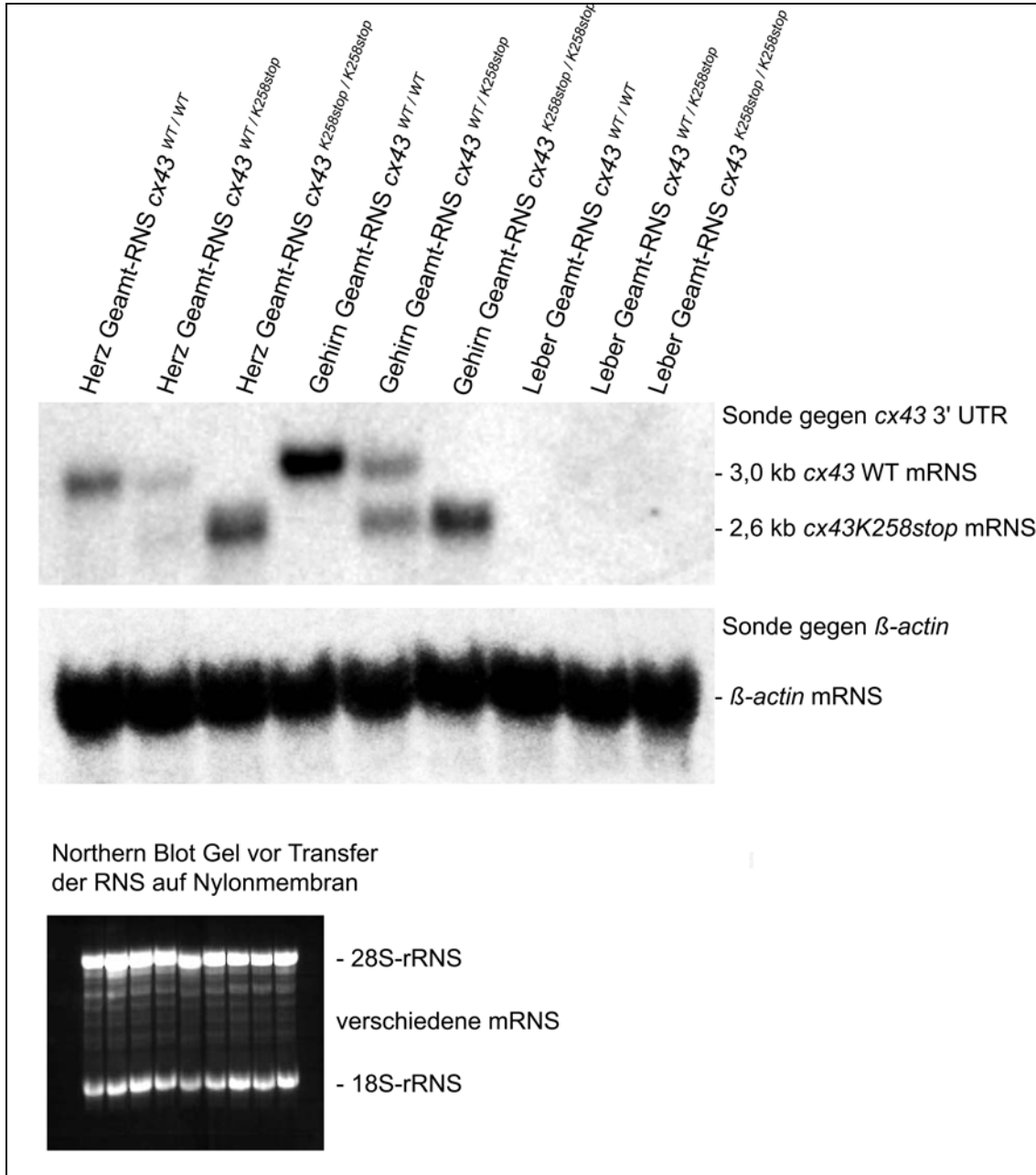


Abb. 4.22: Northern Blot-Analyse an adultem Herz-, Gehirn- und Leber-Gewebe

Gesamt-RNS wurde aus Herz, Gehirn und Leber adulter Geschwistertiere der Genotypen *Cx43* Wildtyp, *Cx43K258stop* heterozygot und homozygot gewonnen. 10 μ g mit Ethidiumbromid versetzte Gesamt-RNS pro Gewebe und Genotyp wurden in einem MOPS-gepufferten Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Durch UV-Fotodokumentation wurde mittels der 28S- und 18S-rRNA Signale überprüft, dass die RNS-Mengen abgeglichen waren und dass kein Abbau erfolgt war. Hybridisierung der auf Nylonmembran übertragenen Gesamt-RNS mit einer gegen die *cx43* 3' UTR gerichteten 32 P-markierten Sonde führte zum Nachweis des 3,0 kb *cx43* WT mRNA, sowie des 2,6 kb *cx43K258stop* mRNA Signals in den erwarteten Intensitäten. Nachträglich wurde dieselbe Membran mit einer 32 P-markierten Sonde gegen β -actin hybridisiert, um den Einsatz abgeglichener Mengen Gesamt-RNS zu verifizieren.

unterzogen. Für Wildtyp und heterozygote Herz- und Gehirn-Gewebe wurde *cx43WT* mRNA als Hybridisierungssignal in der erwarteten Höhe von 3,0 kb nachgewiesen (Abb. 4.22). In heterozygotem und homozygotem *Cx43K258stop* Herz- und Gehirn-Gewebe wurde das *cx43K258stop* Transkript als Hybridisierungssignal in der erwarteten Höhe von 2,6 kb nachgewiesen. Die Transkription des verkürzten *cx43* Allels erfolgte in derselben Stärke wie für das *cx43WT* Allel. Beide Signale in heterozygoten Tieren wiesen dieselbe Intensität auf und ebenso waren die Signalintensitäten für das *cx43WT* und *cx43K258stop* Transkript in gleichen Geweben von Wildtyp und homozygotem *Cx43K258stop* Tieren gleichstark. In keinem Tier ließen sich bei kurzer Expositionszeit *cx43* Signale für Leber Gesamt-RNS nachweisen. Die Untersuchung gleich großer RNS Mengen wurde sowohl über die Analyse des für die Northern Blot-Analytik eingesetzten Gels mittels der Ethidiumbromid-Signale für 28 und 18S rRNS sowie über nachträgliche Hybridisierung der identischen Membran mit einer gegen β -actin mRNA gerichteten Sonde verifiziert.

4.III.2.3 Cx43K258stop Protein wird in einigen adulten Geweben schwächer als Cx43 exprimiert

Für die generelle Western Blot-Analyse wurden ebenfalls Herz und Gehirn als Gewebe mit hoher und Leber als Gewebe mit schwacher Cx43 Proteinexpression ausgewählt. Abgeglichene Mengen an Gesamt-Gewebelysat wurden zusammen mit HeLa-Zelllysaten von Cx43 und *Cx43K258stop* exprimierenden HeLa-Transfektanten mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membranen übertragen und zum einen mit den polyklonalen Antikörpern Cx43-L2 und zum anderen mit den polyklonalen Antikörpern Cx43-CS inkubiert (Abb. 4.23 A). Erstere sind gegen ein Epitop der zytoplasmatischen Schleife, die zweiten gegen ein Epitop der letzten Aminosäurereste der C-terminalen Domäne gerichtet. Die Western Blot-Analytik erfolgte radioaktiv mittels ^{125}I -markiertem Protein A (Abb. 4.23). In beiden Immunoblot-Analysen wurde Cx43 Protein in Wildtyp und heterozygotem Herz- und Gehirn-Gewebe sowie in HeLa-Cx43 Lysaten als Signal in Höhe von rund 43 kD nachgewiesen. Bei der Analyse mittels Cx43-L2 trat in diesen Geweben eine Hintergrundbande in Höhe von phosphoryliertem Cx43 Protein auf. Bei der Analyse mittels Cx-CS trat dieser Hintergrund nicht auf. Jedoch wurden im Gegensatz zu Cx43 Protein in HeLa-Lysaten, für Herz und Gehirn-Gewebe mit diesen Antikörpern keine phosphorylierte Cx43 Bande nachgewiesen. Dies könnte auf einen Verlust der Phosphorylierung bei der durchgeführten Lysatgewinnung hindeuten. Erwartungsgemäß erkannten die gegen die carboxyterminalen Region des Cx43 Proteins gerichteten Cx43-CS Antikörper die verkürzte *Cx43K258stop* Isoform nicht (Abb. 4.23 B). Für heterozygoten und homozygoten Herz und Gehirn-Gewebe konnte mittels der Antikörper Cx43-L2 das 28 kD Signal für *Cx43K258stop* Protein hingegen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der Signalintensität für Cx43

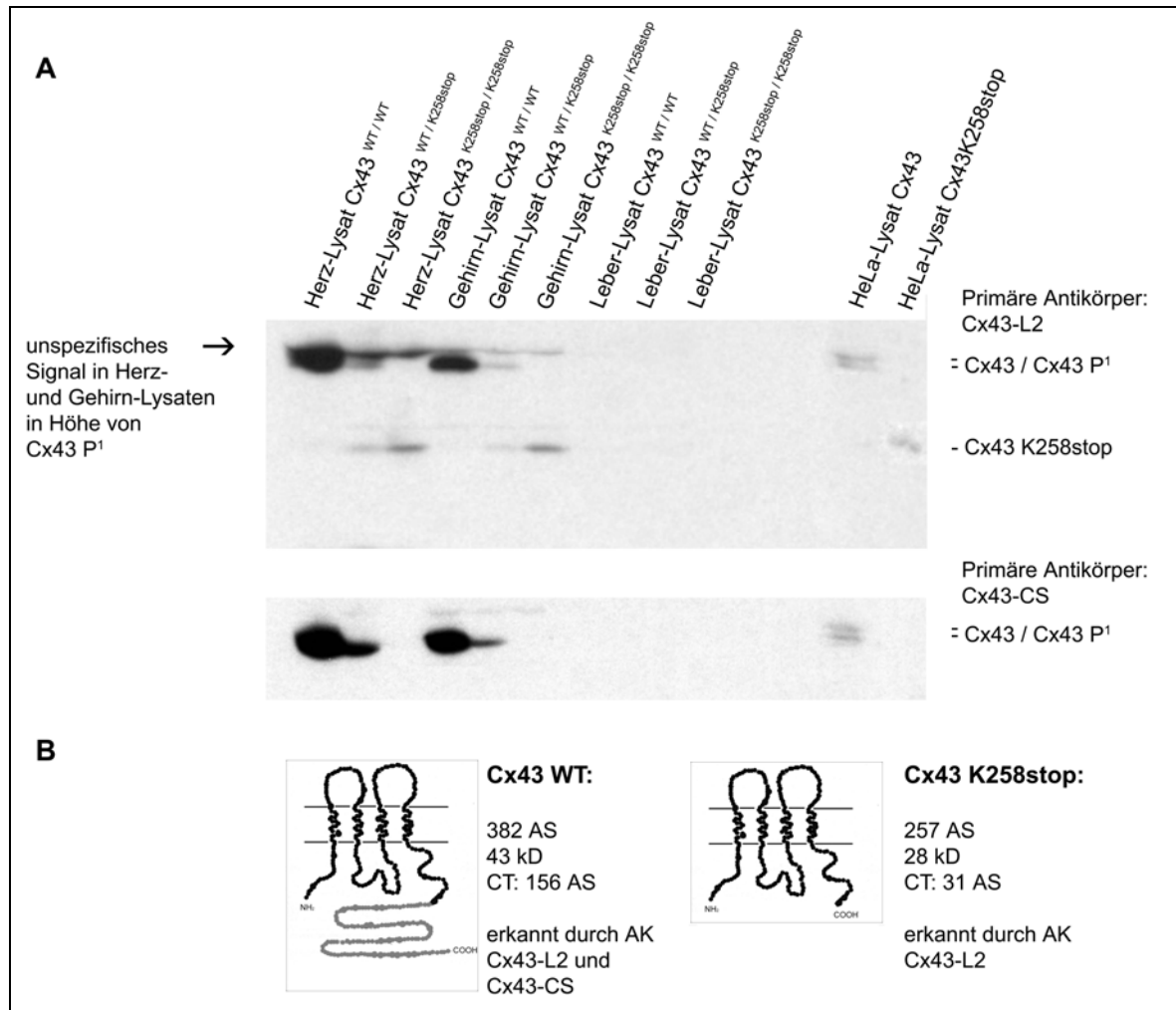


Abb. 4.23: Western Blot-Analyse für adultes Herz, Gehirn und Leber

A: Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf PVDF-Membranen mit den Antikörpern Cx43-L2 und Cx43-CS inkubiert. Immunreaktive Signale wurden nach Inkubation mit ¹²⁵I-markiertem Protein A mittels Autoradiographie nachgewiesen. Neben unspezifischen Signalen in der Höhe von Cx43-P¹ wurden mittels Cx43-L2 Signale für Cx43 und Cx43K258stop entsprechend den eingesetzten Genotypen in Herz- und Gehirn-Lysaten nachgewiesen sowie in HeLa-Lysaten. In Leber-Lysaten traten keine Signale auf. Mittels der Antikörper Cx43-CS ließen sich unphosphoryliertes Cx43 in Herz- und Gehirn-Lysaten von Wildtyp und heterozygoten Cx43K258stop Tieren, nicht aber in Leber-Lysaten nachweisen. Ebenfalls ließ sich in HeLa-Cx43 Lysaten einfach und nicht-phosphoryliertes Cx43 Protein nachweisen.

B: Schematische Darstellung der Proteine Cx43 und Cx43K258stop. Auf Grund der carboxyterminalen Verkürzung ließ sich Cx43K258stop nur mittels der Antikörper Cx43-L2 nachweisen, während sich das Cx43 Protein mit beiden Antikörpern immundetektieren ließ. AS: Aminosäurereste, CT: carboxyterminale Domäne; AK: Antikörper.

Protein in Wildtyp-Geweben, waren die Signale für Cx43K258stop in homozygotem Herz- und Gehirn-Gewebe deutlich schwächer. Zudem waren auch die Signale für Cx43 in heterozygoten Geweben deutlich schwächer als erwartet. Die Menge an Cx43 Protein, insbesondere im heterozygoten Gehirn-Gewebe, schien in der Analyse mittels Cx43-L2 und Cx43-CS jeweils weniger als die erwarteten 50 Prozent der in Wildtyp Tieren nachgewiesenen Menge zu sein. Die Signale für Cx43 und Cx43K258stop Protein waren innerhalb heterozygoten Tieren jedoch gleichstark. In Lebergewebe wurde mit beiden Antikörpern für keinen Genotyp ein Signal nachgewiesen.

4.III.3 Neugeborene Cx43K258stop Tiere zeigen makroskopische Auffälligkeiten

Beobachtung neugeborener Tieren aus der Verpaarung heterozygoter Cx43K258stop Eltern zeigte, dass einige Tiere ein verändertes Erscheinungsbild der Haut hatten (Abb. 4.24 A) und innerhalb der ersten Woche starben. PCR-Analytik wies diese als homozygot für die *cx43K258stop* Mutation aus (Abb. 4.24 B). Die Haut dieser Tiere war trockener, zeigte häufig Risse und großflächige Abschuppungen. Besonders deutlich trat dies im hinteren Rückenbereich und an den Gelenken der Extremitäten auf. Zudem wiesen die Schwänze häufig Einschnürungen auf (Abb. 4.24 D). Über 90% der homozygoten Cx43K258stop Tiere starben innerhalb der ersten Woche (Abb. 4.24 E). In den wenigen überlebenden Tieren führten persistierende Einschnürungen (Abb. 4.25 A-C) in einigen Fällen zu partieller Autoamputation von Teilen des Schwanzes (Abb. 4.25 B).

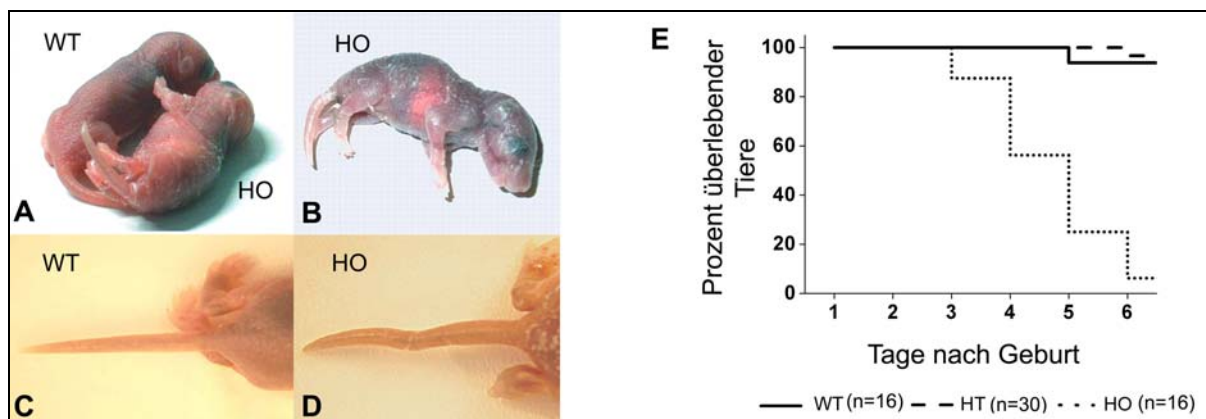


Abb. 4.24: Makroskopischer Hautphänotyp und postnatale Letalität von neugeborenen Cx43K258stop Tieren

Im Vergleich mit gleichaltrigen Wildtyp Geschwistertieren (A, C: WT) zeigten neugeborene homozygote Cx43K258stop Tiere (A, B, D: HO) Abnormalitäten der Haut. Neonatal letale Tiere mit diesem Hautphänotyp (B), erwiesen sich nach PCR-Analytik als homozygot für die Cx43K258stop Mutation. Die Haut erschien fester, trockener, hatte eine veränderte Lichtbrechung und stellenweise auf. Häufig traten im Bereich des Schwanzes Einschnürungen auf. PCR-kontrollierte Wurfbeobachtungen (E) zeigten ein unverändertes Überleben von heterozygoten, aber eine hohe postnatale Letalität von homozygoten Cx43K258stop Tieren. WT: Wildtyp, HT: heterozygot, HO: homozygote.

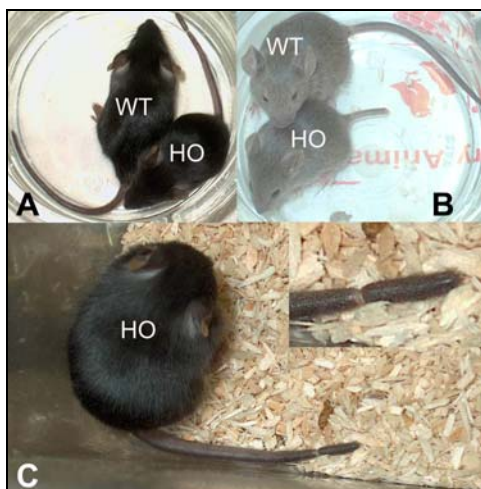


Abb. 4.25: persistierende Einschnürungen und partielle Autoamputation an Schwänzen von adulten Cx43K258stop Tieren

Im Vergleich mit Wildtyp Geschwistertieren (A, B: WT) zeigten adulte Cx43K258stop Tiere (A, B, C: HO) persistierende Einschnürungen (A, C, C Ausschnitt-Vergrößerung) oder sogar Autoamputation von Teilen ihres Schwanzes (B). WT: Wildtyp, HO: homozygot

4.III.4 Analyse der neonatalen Epidermis von homozygoten Cx43K258stop Tieren

4.III.4.1 Cx43K258stop Tiere haben eine defekte epidermale Permeabilitätsbarriere

Um die Funktionalität der epidermalen Barriere zu testen, wurden Wildtyp und homozygote Cx43K258stop Neugeborene Farbstoff-Penetrationsanalysen unterzogen (Abb. 4.26). Dazu wurde entweder direkt der Farbstoff Toluidinblau eingesetzt (Abb. 4.26 A-B) oder die Tiere wurden über Nacht in Anwesenheit von 5-bromo-4-chloro-3-inodoly- β -D-Galactosid (X-Gal) inkubiert (Abb. 4.26 C-D). Während weder der Farbstoff Toluidinblau noch das β -Galactosidase Substrat X-Gal die funktionale epidermale Barriere von Wildtyp Tieren durchdrang (Abb. 4.26 A-D), zeigte sich bei homozygoten Cx43K258stop Tieren in beiden Fällen Färbung. Toluidinblau zeigte Penetration (Abb. 26 A-B) insbesondere im Bereich des hinteren Rückens, der Stirn (Pfeilköpfe) und der Gelenke. X-Gal durchdrang die epidermale Barriere homozygoter Tiere vollständig und wurde durch endogene β -Galaktosidase zu einem blauen Niederschlag umgesetzt (Abb. 4.26 C-D).

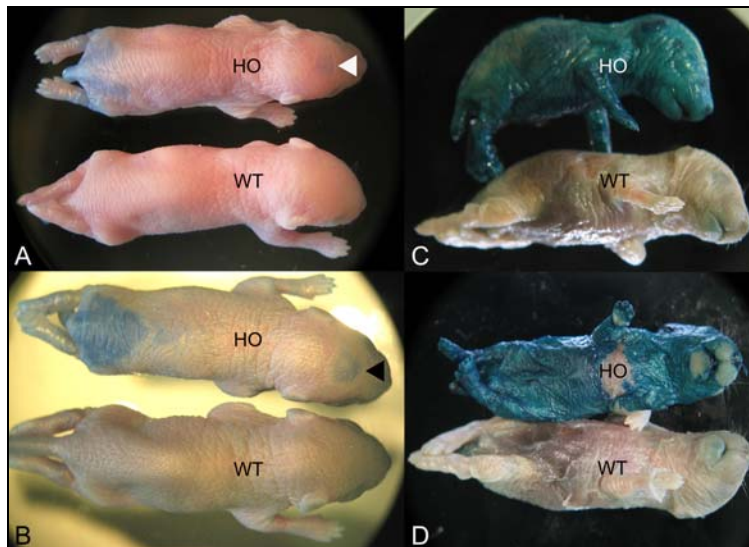


Abb. 4.26: Funktionale Überprüfung der epidermalen Barriere mittels Farbstoffpenetration

Neugeborene Wildtyp (WT) und homozygote Cx43K258stop Tiere (HO) wurden Tag 1 (A), Tag 2 (C, D) und Tag 3 (B) nach Geburt Farbstoffpenetrationsversuchen mit Toluidinblau (A, B) oder X-Gal (C, D) unterzogen. Während die Wildtyp Tiere in keinem Fall Durchdringen der epidermalen Barriere durch einen Farbstoff zeigten, wiesen die homozygoten Tiere eine funktional defiziente epidermale Barriere auf. Toluidinblau zeigte stets im hinteren Rückenbereich und häufig im Bereich der Stirn (Pfeilköpfe in A, B) Penetration der epidermalen Barriere, erkennbar durch eine deutliche Blaufärbung. Vorläufige Analysen zeigten eine vollständige Permeabilität der epidermalen Barriere für X-Gal. Im Gegensatz zu Wildtyp Geschwistertieren (WT in C, D) zeigten homozygote Cx43K258stop Tieren (HO in C,D) eine vollständige Anfärbung durch den Umsatz von eingedrungenen X-Gal durch endogene β -Galaktosidasen. Dieses Experiment wurde in Abweichung von der Methode nach Hardman et al. (1998) an Tieren durchgeführt, welche zuvor mittels Toluidinblau-Färbung analysiert worden waren. Hierdurch riss die Epidermis stellenweise bei der Positionierung der Tiere für die Dokumentation: vgl. linke Vorderpfote und Bereich oberhalb des Sternums in D.

4.III.4.2 Neonatale Cx43K258stop Epidermis zeigt gestörte Desquamation und verfrühte Bildung von Keratohyalingranulae

Um den makroskopischen und funktionalen epidermalen Phänotyp der neugeborenen Cx43K258stop Haut näher zu charakterisieren, wurden histologische sowie morphologische Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt (Abb. 4.27). Die TEM-Analytik wurde durch Manuela Saathoff (Institut für Zellbiologie, Bonn) durchgeführt. Routine-Histologie an HE-gefärbten Paraffin-Schnitten zeigte, dass homozygote Cx43K258stop Epidermis morphologische Veränderung des *Stratum corneums*

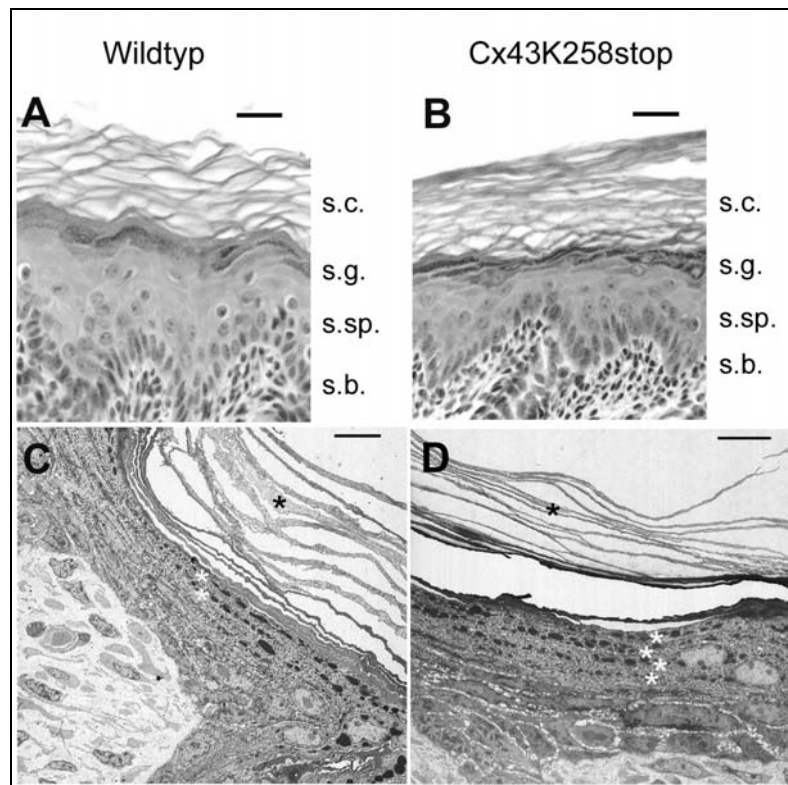


Abb. 4.27: Histologie und Transmissions-elektronenmikroskopie an neonataler Epidermis.

HE-gefärbte Paraffin Schnitte (A, B) und Ultradünnschnitte von Epidermispräparaten (C, D) demonstrierten signifikante Unterschiede zwischen der Morphologie des *Stratum corneums* (s.c.) und *Stratum granulosum* (s.g.) von Wildtyp (A, C) und homozygot mutierten Cx43K258stop Tieren (B, D). Charakteristisch für die Cx43K258stop Epidermis war die Anwesenheit von zahlreicheren, aber dünneren Lagen von Korneozyten (schwarze Sterne in C, D). Zudem erschienen die äußeren Lagen von Korneozyten nicht im selben Grad abzuschilfern, sondern noch fest untereinander verbunden zu sein (B). Zudem zeigte sich eine verfrühte Ausbildung von Keratohyalingranulae (weiße Sterne in C, D) im *Stratum spinosum* homozygoter Cx43K258stop Tiere. Balken in A, B: 20 μ m, in C, D: 10 μ m. s.sp.: *Stratum spinosum*, s.g.: *Stratum granulosum*

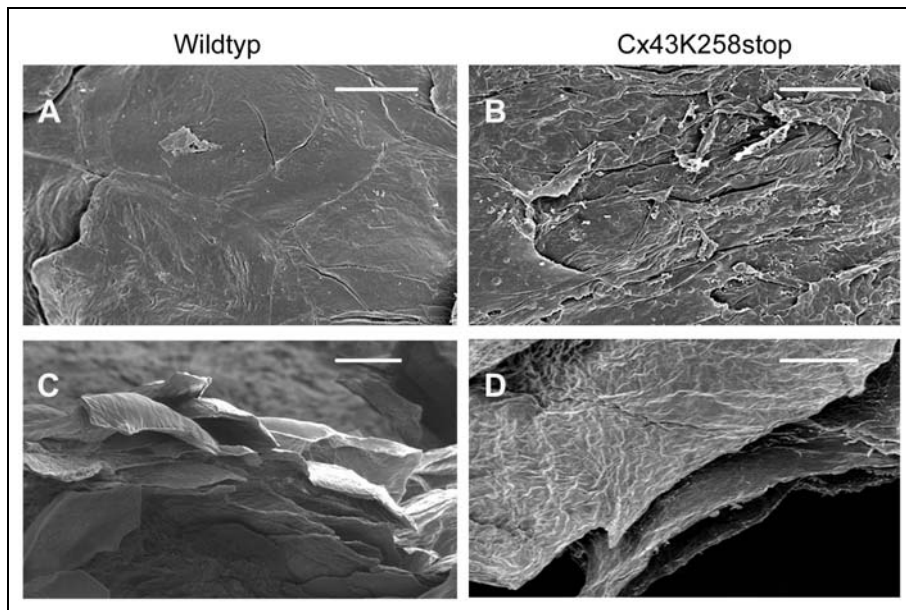


Abb. 4.28: REM-Analyse an neonataler Epidermis Teil I

Wildtyp (A, C) und homozygote Cx43K258stop (B, D) Gesamthaut wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Cx43K258stop Epidermis zeigte wiederum dünnere Korneozyten (D). Zudem war die Oberfläche im Gegensatz zum Wildtyp nicht glatt und geschlossen, sondern wies tiefe Risse auf. Das Volumen einzelner Korneozyten (D) war deutlich geringer als im Wildtyp (C). Balken: in A, B, D: 10 μm , in C: 20 μm . (Durchgeführt und zur Verfügung gestellt von Dr. Gregor Kirfel, Institut für Zellbiologie, Bonn)

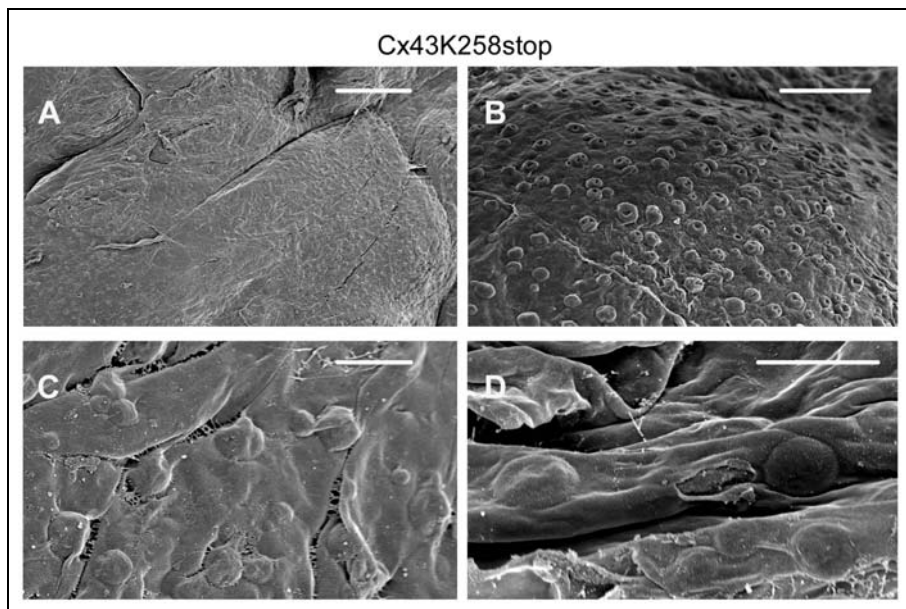


Abb. 4.29: REM-Analyse an Cx43K258stop Epidermis Teil II

Cx43K258stop Epidermis zeigte im Gegensatz zum Wildtyp in der REM-Analyse in regelmäßigen Abständen runde Erhebungen von vesikulärer Größe. Diese „Bubbles“ zeigten teilweise Vertiefungen in ihrem Zentrum (B). Balken: in A: 20 μm , in B: 5 μm , in C, D: 2 μm . (Durchgeführt und zur Verfügung gestellt von Dr. Gregor Kirfel, Institut für Zellbiologie, Bonn)

und *Stratum granulosum* aufwies. Das *Stratum corneum* bestand aus zahlreicheren Lagen an Korneozyten (Abb. 4.27 B). Zudem erschienen die äußeren Lagen des *Stratum corneum* nicht wie in Wildtyp Epidermis (Abb. 4.27 B) abzuschilfern, sondern noch stark untereinander verknüpft zu sein. Die Keratohyalingranulae des *Stratum granulosum* homozygoter Tiere zeigten eine deutlich stärkere Anfärbung in der HE-Analytik (Abb. 4.27 B). TEM-Analysen neonataler Haut belegte neben dem geringeren Volumen der homozygoten Cx43K258stop Korneozyten (schwarze Sterne in Abb. 4.27 C, D) eine verfrühte Ausbildung von Keratohyalingranulae. Während in der interfollikulären Haut von Wildtyp Tieren durchschnittlich ein zweilagiges *Stratum granulosum* gefunden wurde (weiße Sterne in Abb. 4.27 C), traten in homozygoter Cx43K258stop Epidermis vier Lagen Keratohyalin-haltiger Keratinozyten auf (weiße Sterne in Abb. 4.27 D). Zur genaueren Ergründung des funktionalen epidermalen Barriere-defektes wurde zudem eine Rasterelektronenmikroskopie-Untersuchung an neonatalen Gesamthaut-Proben durch Dr. Gregor Kirfel (Institut für Zellbiologie, Bonn) durchgeführt. Korneozyten waren in homozygoter Cx43K258stop Epidermis deutlich dünner als im Wildtyp (Abb. 4.28 C, D). Zudem zeigte sich, dass im Gegensatz zur glatten, geschlossenen Oberfläche der Wildtyp Epidermis (Abb. 4.28 A) die Oberfläche homozygoter Cx43K258stop Epidermis uneben war und zahlreiche Risse zeigte. Diese führte zur Exposition von Korneozytenlagen, die bis zu mehreren Schichten unterhalb der Epidermisoberfläche lagen. Zudem zeigten sich auf der Oberfläche der homozygoten Cx43K258stop Epidermis (Abb. 4.29) runde Erhebungen („Bubbles“) von vesikulärer Größe (0,5–2 µm Durchmesser). Diese Bubbles wurden nie in Wildtyp Epidermis gesehen.

4.III.4.3 Immunfluoreszenz-Analysen der Epidermis

Im Folgenden wurde neonatale Epidermis verschiedenen Immunfluoreszenz-Analysen unterzogen. Um die Differenzierung zu analysieren wurde die Expression verschiedener Keratine sowie von Loricrin und Filaggrin als Marker der terminalen Differenzierung untersucht. Außerdem wurde die Expression der verkürzten Cx43 Isoform und anderer in der Haut exprimierten Connexine hinsichtlich Lokalisation und Veränderungen im Expressionsniveau getestet. Zur Analyse der Proliferation und Transitionszeit der Keratinozyten in der Epidermis wurde der Einbau von BrdU mittels Immunfluoreszenz verfolgt. Zudem wurde die Verteilung der Zelladhäsionsproteine ZO-1 und β -Catenin analysiert.

4.III.4.3.A Filaggrin wird in neonataler Cx43K258stop Epidermis verfrüht gebildet

Als generelle Markerproteine für die epidermale Differenzierung wurde die Expression der Keratine 5 und 1 untersucht. Keratin 5 wird ausschließlich im germinativen *Stratum basale* exprimiert, während Keratin 1 ab dem *Stratum spinosum* in allen Keratinozyten gebildet wird.

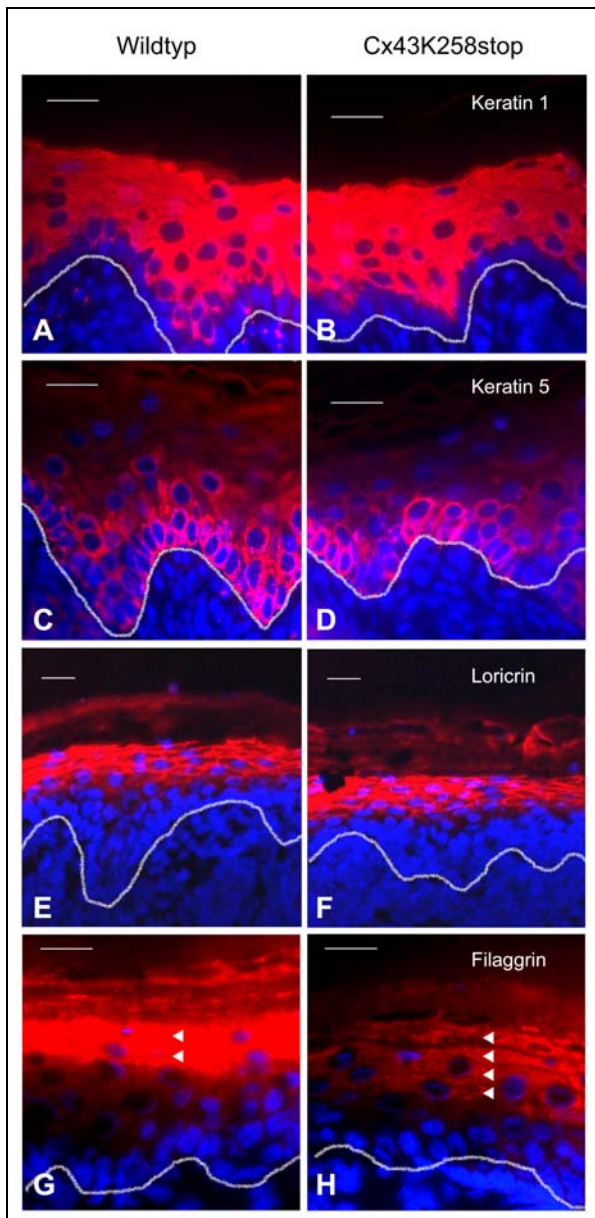


Abb. 4.30: Immunfluoreszenz-Analyse neonataler Haut I

Neonatale Epidermis von Wildtyp (A, C, E, G) und homozygoten Cx43K258stop Tieren (B, D, F, H) wurde immunmarkiert und gleichzeitig die Zellkerne angefärbt, um die Erkennung der Dermis-Epidermis Grenze, dargestellt als weiße Linie, zu erleichtern.

Während sich keine Unterschiede in Lokalisation und Expressionsstärke zwischen beiden Genotypen für Keratin 1 (A, B), Keratin 5 (C, D) und Loricrin (E, F) feststellen ließen, zeigten sich Unterschiede für Filaggrin (G, H). In homozygot mutierter Haut ließ sich Filaggrin in vier Kerationzytenlagen (weiße Pfeilköpfe in H) nachweisen, während im Wildtyp dieses Protein nur in den obersten zwei Schichten der Epidermis gefunden wurde (weiße Pfeilköpfe in G).

Balken: 20 μ m.

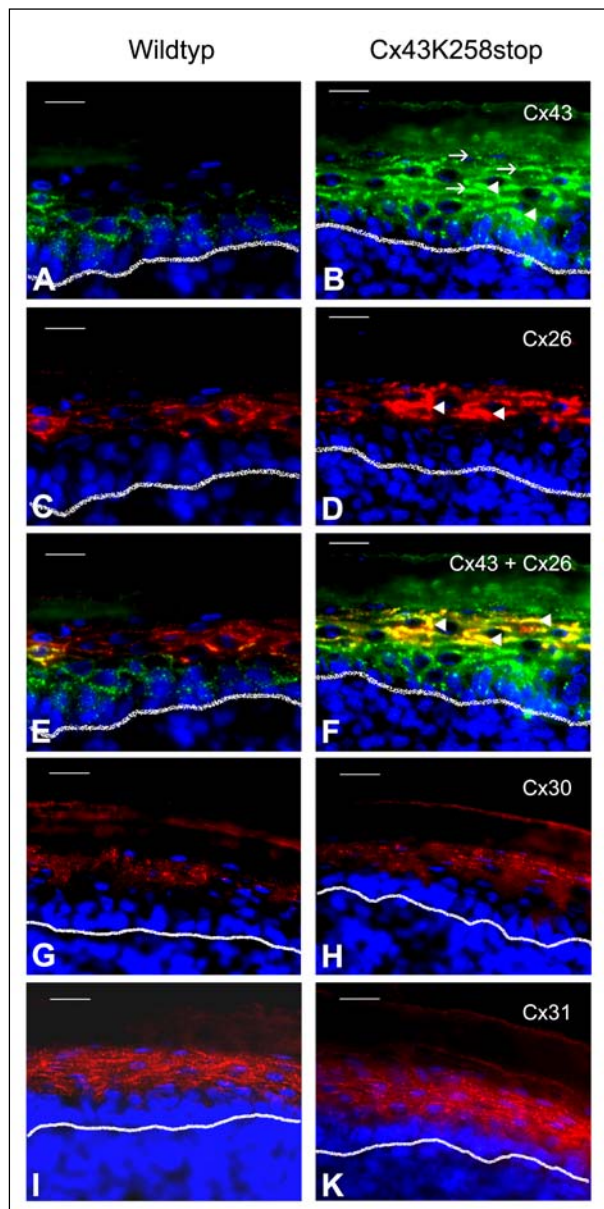


Abb. 4.31: Immunfluoreszenz-Analyse neonataler Haut II

Wildtyp: A, C, E, G, I; homozygote Cx43K258stop Epidermis: B, D, F, H, K. Im Gegensatz zu Cx43 (A) wurde Cx43K258stop in allen Lagen der Epidermis (Pfeile in B) in erhöhter Menge detektiert, ersichtlich aus der Anzahl und Größe einzelner immunpositiver Signale (weiße Pfeilköpfe in B). Cx26 (C, D) zeigte die selbe Lokalisation, aber eine verstärkte Expression in homozygoter Cx43K258stop Epidermis (weiße Pfeilköpfe in D). Verdeutlicht wurden diese Unterschiede durch Überlagerung beider Signale (E, F), wobei es im Wildtyp kaum, aber in Cx43K258stop zu starker Kolo-kalisation beider Signale kam (weiße Pfeilköpfe in F). Cx30 (G, H) und Cx31 (I, K) zeigten keine genotypischen Unterschiede.

Balken: 20 μ m.

Für beide Keratine ließen sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp und homozygoter Cx43K258stop Epidermis (Abb. 4.30 A-D) nachweisen. Loricrin und Filaggrin sind Proteine, die im Zuge der terminalen Keratinozytendifferenzierung produziert werden. Während sich für die Lokalisation und Expressionstärke von Loricrin wiederum keine Unterschiede zwischen den Genotypen zeigten (Abb. 4.30 E-F), ließ sich Filaggrin im Gegensatz zum Wildtyp (Pfeilspitzen in Abb. 4.30 G) in homozygoter Cx43K258stop Epidermis in einer höheren Anzahl von Keratinozytenschichten detektieren (Pfeilspitzen in Abb. 4.30 H). Damit wurde eine verfrühte Expression von Filaggrin, bzw. des unprozessierten Profilaggrins, in den Lagen des *Stratum spinosum* belegt. Dies entsprach den TEM-Ergebnissen hinsichtlich einer verfrühten Ausbildung von Keratohyalin granulae.

4.III.4.3.B Cx43K258stop und Cx26 sind in neonataler Epidermis verändert exprimiert

Die Cx43 und Cx43K258stop Proteinexpression zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen. Während Cx43 in Wildtyp Epidermis ausschließlich im *Stratum basale* und den unteren Schichten des *Stratum spinosum* nachgewiesen wurde (Abb. 4.31 A), wurde Cx43K258stop in allen Lagen der Epidermis (Pfeilspitzen in Abb. 4.31 B) und in einer höheren Expressionstärke gefunden. Die immunreaktiven Signale waren von deutlich größerer Fläche (Pfeilspitzen in Abb. 4.31 B). Die Expression von Cx26 war gegenüber Wildtyp Epidermis (Abb. 4.31 C) nicht in ihrer Lokalisation verändert, aber in ihrer Stärke erhöht. Die immunreaktiven Signale im *Stratum granulosum* waren in Cx43K258stop Tieren ebenfalls deutlich größer in ihrer Fläche (Pfeilspitzen in Abb. 4.31 D). Die gleichzeitige Dokumentation der Cx43 und Cx26 Signale (Abb. 4.31 E, F) verdeutlichte die Unterschiede in der Expression dieser beiden Connexine in homozygoter Cx43K258stop Epidermis. Während es in Wildtyp Epidermis kaum zu Kolo-kalisation kam, erkennbar durch gelbe Signale, traten in Cx43K258stop Epidermis zahlreiche Kolo-kalisationssignale von großer Fläche auf (Pfeilspitzen in Abb. 4.31 F). Die Analyse für weitere epidermale Connexine (Abb. 4.31 G-K) legte keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen dar.

4.III.4.3.C Cx43K258stop Epidermis zeigt keine verstärkte Proliferation

Um zu untersuchen, ob im Zuge der beobachteten histologischen Unterschiede zwischen Wildtyp und homozygot mutierter Epidermis eine Hyperproliferation von Keratinozyten auftritt, wurde die Anzahl an und Lokalisation von proliferierenden Zellen analysiert. Hierzu wurde neugeborenen Mäusen BrdU injiziert und die Haut nach zwei Stunden isoliert. Kryoschnitte der Epidermis wurden mittels gegen BrdU und Keratin 5 gerichteter primärer Antikörper untersucht (Abb. 4.32 A,B). BrdU-immunpositive grüne Signale, entsprechend der Inkorporation des Thyminanalogons während der proliferativen DNS-Replikation sowie Keratin 5-immunpositive rote Signale wurden in beiden Genotypen ausschließlich im *Stratum basale* gefunden. Dies belegte, dass Zellteilungen auch in homozygoter Cx43K258stop

Epidermis auf diese Lage der Epidermis beschränkt waren. Auswertung von 10 Analysen pro Genotyp belegten außerdem, dass die Anzahl der proliferierenden Zellen mit durchschnittlich einer Zelle in 10 in beiden Genotypen gleich war. Auswertung der BrdU-Lokalisation 24 und 48 Stunden nach der Markierung zeigten gleichfalls keine Unterschiede zwischen Wildtyp

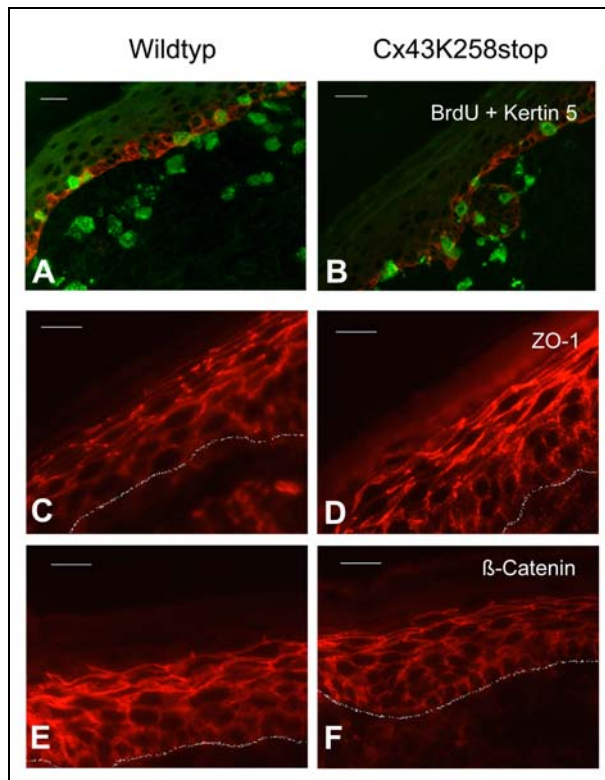


Abb. 4.32: Analyse der Proliferation und der Expression von ZO-1 und β -Catenin in neonataler Epidermis

Kryoschnitte von Wildtyp (A, C, E) und Cx43K258stop Epidermis (B, D, F) wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Die Epidermis-Dermis Grenze wurde in C-F als weiße Linie dargestellt. Die Präparate für A und B stammten von Tieren, die 2 Stunden vor Präparation der Epidermis mit BrdU injiziert worden waren.

Mittels BrdU- (grün) und Keratin 5-Markierung zeigte sich eine ausschließliche Lokalisierung proliferierender Kertinozyten im *Stratum basale* in Wildtyp (A) und Cx43K258stop Epidermis (B). Die Anzahl proliferierender Zellen war mit jeweils durchschnittlich jeder zehnten Zelle ebenfalls unverändert. ZO-1 Protein war gegenüber dem Wildtyp (C) in homozygoter Cx43K258stop Epidermis (D) moderat erhöht. Die Expression von β -Catenin zeigte in Lokalisation und Stärke keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen (E, F). Balken: 20 μ m.

und Cx43K258stop Epidermis (Daten nicht gezeigt). Somit zeigten Cx43K258stop Keratinozyten auch eine unveränderte Transitionszeit und somit Differenzierungsgeschwindigkeit der Epidermis.

4.III.4.3.D ZO-1 Protein wird in neonataler Cx43K258stop Epidermis verstärkt exprimiert

Auf Grund der postulierten Kollokalisierung des Adhärenzverbindung-assozierten Proteins β -Catenin mit Cx43 sowie der belegten direkten Interaktion des Tight Junction Proteins ZO-1 mit den letzten 4 Aminosäureresten der C-terminalen Domäne von Cx43 wurde die Expression dieser Proteine in neonataler Epidermis untersucht. Beide Proteine waren in beiden Genotypen vornehmlich im Bereich der Zellgrenzen von Keratinozyten lokalisiert (Abb. 4.32 C-F). Gegenüber dem Wildtyp (Abb. 4.32 C) war die Expression von ZO-1 Protein in homozygoter Epidermis moderat erhöht (Abb. 4.32 D). Bezüglich der β -Catenin Expression traten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen auf (Abb. 4.32 E, F).

4.III.4.4 *Cx43K258stop* mRNS wird in Epidermis nicht verstärkt gebildet

Um zu untersuchen, ob die in der Immunfluoreszenz-Analytik festgestellte erhöhte Expression von *Cx43K258stop* auf eine veränderte Transkriptmenge von *cx43K258stop* mRNS zurückzuführen ist, wurde eine Northern Blot-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurde Gesamt-RNS der Epidermis von Tag 1 alten Wildtyp, heterozygoten und homozygoten *Cx43K258stop* Tieren mit einer gegen den *cx43* 3' UTR gerichteten ³²P-markierten Sonde hybridisiert. Es zeigte sich weder in heterozygoter noch in homozygoter *Cx43K258stop* Epidermis Gesamt-RNS eine erhöhte Menge an *cx43K258stop* Transkript (Abb. 4.33).

4.III.4.5 Unterschiede in der Filaggrin-Prozessierung sowie der Connexin-Expression in neonataler *Cx43K258stop* Epidermis

Für die Proteine, die in der Immunfluoreszenz-Analyse signifikante Unterschiede in ihrer Expressionsstärke oder Lokalisation zwischen Wildtyp und homozygot mutierter neonataler Epidermis gezeigt hatten, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden neonatale Epidermis-Lysate von ein und zwei Tage alten Wildtyp und homozygoten *Cx43K258stop* Tiere mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die auf Nitrozellulose transferierten Proteine mit primären Antikörpern gegen Filaggrin, Cx43 und Cx26 inkubiert. Der weitere Nachweis erfolgte nach Inkubation mit Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörpern mittels ECL-Reaktion. Filaggrin wird von Keratinozyten des *Stratum granulosum* in der Form eines hochmolekularen und phosphorylierten Vorläufers, Profilaggrin, exprimiert. Im Zug der terminalen Differenzierung von Kertinozyten wird Profilaggrin vollständig dephosphoryliert und proteolytisch zu monomeren Filaggrineinheiten prozessiert. Diese Monomere assoziieren mit Keratinfilamenten. Die Western Blot-Analytik zeigte keine Unterschiede in der Gesamtmenge an exprimiertem Filaggrin, jedoch zeigten sich an Tag 1 nach der Geburt nur geringe Mengen an monomerem Filaggrin (Doppelstern in Abb. 4.34) sowie ein Anstieg für ein Prozessierungsintermediat, welches einer Zwischenstufe aus 3 Filaggrin-Einheiten entsprach (Stern in Abb. 4.34). Für die Differenzierungsmarker Loricrin, Keratin 1 und Keratin 5 traten keine Unterschiede auf. Immunoblot-Analysen der Connexinproteine Cx43 und Cx26 bestätigten die Ergebnisse der Immunfluoreszenzen (Abb. 4.35). Die Gesamtmenge an exprimiertem *Cx43K258stop* in homozygot mutierter Epidermis war gegenüber der Menge an Cx43 Protein in Wildtyp Epidermis deutlich erhöht. Auch zeigte sich im Gegensatz zum Wildtyp kein Absinken der *Cx43K258stop* Proteinmenge zwischen Tag 1 und Tag 2 nach der Geburt. Während Cx26 Protein in der Epidermis von Wildtyp Tieren kaum nachweisbar war, traten in der Epidermis homozygoter *Cx43K258stop* Tiere deutlich höhere Mengen diese Connexins auf.

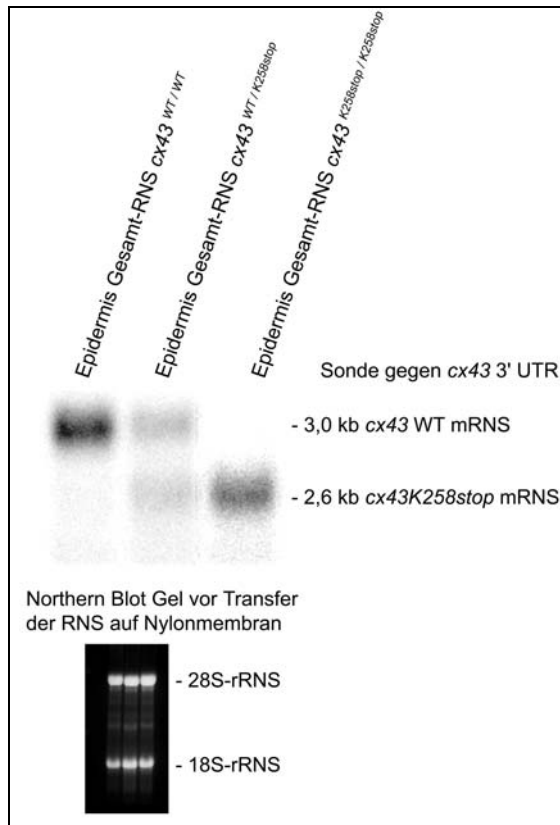


Abb. 4.33: Northern Blot-Analyse postnataler Epidermis

Eine Northern Blot-Hybridisierung wurde für Gesamt-RNS der Epidermis von einem Tag alten neugeborenen Wildtyp, heterozygot und homozygot mutierten Cx43K258stop Tieren durchgeführt. Als Sonde wurde ein ³²P-markiertes DNS-Fragment genutzt, das mit dem 3' UTR der *cx43* mRNS hybridisiert.

Die Transkriptmenge an *cx43K258stop* entsprach den erwarteten allelen Mengen. So waren die Signalintensitäten für *cx43* und *cx43K258stop* zwischen Wildtyp und homozygot mutierter Cx43K258stop Epidermis bzw. innerhalb der heterozygoten Cx43K258stop gleich.

Auftrag abgeglichenen Mengen Gesamt-RNS wurde durch UV-Photodokumentation des für den Northern Blot verwendeten Gels vor Transfer der RNS über die Ethidiumbromid-Signale der 28S- und 18S-rRNS überprüft.

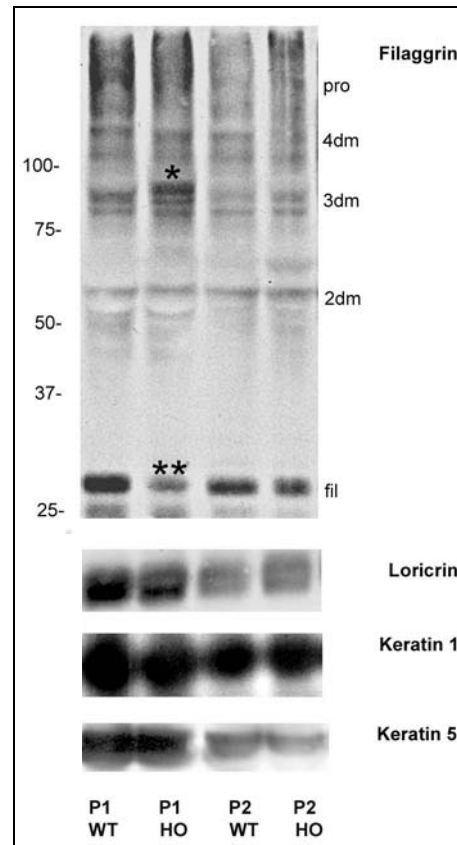


Abb. 4.34: Western Blot-Analyse postnataler Epidermis

Western Blot-Analysen wurden für Epidermis-Lysate von einem (P1, Spuren 1 und 2) und zwei Tagen alten (P2, Spuren 3 und 4) Wildtyp (WT, Spuren 1 und 3) und homozygot mutierten Cx43K258stop Tieren (HO, Spuren 2 und 4) durchgeführt.

Die Menge an monomerem Filaggrin war in P1 homozygoter Cx43K258stop Epidermis reduziert (**), und ein zusätzliches Signal von etwas höherem Molekulargewicht als die des Filaggrin-Prozessierungsintermediats aus drei Filaggrin-Einheiten wurde detektiert (*). Loricrin, Keratin 1 und Keratin 5 zeigten keine Unterschiede zwischen den Genotypen.

Pro: Profilaggrin, 4dm-2dm: Prozessierungsintermediate aus 4, 3 oder 2 Filaggrin-Einheiten, fil: monomeres Filaggrin.

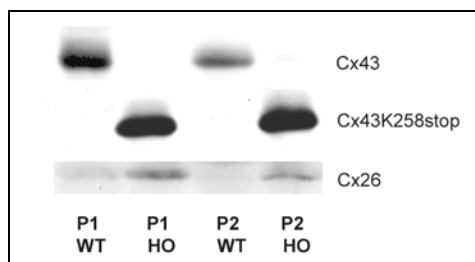


Abb. 4.35: Western Blot-Analytik für epidermale Connexine

Western Blot-Analysen an Wildtyp (WT, Spuren 1 und 3) und homozygoter Cx43K258stop Epidermis (HO, Spur 2 und 4) an Tag 1 (Spur 1 und 2) und 2 (Spur 3 und 4) zeigten eine deutlich erhöhte Cx43K258stop und Cx26 Proteinexpression in neonataler homozygoter Epidermis.

4.III.5 Analyse der epidermalen Einschnürungen von neonatalen homozygoten Cx43K258stop Tieren

Um die Morphologie und Histologie der observierten Einschnürungen (Abb. 4.24 C) genauer zu analysieren, wurden Schwänze homozygoter Cx43K258stop Tiere, die diesen Phänotyp aufwiesen, mittels Rasterelektronenmikroskopie (durchgeführt von Dr. Gregor Kirfel, Institut für Zellbiologie, Bonn) und Routine-Histologie untersucht. In der Rasterelektronenmikroskopie erwiesen sich die Einschnürungen (Abb. 4.36 B) als Invaginationen der Epidermis. Zudem wies die Haut im Vergleich zu Wildtyp Tieren (Abb. 4.36 A) eine ungewöhnlich glatte Oberfläche auf. Dies ließ auf fehlende Desquamation von Korneozyten schließen. Im Vergleich von Tag 1-3 alten Proben (Daten nicht komplett gezeigt) wurde festgestellt, dass es sich hierbei um einen fortschreitenden Prozess handelte. Von der Schwanzbasis her nahm dieser glatte Phänotyp postnatal zu, bis an Tag 3 die gesamte Oberfläche keine Desquamation mehr zeigte. Histologische Analysen auch im Bereich der Einschnürung an Tag 2 alten Neugeborenen bestätigte die Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie. Im Vergleich zu Wildtyp Epidermis (Abb. 4.36 C) war das *Stratum corneum* von homozygoten Cx43K258stop Tieren deutlich kompakter und zeigte kaum abschilfernde Korneozyten (Abb. 4.36 D). Die Einschnürungen erschienen durch kompakte, persistierende Bereiche "alten" *Stratum corneums* zu entstehen (Abb. 4.36 E). "Altes" *Stratum corneum* schnürte sich bis auf die Dermis ein und zog an den Enden "neues" *Stratum corneum* mit in die Einschnürung.

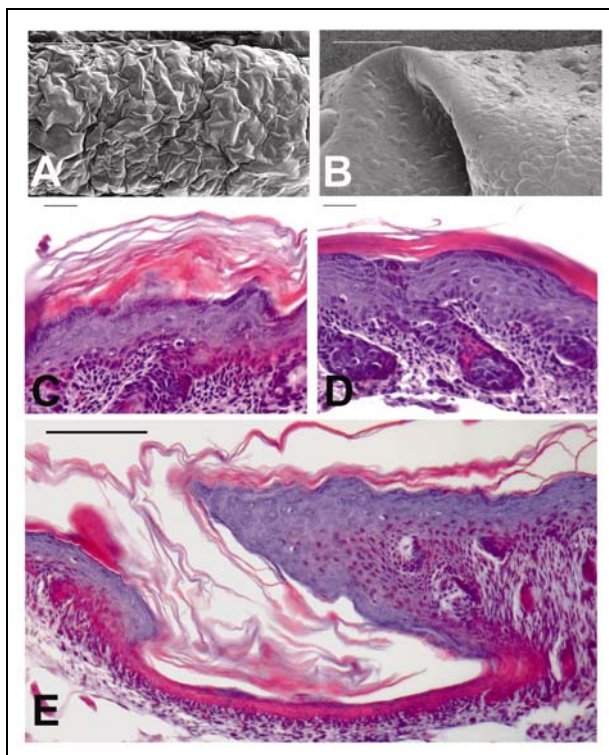


Abb. 4.36: Analyse der epidermalen Einschnürungen

Schwänze von neonatalen Wildtyp und homozygoten Cx43K258stop Tieren wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie (A, B) und HE-gefärbter Paraffin-Schnitte (C-E) analysiert.

Im Gegensatz zu Wildtyp (A) Schwanzhaut, zeigten Cx43K258stop Tiere eine glatte Oberfläche der Epidermis ohne Zeichen von Desquamation. Im Bereich der makroskopischen Einschnürungen zeigte sich eine Invagination der Oberfläche (B). In der histologischen Analyse zeigte Wildtyp Epidermis ein lockeres *Stratum corneum* mit abschilfernden Korneozyten (C), während das *Stratum corneum* von homozygoten Tieren äußerst kompakt erschien (D). Im Bereich der Einschnürung wurde altes, persistierendes *Stratum corneum* dokumentiert, dass ohne Unterbau von stratifizierenden Keratinozyten direkt auf der Dermis auflag.

Balken: in A, B: 200 μm ;in C-E: 20 μm .

Rasterelektronenmikroskopie (A, B) durchgeführt und zur Verfügung gestellt durch Dr. Gregor Kirfel, Institut für Zellbiologie, Bonn.

Während sich im Randbereich der Einschnürung unterhalb des *Stratum corneums* noch stratifizierte Epidermis befand, erschien das "alte" *Stratum corneum* unmittelbar auf der Dermis aufzuliegen. Dies bedeutet eine Unterbrechung der Kontinuität des *Stratum basale* und damit der germinativen Schicht der Epidermis.

4.III.6 Analyse der Epidermis adulter Cx43K258stop Tiere

4.III.6.1 Filaggrin wird in adulten Cx43K258stop Tieren wie im Wildtyp exprimiert

An adulter Epidermis wurden Immunfluoreszenz-Analysen für Filaggrin, ZO-1 und Cx43 durchgeführt. Hierdurch wurde analysiert, ob diese in neonataler Epidermis verändert exprimierte Proteine in adulter homozygoter Haut ebenfalls noch verändert ausgeprägt werden. Während Cx43K258stop (Abb. 4.37 D) und ZO-1 noch eine verstärkte Expressionsstärke in adulter homozygoter Cx43K258stop Epidermis (Abb. 4.37 F) gegenüber dem Wildtyp zeigten (Abb. 4.37 C,E), waren in adulten Tieren für Filaggrin keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen feststellbar (Abb. 4.37 A, B).

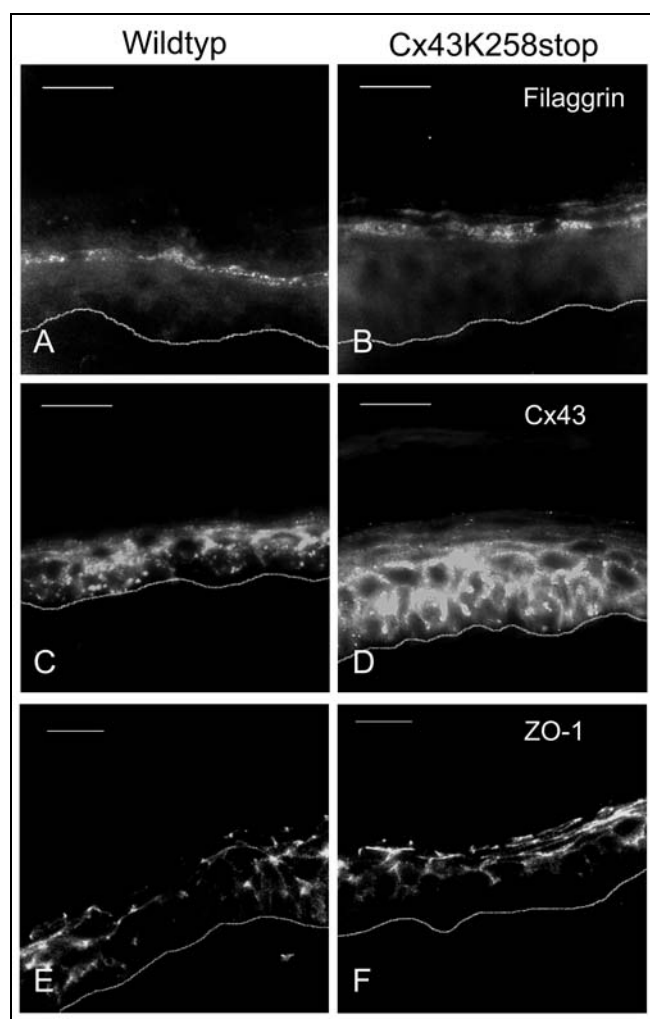


Abb. 4.37: Immunfluoreszenz-Analysen an adulter Haut

Kryoschnitte von adulter Wildtyp (A, C, E) und homozygot Cx43K258stop Epidermis (B, D, F) wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Die Grenze zwischen Epidermis und Dermis wurde als weiße Linie eingezeichnet.

Die Filaggrin Expression zeigte zwischen den beiden Genotypen im Gegensatz zu neonataler Epidermis keine Unterschiede mehr (A, B). Cx43K258stop (D) zeigte gegenüber Cx43 (C) ein verändertes Expressionsmuster. Es wurde statt im *Stratum basale* in erster Linie im *Stratum spinosum* gefunden. Epidermales ZO-1 war in homozygoten Tieren (F) gegenüber dem Wildtyp (E) moderat verstärkt exprimiert. Balken: 20µm.

4.III.6.2 Filaggrin zeigt in adulten Cx43K258stop Tieren eine normale Prozessierung

Immunoblot-Analysen an Epidermis-Lysaten adulter Tiere der verschiedenen Genotypen zeigten ebenfalls keine Unterschiede, sowohl bezüglich der Menge als auch der Prozessierung von Filaggrin (Abb. 4.38). Cx43 und Cx43K258stop Proteinmengen waren im Vergleich zwischen Wildtyp und homozygoten Cx43K258stop Epidermis und innerhalb heterozygoter Cx43K258stop Epidermis nicht wesentlich verändert. Auch Cx26 Protein zeigte eine moderate Erhöhung in homozygoter Cx43K258stop Epidermis. Wie auch für neonatale Epidermis ließ sich ZO-1 mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern (polyklonal rabbit, Zymed) trotz verschiedener Optimierungsanstrengungen nicht zufriedenstellend nachweisen.

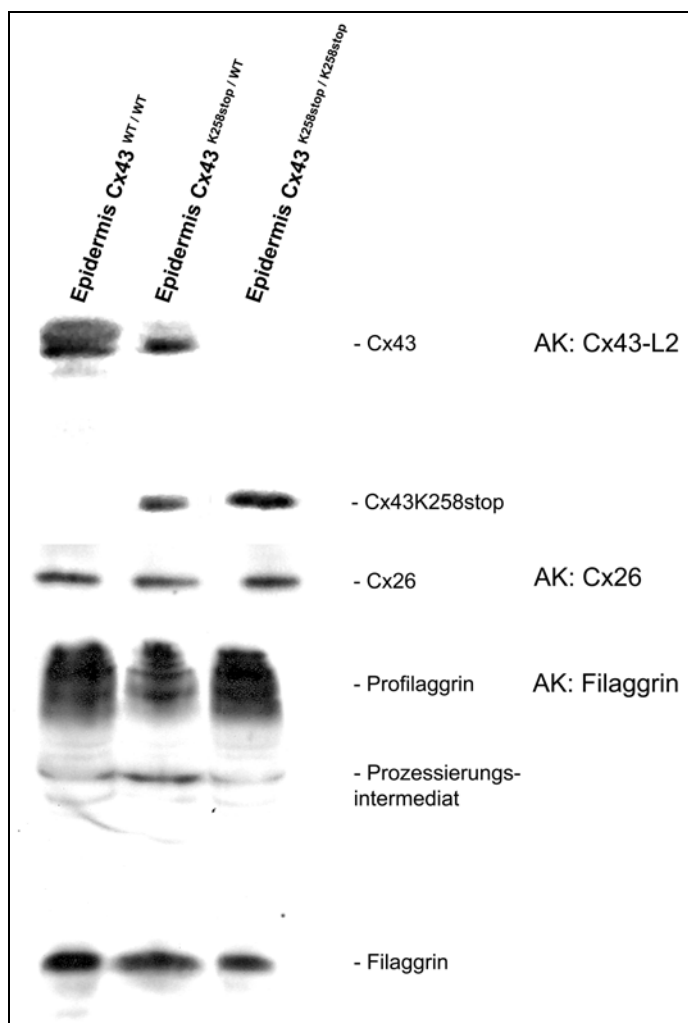


Abb. 4.38: Immunoblot-Analysen an adulter Cx43K258stop Epidermis

In adulter Haut zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Cx43, Cx43K258stop und Cx26 Expression zwischen den Genotypen. Filaggrin wurde in den drei Genotypen in selber Stärke exprimiert und zeigte keine Prozessierungsunterschiede.

AK: Antikörper

4.III.7 Analyse der Fertilität adulter Cx43K258stop Weibchen

Während überlebende homozygote Cx43K258stop Männchen eine normale Fertilität zeigten, boten auch VP-positive Weibchen keine makroskopischen Anzeichen einer Schwangerschaft und hatten niemals Nachwuchs. Aufgrund der bekannten Defizienz in der Follikelreifung generell defizienter Cx43 Ovarien (Juneja et al., 1999) sowie der beobachteten stark reduzierten Fertilität homozygoter Cx43Ki32 und Cx43Ki40 Weibchen (Plum et al., 2000), wurden die Ovarien homozygoter Cx43K258stop Weibchen histologisch und hinsichtlich der Cx43 Proteinexpression untersucht.

4.III.7.1 Cx43K258stop Ovarien zeigen eine gestörte Follikelreifung

Ovarien adulter Geschwister wurden im Östrus histologisch durch Dr. Ruth Grümmer (Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen) untersucht (Abb. 4.39). Im Gegensatz zu Cx43 defizienten Ovarien, die eine Reifung von Follikeln nur bis zum Sekundärstadium zeigen, wurde für homozygote Cx43K258stop Ovarien ein dem Phänotyp von Cx37 defizienten Mäusen entsprechender Defekt der Ovulation gefunden.

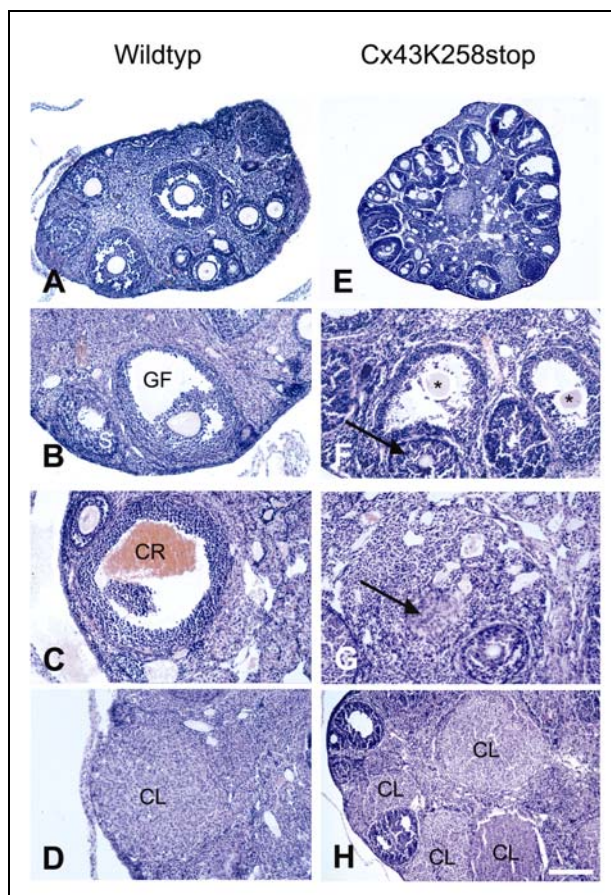


Abb. 4.39: Histologie adulter Cx43K258stop Ovarien

A-D: normale Follikelreifung in Wildtyp Ovarien. Ovulation wurde durch das Auftreten von *Corpora rubra* (C) und anschließender Entwicklung von Gelbkörpern, *Corpora lutea* (D), angezeigt. E-H: in Cx43K258stop Ovarien wurden follikuläre Stadien bis zu jungen Tertiärfollikeln gefunden, jedoch keine reifen Graafischen Follikel (E). Die Follikel zeigten morphologische Veränderungen (Pfeil in F) und degenerierende Oozyten (Stern in F) und degenerierende Oozyten (Stern in F). Abnormale Luteinisierung (G) und Gelbkörperformation ohne Ovulation wurden dokumentiert (H).

S: Sekundärfollikel, GF: Graafischer Follikel, CR: *Corpus rubrum*, CL: *Corpus luteum*.

Balken: in A = 250 μ m, in B, C, D, F, G = 150 μ m, in E = 375 μ m, in H = 100 μ m

Histologische Untersuchungen durchgeführt und zur Verfügung gestellt durch Dr. Ruth Grümmer, Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen.

Im Gegensatz zu Wildtyp Ovarien (Abb. 4.39 A-D) traten in späten Sekundärfollikeln Spalten zwischen den folliculären epithelialen Zellen auf, so dass es zum Bruch mit dem Kontakt zur Oozyte kam (Abb. 4.39 E, Pfeil in F). Zusätzlich zeigten unreife Follikel morphologische Veränderungen und häufig degenerierende Oozyten (Stern in Abb. 4.39 F). Dies führte zum Auftreten ovarialer Zysten an der kortikalen Oberfläche der Ovarien. Gelbkörper schienen nicht aus Ovulationsereignissen hervorzugehen, da *Corpora rubra* im Gegensatz zu Wildtyp Ovarien (Abb. 4.39 C) nicht gefunden wurden. Stattdessen schien bereits in unreifen Follikeln die Luteinisierung einzusetzen, da luteinisierende Zellen im Zentrum von Follikeln gefunden wurden, die noch mit folliculären Zellen gefüllt waren (Pfeil in Abb. 4.39 G). Dies deutete auf eine verfrühte Luteinisierung ohne vorangehende Ovulation hin (Abb. 4.39 G, H).

4.III.7.2 Cx43K258stop wird in Ovarien verstärkt exprimiert

Aus den Ovarien adulter Geschwistertiere wurden Gewebelysate hergestellt. Diese Tiere waren jedoch nicht hinsichtlich ihres Östrus kontrolliert, so dass zyklusabhängige Einflüsse auf die Cx43 bzw. Cx43K258stop Proteinexpression nicht dokumentiert oder ausgeschlossen werden konnten. In der Western Blot-Analyse zeigte sich eine signifikant höhere Expression des Cx43K258stop Proteins (Abb. 4.40). Dies wurde insbesondere für die heterozygoten Ovarien deutlich. In der Expositionszeit, die nötig war, um ein Cx43 Signal zu erhalten, lag die Intensität des Cx43K258stop Signals schon außerhalb des linearen Bereiches. Auch die Signalstärke für Cx43K258stop Protein in homozygoten Lysaten war wesentlich höher als die für Cx43 Protein in Wildtyp Ovarien.

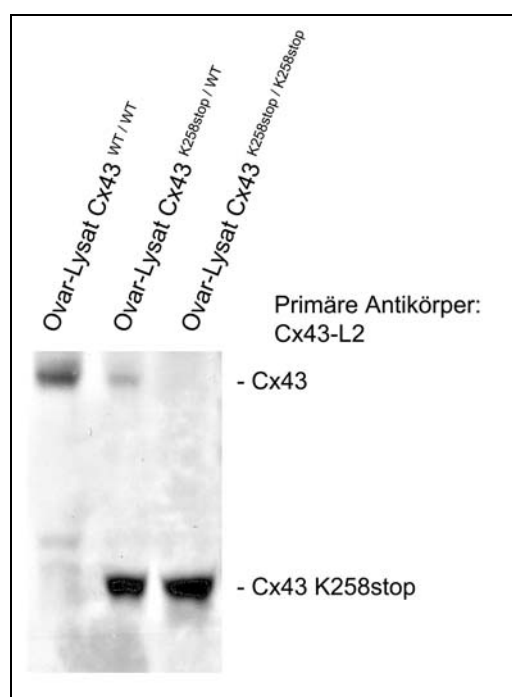


Abb. 4.40: Cx43K258stop Expression in adulten Ovarien

Proteinlysate wurden aus den Ovarien adulter Geschwistertiere der Genotypen Cx43 Wildtyp, Cx43K258stop heterozygot oder homozygot gewonnen. 100 µg Lysat pro Spur wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die auf Nitrocellulose-Membranen übertragenen Gewebelysate wurden mit den polyklonalen Antikörpern Cx43-L2 inkubiert und immunoreaktive Signale wurden nach Inkubation mit Meerrettichperoxidasegekoppelten sekundären Antikörper mittels ECL-Reaktion nachgewiesen. Die Signalintensität für Cx43K258stop war sowohl im Vergleich zwischen Wildtyp und homozygoten Ovarien, als auch innerhalb heterozygoter Ovarien signifikant stärker als diejenige für Cx43 Protein.

4.III.8 Analyse der Herzen neonataler Cx43K258stop Mäuse

Mäuse mit genereller Deletion des *cx43* Gens (Cx43 Knockout) weisen morphologische Anomalien des Herzens auf. Insbesondere zeigen diese Herzen eine vermehrte Bildung von *Trabeculae carneae* (Muskelbälkchen) im Bereich des rechten ventrikulären Ausflusstraktes. Dies führt nach der Geburt bei Einsetzen des Lungenkreislaufs zur tödlichen Zyanose. Um zu analysieren, ob Cx43K258stop Tiere vergleichbare oder andere Anomalien aufweisen, wurden neonatalen Herzen morphologisch, hinsichtlich ihrer Proteinexpression und mittels Elektrokardiographie hinsichtlich ihrer Funktion analysiert.

4.III.8.1 Neonatale Cx43K258stop Herzen zeigen nicht den Phänotyp von Cx43 Knockout Herzen

Herzen neugeborener Tiere wurden durch Dr. Jung-Sun Kim (College of Medicine, Seoul, Korea) histologisch analysiert. Im Gegensatz zu Herzen von Tieren mit genereller Cx43 Deletion, zeigten heterozygote und homozygote Cx43K258stop Herzen im Bereich des rechten ventrikulären Ausflußtraktes wie Wildtyp Herzen keine verstärkte Ausbildung von Herzmuskelbälkchen (Abb. 4.41). Der prävalvuläre Bereich des *Truncus pulmonalis* homozygoter Tiere zeigte keinerlei Hinweise auf Obstruktionen. Somit wiesen Cx43K258stop Herzen histologisch nicht denselben Phänotyp auf, der in Cx43 KO Tieren unmittelbar zum postnatalen Tod führt.

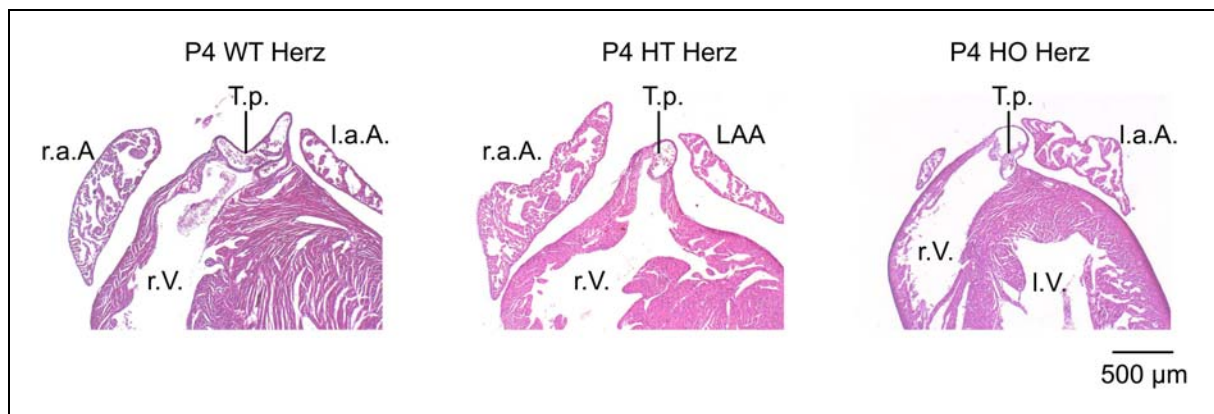


Abb. 4.41: Histologie des Ausflusstraktes neonataler Herzen

HE-gefärbte Paraffinlängsschnitte von Tag 4 alten Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Cx43K258stop Herzen wurden hinsichtlich der Morphologie des Ausflußtraktes des rechten Ventrikels untersucht. Im Gegensatz zu Cx43 KO Herzen zeigten sich in keinem Genotyp Anzeichen von verstärkter Trabeculae Bildungen und somit keine prävalvuläre Obstruktion. WT: Wildtyp, HT: heterozygot Cx43K258stop, HO: homozygot Cx43K258stop, r.a.A.: rechte atrielle Anhängsel (Aurikel), r.V.: rechter Ventrikel, T.p.: *Truncus pulmonalis*, l.a.A.: linke atrielle Anhängsel (Aurikel), l.V.: linker Ventrikel

Histologie durchgeführt und zur Verfügung gestellt von Dr. J.-S. Kim, College of Medicine, Seoul.

4.III.8.2 Neonatale Cx43K258stop Herzen weisen eine veränderte Form („Kugelherzen“) auf

Makroskopisch zeigten sich bereits bei der Präparation neonataler Herzen zwei Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 4.42): Die Herzen homozygoter Tiere waren zumeist kleiner als die ihrer Geschwister und die Herzen zeigten in den meisten Fällen eine veränderte Form. Sie schienen eine Kugelform zu haben (Abb. 4.42). Routine-Histologie an Längsschnitten des Herzen, die eine Vier-Kammer-Ansicht ermöglichten, bestätigten diese makroskopische Auffälligkeit. Neben der geringeren Größe zeigten die Herzen homozygoter Cx43K258stop Tiere eine

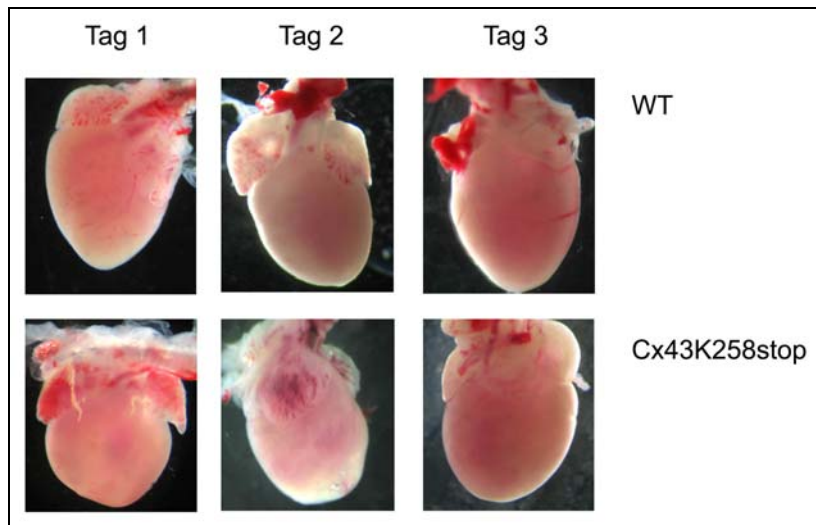


Abb. 4.42: *in situ* Vergleich neonataler Wildtyp und Cx43K258stop Herzen

Neonatale Cx43K258stop Herzen (untere Reihe) waren meist kleiner als diejenigen ihrer Wildtyp Geschwister (obere Reihe). Zudem hatten sie eine abnormale Kugelform.

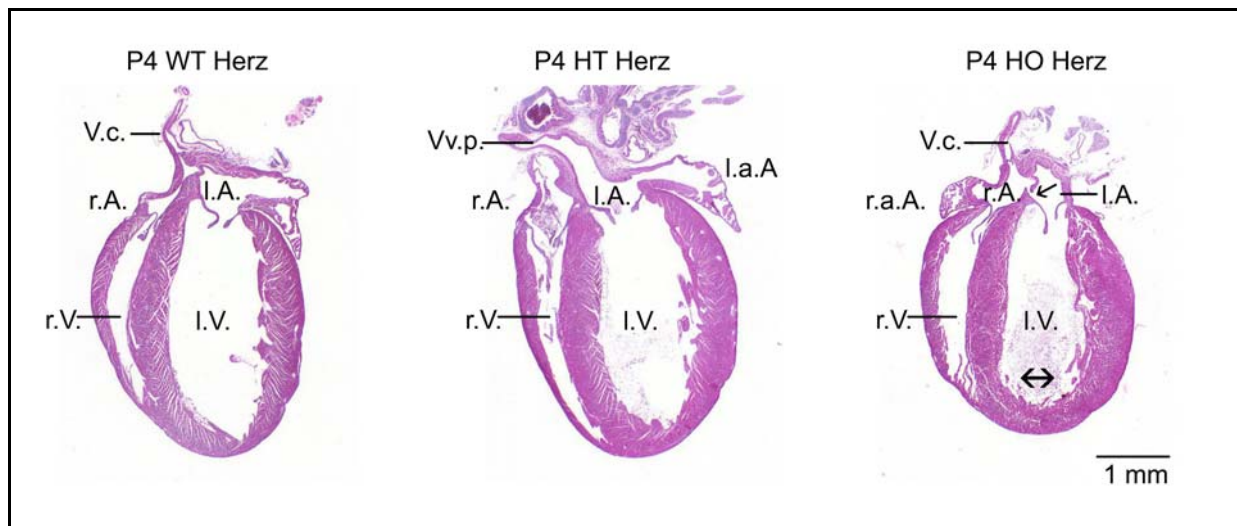


Abb. 4.43: Vier-Kammer-Histologie neonataler Herzen

Histologische Präparate neonataler Herzen von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Cx43K258stop Tieren im Vier-Kammer Längsschnitt zeigte eine veränderte, kugelige Form homozygoter Cx43K258stop Herzen. Die Herzen waren zudem kleiner und erschienen zumindest im Apex-nahen Bereich eine Dilatation des linken Ventrikels aufzuweisen (Doppelpfeil). In einem Tier wurde zudem ein persistierendes *Foramen ovale* (Pfeil) dokumentiert. WT: Wildtyp, HT: heterozygot Cx43K258stop, HO: homozygot Cx43K258stop, l.V.: linker Ventrikel, V.c.: *Vena carva* (große Hohlvene), l.A.: linkes Atrium, r.A.: rechtes Atrium, r.V.: rechter Ventrikel, Vv.p.: *Venae pulmonales* (Lungenvenen), r.a.A.: rechter atrialer Anhang (Aurikel), l.a.A.: linker atrialer Anhang (Aurikel)

Histologie durchgeführt und zur Verfügung gestellt von Dr. J.-S. Kim, College of Medicine, Seoul.

sphärische Form und wiesen zumindest im Apex-nahen Bereich eine Dilatation des linken Ventrikels auf (Doppelpfeil in Abb. 4.43). Durch Vergleich der Herzmasse zur Körpermasse ließ sich weder in heterozygoten noch in homozygoten Tieren eine Cx43K258stop korrelierte Hypertrophie des neonatalen Herzens feststellen. In einem der analysierten neonatalen homozygoten Cx43K258stop Herzen wurde ein atrialer Septumdefekt dokumentiert (Pfeil in Abb. 4.43). Es handelte sich um ein kleines persistierendes *Foramen ovale*. Persistierende *Foramen ovale* treten teils auch in Menschen auf und schließen sich meist noch postnatal. Insbesondere die kleine Öffnung des dokumentierten atrialen Septumdefekts ließ vermuten, dass es sich hierbei nicht um einen zum Tode führenden Defekt handelte.

4.III.8.3 Repolarisationsstörungen in 20 Prozent aller neonatalen Cx43K258stop Herzen

In Zusammenarbeit mit Alexander Ghanem (Medizinische Klinik II, Kardiologie und Pneumologie, Bonn) wurden von neonatalen Tieren, welche aus den Verpaarungen heterozygoter Cx43K258stop Eltern hervorgegangen waren, Oberflächen-Elektrokardiogramme mit drei Ableitungselektroden aufgezeichnet. Die pro Messung erhaltenen 6 Ableitungen wurden digitalisiert und in ein gemittelttes Elektrokardiogramm umgewandelt ("signal averaged ECG, SAECG"). Die untersuchte Gruppe bestand aus 33 Wildtyp, 71 heterozygoten und 40 homozygoten Tieren. Serielle Messungen wurden für Tiere im Alter von ein bis sechs Tagen durchgeführt (Tabelle 4.8). Keine Unterschiede zwischen den Genotypen wurden für die Dauer der Vorhof-Aktivierung, gemessen als P-Welle, die Erregungsüberleitungszeit in den Ventrikel, gemessen als PQ-Intervall, sowie für die ventrikuläre Aktivierung, angezeigt durch die Dauer des QRS-Intervalls, festgestellt. Signifikante Unterschiede ($p < 0.001$ in ANOVA-Analyse unter Verwendung des Bonferroni-

Tabelle 4.8: Parameter von Oberflächen-Elektrokardiogrammen an neonatalen Cx43K258stop Mäusen

	Cx43 ^{WT / WT} (n = 33)	Cx43 ^{WT / K258stop} (n = 71)	Cx43 ^{K258stop / K258stop} (n = 33)
Herzschlagfrequenz (Schläge pro Minute)	475 ± 61	470 ± 60	424 ± 71 **
Dauer P-Welle (ms)	15 ± 4	14 ± 2	15 ± 4
PQ-Intervall (ms)	43 ± 8	41 ± 7	45 ± 9
QRS-Intervall (ms)	16 ± 3	16 ± 3	16 ± 4
QT _c -Intervall (ms)	19 ± 2	21 ± 3	29 ± 17 **

Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA unter Verwendung des Bonferroni-Subgruppentests. **Signifikant gegenüber Wildtyp und heterozygoten Tieren waren die Herzschlagfrequenz ($p < 0.001$) und die Länge des QT-Intervalls ($p < 0.001$) verändert. Durchgeführt und zur Verfügung gestellt durch A. Ghanem (Medizinische Klinik II, Kardiologie und Pneumologie, Bonn)

Subgruppentestes) ergaben sich jedoch für die Form des ST-Segments, Dauer des QT-Intervalls und für die Herzschlagfrequenz. Das ST-Segment eines Elektrokardiogramms stellt die Repolarisationsphase des Ventrikels dar und sollte im SAECG auf der isoelektrischen Linie liegen, da sich die unterschiedlichen Repolarisationsvektoren aufheben. Für eine Subgruppe homozygoter Tiere, die 20% umfaßte, wurden Störungen der Repolarisation als ST-Hebungen und -Senkungen dokumentiert (Abb. 4.44). In Herzfrequenz-korrigierten QT-Intervallen (QT_c) zeigten eben diejenigen Tiere, die auch ST-Segment Abnormalitäten aufwiesen, eine signifikante Verlängerung der ventrikulären Repolarization (Abb. 4.42 C). Einhergehend wurde eine signifikante Reduktion der Herzschlagfrequenz in homozygoten Tieren festgestellt (Tabelle 4.8). Herzarrhythmien wurden in keiner Elektrokardiographie dokumentiert.

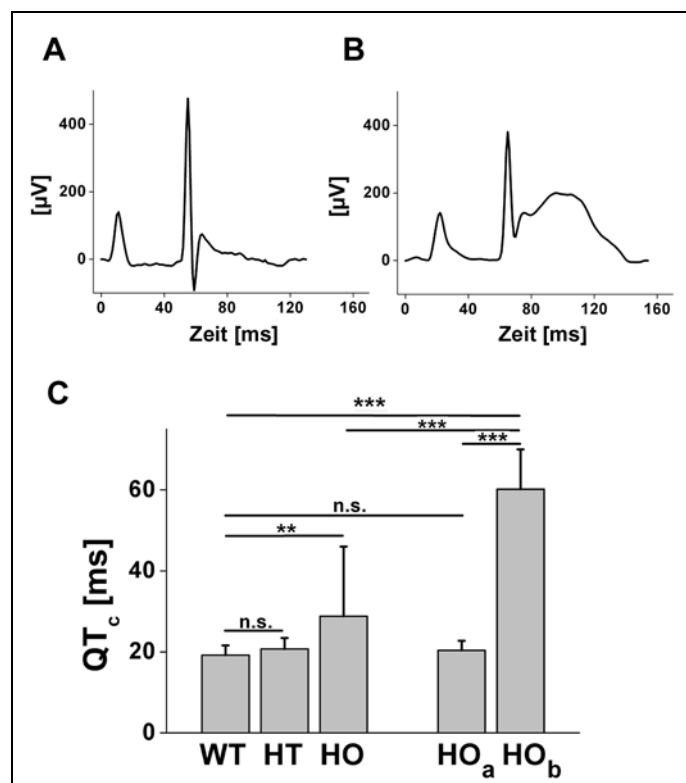


Abb. 4.44: ST- und QT-Anomalien in 20% aller homozygoter, neonataler Cx43K258stop Tiere

Während 80% aller analysierten neonatalen Cx43K258stop Tiere ein unauffälliges EKG-Profil zeigten (A), traten in 20% Anomalien in der Repolarisierung der Ventrikel auf (B). Diese waren als Hebungen oder Senkungen des ST-Segments im Signal-gemittelten EKG erkennbar. Nach Korrektur des QT-Intervalls gegen die Herzfrequenz (QT_c) nach Mitchell et al. (1998) zeigte sich in der ANOVA-Analyse der Genotyp-Gruppen eine signifikante Verlängerung der Ventrikelrepolarization in homozygoten Tieren (C, linke Hälfte (**: $p < 0,05$)). Bei genauer Aufgliederung der Gruppe homozygoter Tiere zeigte sich jedoch, dass nur 20% der Tiere (HO_b) eine höchst signifikante Verlängerung des QT-Intervalls zeigten (C, rechte Hälfte (***) $< 0,001$)). Dies waren eben jene Tiere, die auch ST-Hebungen oder Senkungen gezeigt hatten. Die restlichen homozygoten Tiere (HO_a) zeigten keine verlängerte Ventrikelrepolarisation.

WT: Wildtyp, HT: heterozygote, HO: homozygote, QT_c : Herzschlagfrequenz-korrigiertes QT-Intervall, HO_a : homozygote Tiere ohne Repolarisationsstörung, HO_b : homozygote Tiere mit Repolarisationsstörung, n.s.: nicht signifikant, **: signifikant ($p < 0,01$), *** signifikant ($p < 0,005$)

4.III.8.4 Immunfluoreszenz-Analysen neonataler Cx43K258stop Herzen

Im Folgenden wurde zunächst die Expressionsstärke und Lokalisation von Cx43 bzw. Cx43K258stop in neonatalen Herzen untersucht. Zudem wurden Immunfluoreszenz-Analysen für das direkt an Cx43 bindende Tight Junction Protein ZO-1 sowie für den postulierten Bindungspartner β -Catenin durchgeführt. Um zu analysieren, ob es zu einer kompensatorischen Veränderung in der Lokalisation und Expressionsstärke anderer kardialer Gap Junction Proteine kommt, wurden Immunfluoreszenz-Analysen für Cx40 und Cx45 durchgeführt.

4.III.8.4A Cx43K258stop, ZO-1 und β -Catenin Protein sind in Cx43K258stop Herzen erhöht

Cx43 wird postnatal stark im Ventrikel exprimiert. Im neonatalen Herzen sind Cx43 und Zelladhäsionsproteine, wie ZO-1 und β -Catenin, noch zufällig in der gesamten Plasmamembran verteilt und erst in den Wochen nach der Geburt setzt die Bildung von organisierten Glanzstreifen ein. Die Expressionsstärke von Cx43K258stop war erhöht gegenüber der Cx43 Protein Expression. Besonders deutlich war dieser Unterschied im epikardialen Bereich des linken Ventrikels (Abb. 4.45 A, B). Neben einer Erhöhung der Anzahl immunpositiver Signale waren diese auch in ihrer Größe gegenüber dem Wildtyp erhöht. ZO-1 (Abb. 4.45 C, D) und β -Catenin (Abb. 4.45 E, F) lokalisierten in beiden

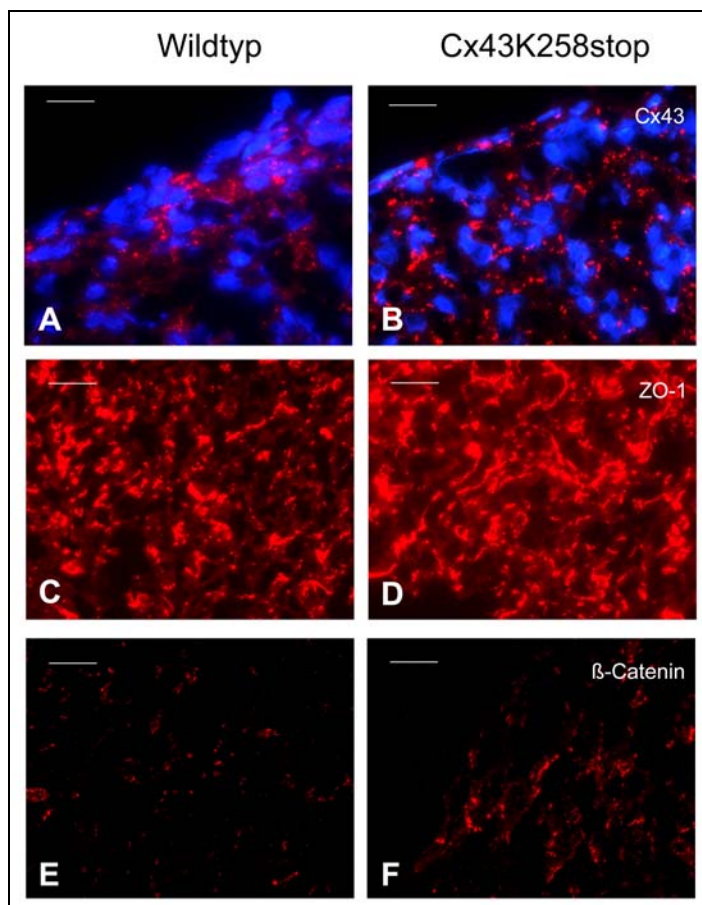


Abb. 4.45: Vergleich der Expression von Cx43, Cx43K258stop, ZO-1 und β -Catenin Protein in neonatalen Cx43K258stop Herzen

Kryoschnitte neonataler Wildtyp (A, C, E) und homozygoter Cx43K258stop Herzen (B, D, F) wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert und in A und B wurden Zellkerne zusätzlich mittels Hoechst-Färbung dargestellt.

Cx43K258stop (B) zeigte eine erhöhte epikardiale Expression mit gesteigerter Größe der immunpositiven Signale. ZO-1 (D) und β -Catenin (F) waren in ihrer Expression gegenüber dem Wildtyp Herzen erhöht (C, E), zeigten aber gleiche Lokalisation in der Zellmembran.

Balken: 20 μ m.

Genotypen zu den Regionen benachbarter Zellmembranen. Die Expression der Proteine war in homozygoten Cx43K258stop Herzen moderat erhöht (Abb. 4.45 D, F). Doppelimmunfluoreszenz-Analysen (Abb. 4.46) für diese beiden Zelladhäsionsproteine belegten eine unverändert hohen Grad an Kolokalisation in homozygoten neonatalen Cx43K258stop Herzen (Abb. 4.46 F)

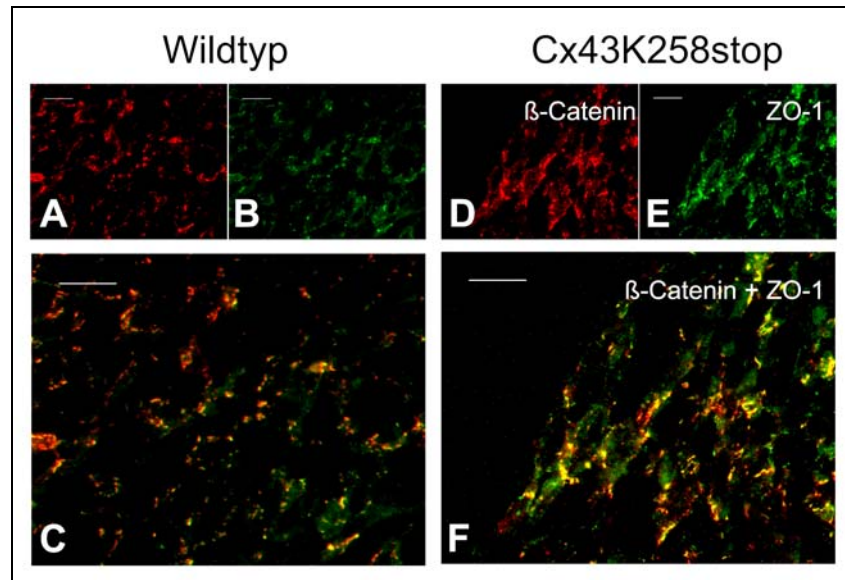


Abb. 4.46: Doppelimmunfluoreszenz-Analyse für ZO-1 und β -Catenin in neonatalen Cx43K258stop Herzen

Doppelimmunfluoreszenz-Analytik für β -Catenin (rot) und ZO-1 (grün) in neonatalen Wildtyp (A-C) und homozygoten Cx43K258stop Herzen (D-F) legten unveränderte Kolokalisation dieser zwei Proteine in beiden Genotypen (C, F) dar.

Balken: 20 μ m

4.III.8.4B Cx40 und Cx45 sind in Cx43K258stop Herzen nicht in ihrer Expression verändert

Cx40 und Cx45 werden postnatal in Atrien sowie im reizweiterleitenden System des Ventrikels exprimiert. Um zu untersuchen, ob die Expression des carboxyterminal verkürzten Cx43 Proteins einen Einfluss auf die Expressionsstärke und Lokalisation dieser Connexine hat, wurden Ventrikel und Atrien neonataler Herzen hinsichtlich ihrer Cx40 (Abb. 4.47) und Cx45 (Abb. 4.48) Expression untersucht. Es zeigte sich weder für Cx45 (weiße Pfeilspitzen in Abb. 4.48 C, E, F, H) noch für Cx40 (Abb. 4.47 C, D) eine mittels Immunfluoreszenz detektierbare Veränderung in der ventrikulären Expressionsstärke. Für Cx45 lies sich zudem mittels Doppelimmunfluoreszenz-Analyse die weiterhin getrennte Lokalisation von Cx45 und Cx43 bzw. Cx43K258stop belegen (Abb. 4.48 E, H). Auch die atrielle Cx40 (Abb. 4.47 E, F) und Cx45 Ausprägung (weiße Pfeilspitzen in Abb. 4.48 I, K) zeigte keine Unterschiede zwischen neonatalen Wildtyp und homozygoten Cx43K258stop Herzen.

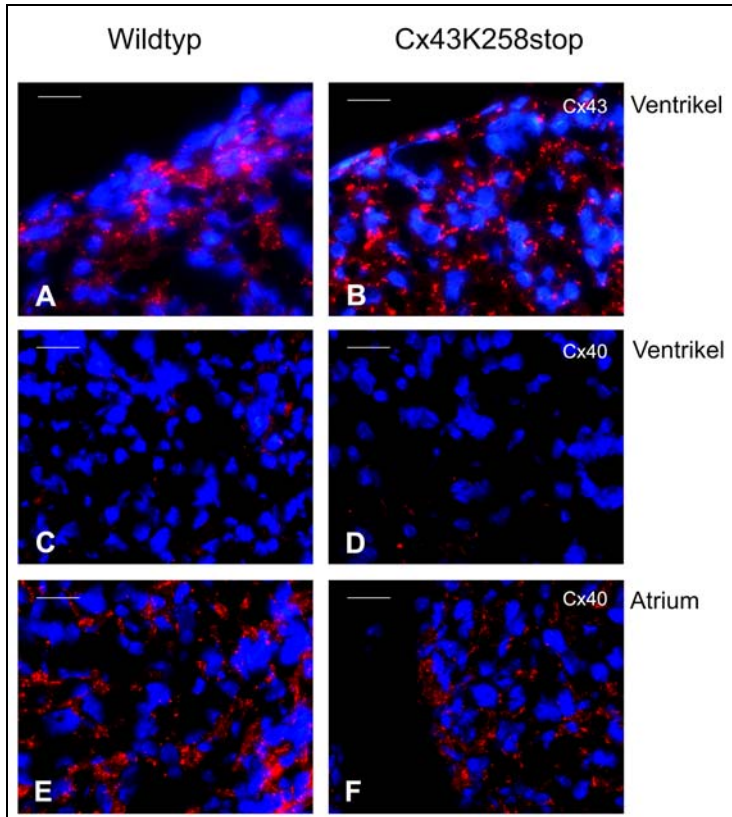


Abb. 4.47: Immunfluoreszenz-Analyse für Cx40 in neonatalen Cx43K258stop Herzen

Immunfluoreszenz-Analytik für Cx43 (A, B) und Cx40 (C-F) in neonatalen Wildtyp (A, C, E) und homozygoten Cx43K258stop Herzen (B, D, F). Im Gegensatz zu der erhöhten ventrikulären Expression von Cx43K258stop (B) zeigte Cx40 in homozygoten Herzen weder in Ventrikel (D) noch in Atrien (F) einen Expressionsunterschied zu neonatalen Wildtyp Herzen (C, E) Balken: 20 μ m.

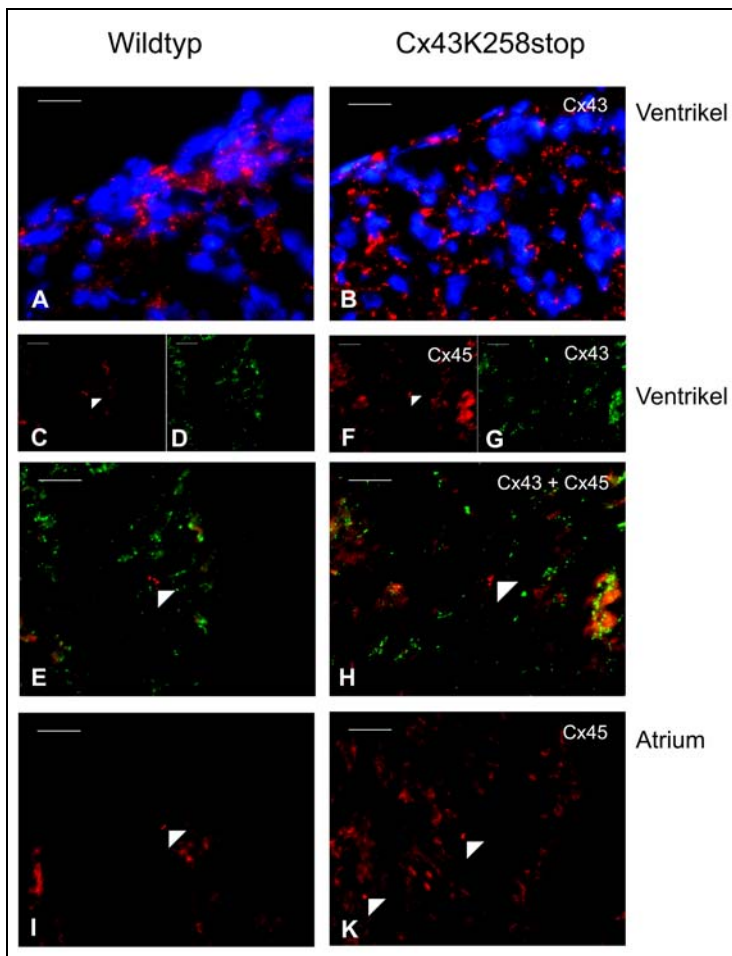


Abb. 4.48: Immunfluoreszenz-Analyse für Cx45 in neonatalen Cx43K258stop Herzen

Immunfluoreszenz-Analytik für Cx43 (A, B, D, G) und Cx45 (C, E, F, H-K) in neonatalen Wildtyp (A, C-E, I) und homozygoten Cx43K258stop Herzen (B, F-H, K). Im Gegensatz zu der erhöhten ventrikulären Expression von Cx43K258stop (B) zeigte Cx45 in homozygoten Herzen weder in Ventrikel (F, H) noch in Atrien (K) einen Expressionsunterschied zu neonatalen Wildtyp Herzen (C, E, I). Doppelimmunfluoreszenz-Analyse belegte, dass auch in homozygoten Cx43K258stop Herzen Cx43 und Cx45 getrennt voneinander exprimiert wurden. Zur Sichtbarmachung der sehr kleinen Cx45-immunpositiven Signale musste die Expositionszeit so gewählt werden, dass unspezifische Hintergrundsignale (F, H, I, K) ebenfalls dokumentiert wurden. Plaque-förmige Signale wurden durch weiße Pfeilspitzen markiert. Balken: 20 μ m.

4.III.8.5 Western Blot-Analysen bestätigen die neonatal erhöhte Expression von Cx43K258stop

Immunoblot-Analysen bestätigten die in der Immunfluoreszenz-Analytik dokumentierte erhöhte Expression von Cx43K258stop in neonatalen Herzen (Abb. 4.49). Während die Cx43 Proteinmenge in Wildtyptieren an Tag 1 und 2 nach der Geburt gleich blieb, stieg die Proteinmenge von Cx43K258stop in homozygoten Tieren zwischen Tag 1 und Tag 3 deutlich an. Sichtbar wurde dies auch in der Analyse von heterozygotem Herz-Lysat: während das Cx43 Signal die Hälfte der Intensität des Cx43 Signals der Wildtyptiere aufwies, war die Cx43K258stop Menge wesentlich erhöht.

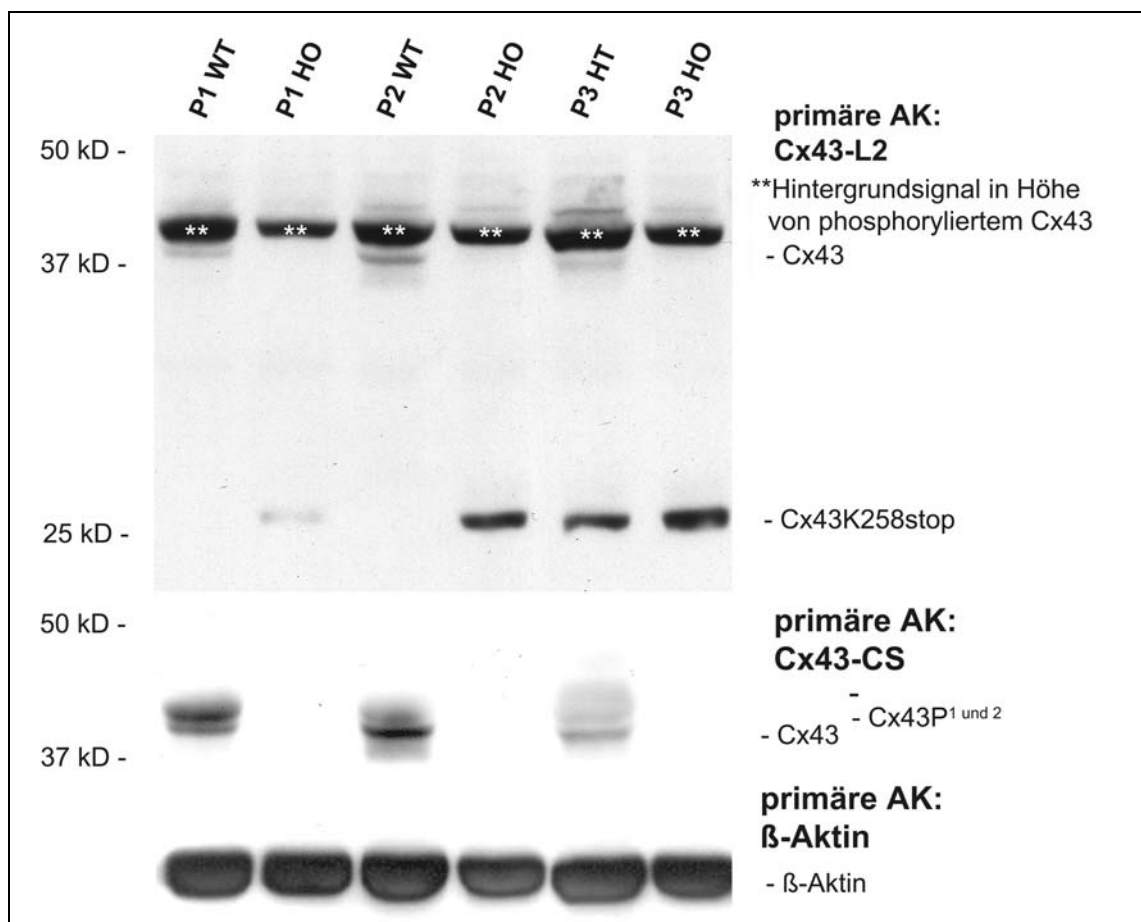


Abb. 4.49: Western Blot-Analysen an neonatalen Cx43K258stop Herzen

100 µg Herz-Lysat von Tag 1 (Spuren 1 und 2), Tag 2 (Spuren 3 und 4) und Tag 3 (Spur 5 und 6) alten Wildtyp (Spuren 1 und 3), heterozygoten (Spur 5) und homozygoten Cx43K258stop Tieren (Spuren 2, 4 und 6) wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membranen überführt und sukzessiv mit primären Antikörpern gegen die zytoplasmatische Schleife von Cx43 (Cx43-L2), den C-Terminus von Cx43 (Cx43-CS) und zur Kontrolle abgeglicherer Proteinmengen gegen β -Aktin inkubiert. Immunopositive Signale wurden nach Inkubation mit sekundären, Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörpern mittels ECL-Reaktion detektiert. Die Cx43K258stop Proteinmenge stieg zwischen Tag 1 und 3 in homozygoten Tieren drastisch an, während die Cx43 Proteinmenge in Wildtyptieren gleich blieb und auch für das 3 Tage alte heterozygote Tier ebenfalls nur 50% der Stärke der Wildtypsignale für Tag 1 und Tag 2 zeigte. Die Proteinmenge an Cx43K258stop war auch im heterozygoten Tier deutlich gegenüber dem Cx43 Signal erhöht. Der Abgleich mit Antikörpern gegen β -Aktin zeigte einen Auftrag vergleichbarer Mengen an Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Cx43K258stop Herz-Lysaten.

4.III.9 Analyse der Herzen adulter Cx43K258stop Mäuse

4.III.9.1 Adulte Cx43K258stop Herzen zeigen häufig eine abnormale Kugelform und Infarkte

Herzen adulter homozygoter Cx43K258stop Tiere wiesen häufig eine Kugelform auf (Abb. 4.50), wie sie auch schon in neonatalen Tieren festgestellt worden war. Die „Kugelherzen“ zeigten häufig im Bereich der Herzspitze Infarkte (Pfeilköpfe in Abb. 4.50). Dies entsprach der Region des linken Ventrikels, der in neugeborenen Herzen dilatiert erschien. Histologische Färbungen an Paraffin-Querschnitten durch Infarktgewebe belegten großflächiges Narbengewebe als hellrosa-farbenes Bindegewebe in der HE- (Abb. 4.49 C) oder rot-gefärbtes Kollagen in der Picosiriusred-Färbung (Abb. 4.50 D).

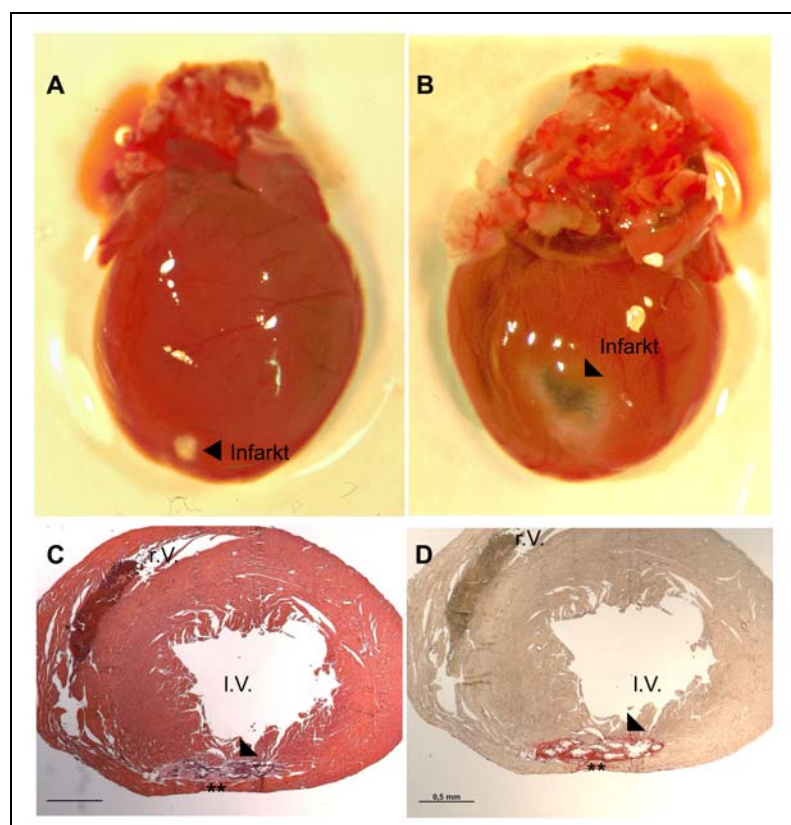


Abb. 4.50: *in situ* und histologische Analyse adulter Cx43K258stop Herzen

Die Analyse der wenigen überlebenden homozygoten Cx43K258stop Tiere zeigte, dass die meisten Tiere ein dilatiertes („Kugelform“) Herz aufwiesen, das häufig Infarkte (A-D) aufwies. So zeigten sich häufig sowohl in ventraler (A) als auch in dorsaler (B) Ansicht großflächige Infarkte in der Wand des rechten Ventrikels, wie für das Herz des Tieres in A und B. Histologische Analysen eines anderen homozygoten Cx43K258stop Tieres zeigten in Querschnitten durch die betroffene Region sowohl in HE-Gewebe (C) als auch in Picosiriusred-Färbungen großflächig vernarbte Bereiche. Typisch für einen Infarkt wurde auch eine Hypotrophie der erhaltenen, gesunden Ventrikelmuskulatur in Narbenbereich (**) gefunden. I.V.: linker Ventrikel, r.V.: rechter Ventrikel. Balken in C, D: 0,5 mm

4.III.9.2 Langzeit-EKG Messungen weisen auf eine Cx43K258stop Gendosis-abhängige Tendenz zu einer Verlängerung des QRS-Komplex hin

Langzeit-EKG Messungen (Abb. 4.51) wurden in unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Dominik Eckardt für zwei Gruppen adulter Tiere durchgeführt, jeweils bestehend aus Geschwistertieren der Genotypen Wildtyp, heterozygot und homozygot Cx43K258stop. Dazu wurden Tieren Transmitter implantiert und zwei Wochen nach der Operation Messungen durchgeführt. Hierbei wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden pro Stunde jeweils für 15 Minuten EKGs aufgezeichnet. Die Auswertung der aufgezeichneten Messungen erfolgte in

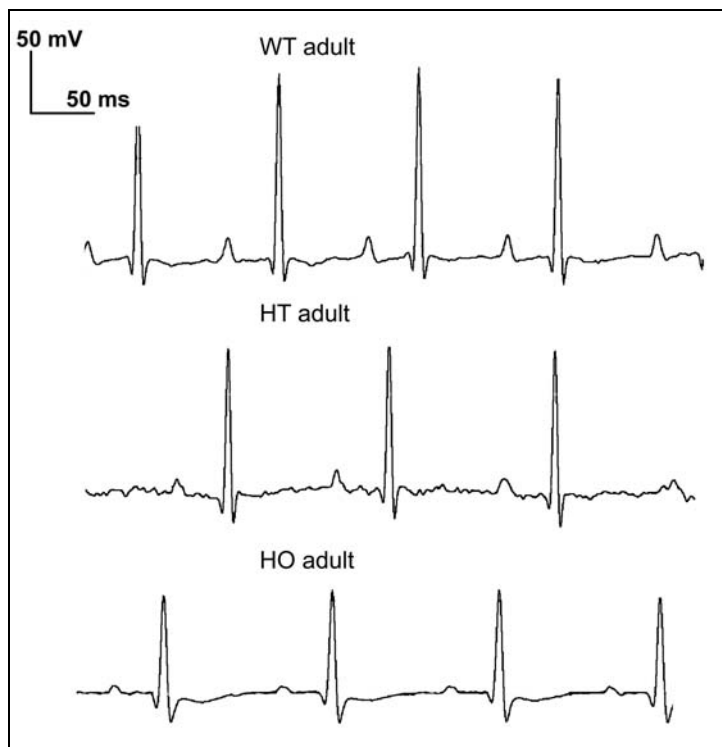


Abb. 4.51: Elektrokardiographie adulter Cx43K258stop Herzen

Mittels Transmitter-Telemetrie gewonnene Elektrokardiogramme für adulte Mäuse. Mit Hilfe der zwei Transmitter-Elektroden ließ sich jeweils nur eine ungemittelte Ableitung aufzeichnen.

P-Welle, PQ-Intervall, QRS-Intervall und RR-Intervall ließen sich darstellen und zeigten in ihrer Form keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Es waren in den durchgeführten Messungen für homozygote Tiere keine ausgeprägten Veränderungen im ST-Segment erkennbar. Das QT-Intervall erschien in heterozygoten und homozygoten Tieren gegenüber dem Wildtyp verlängert.

WT: Wildtyp, HT: heterozygot, HO: homozygote.

Tabelle 4.9: Parameter von Langzeit-Elektrokardiogrammen adulter Cx43K258stop Mäuse

	Cx43 ^{WT/WT} (n = 2)	Cx43 ^{WT/K258stop} (n = 1)	Cx43 ^{K258stop/K258stop} (n = 2)
Herzschlagfrequenz (Schläge pro Minute)	523 ± 34	400 ± nd	473 ± 40
Dauer P-Welle (ms)	15 ± 1	14 ± nd	13 ± 1
PQ-Intervall (ms)	38 ± 4	40 ± nd	40 ± 4
QRS-Intervall (ms)	13 ± 4	15 ± nd	22 ± 1

Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung. Auf Grund der sehr geringen Anzahl an Tieren konnten nur Trends, nicht aber eindeutig signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. So wurde für homozygote Cx43K258stop Tiere eine erniedrigte Herzfrequenz und eine Verlängerung des QRS-Komplexes ermittelt. Auswertung durchgeführt und zur Verfügung gestellt durch Dr. H. van Rijen. (Department of Medical Physiology, Utecht)

Zusammenarbeit mit Dr. Harold van Rijen (Department of Medical Physiology, Utrecht). In der Auswertung der aufgezeichneten EKGs (Tabelle 4.9) waren die ermittelbaren Parameter zwischen den Genotypen größtenteils unverändert. Ähnlich wie in der EKG-Analyse neonataler Herzen, wurde ein Trend zu einer verkürzten Herzschlagfrequenz in homozygoten Cx43K258stop Tieren festgestellt. Zudem schien es in Abhängigkeit von der Gendosis an Cx43K258stop zu einer Verlängerung des QRS-Komplexes, also der ventrikulären Aktivitätsphase, zu kommen. Da mittels der verwendeten Transmitter nur zwei Elektroden zum Einsatz kamen, wurde jeweils nur eine EKG-Ableitung gemessen. Daher konnten keine Signal-gemittelten EKGs erstellt werden. Anhand der erhaltenen Elektrokardiogramme adulter Tiere konnten keine ST-Anomalien dokumentiert werden, wie sie in 20 Prozent der neonatalen Cx43K258stop Tiere aufgezeichnet wurden.

4.III.9.3 Echokardiographie-Analysen demonstrieren eine verminderte Funktion des linken Ventrikels in adulten Cx43K258stop Herzen

In Zusammenarbeit mit Dr. Klaus Tiemann (Medizinische Klinik II, Kardiologie und Pneumologie, Bonn) wurden an adulten Wildtyp und homozygoten Cx43K258stop Tieren Echokardiographien des Herzens durchgeführt (Abb. 4.52 und vgl. Videos auf CD). Um vergleichbare Ebenen zu untersuchen, wurde jeweils die längste Herzultraschall-Einstellung in parasternaler Orientierung in der Ebene der Aortenklappen geschallt (schwarze Pfeile in Abb. 4.52). Für homozygote Cx43K258stop Herzen (Abb. 4.52 C-F) wurde im Gegensatz zu Wildtyp Herzen von Geschwistertieren (Abb. 4.52 A, B) eine eingeschränkte Funktionalität des linken Ventrikels festgestellt (vgl. weiße Doppelpfeile in Abb. 4.52). Sowohl Herzen mit ausgeprägter Hypertrophie des linken Ventrikels (Abb. 4.52 C, D), als auch stark dilatierte Herzen mit stark eingeschränkter Ventrikelkontraktion (Abb. 4.52 F) wurden dokumentiert. Die hypertrophierten Herzen zeigten verringertes systolisches und insbesondere endsystolisches Volumen des linken Ventrikels (vgl. Größe der weißen Doppelpfeile), wobei sich die ventrikulären Wände trafen (Pfeilspitzen in Abb. 4.52 D, „kissing walls“). Dilatierte Cx43K258stop Herzen zeigten die „Kugelform“, die typisch für die neonatalen Herzen dieses Genotyps ist. Das Volumen des linken Ventrikels war stark erhöht, insbesondere war der Apex-nahe Bereich stark vergrößert. Die Herzspitze war stark abgerundet (vgl. Pfeilköpfe in Abb. 4.52 F). Während die Herzbasis-nahen Bereiche der ventrikulären Wände hyperkinetisch waren, zeigte der größte Teil der Ventrikelwand kaum Kontraktion. Insbesondere zeigten die hyperkinetischen Bereiche keine synchrone Kontraktion.

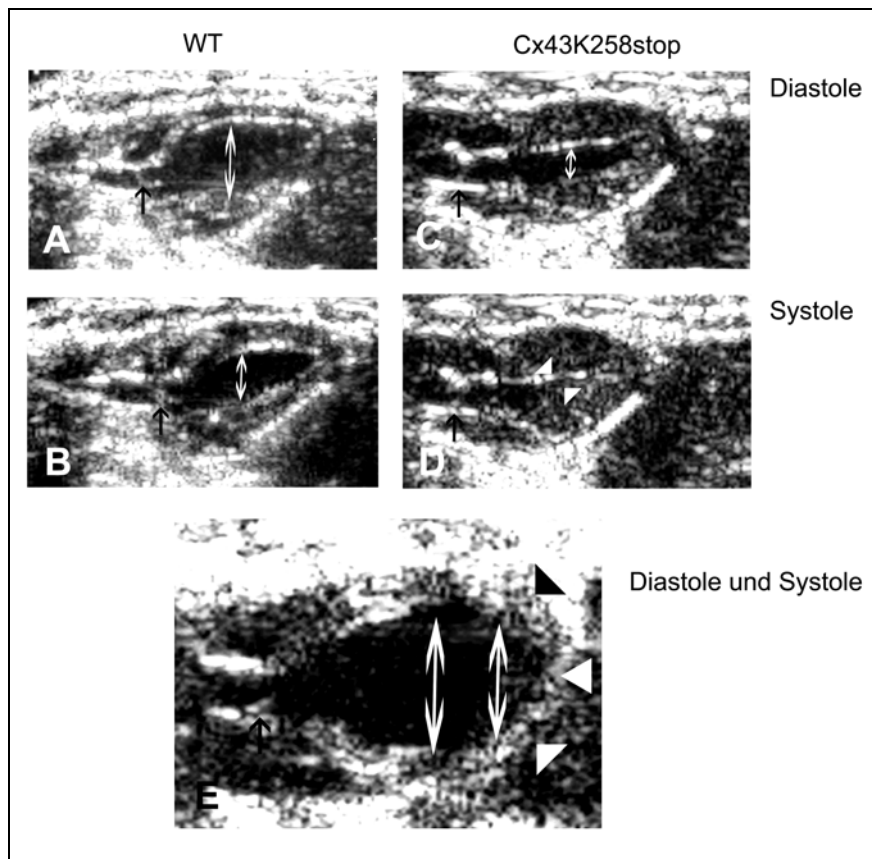


Abb. 4.52: Echokardiographie an adulten Cx43K258stop Herzen

Adulte Wildtyp (A, B) und homozygote Cx43K258stop Herzen (C-E) wurden ultrageschallt und als Videosequenzen dargestellt, die der Diastole (A, C) und Systole (B, D) entsprechen. Für Cx43K258stop Herzen wurde eine eingeschränkte Funktionalität des linken Ventrikels festgestellt. Dabei wurden sowohl hypertrophierte (C, D) als auch dilatierte, kugelförmige Herzen (E) dokumentiert. Schwarze Pfeile: Position der Aortenklappen, weiße Doppelpfeile: Volumen des linken Ventrikels, Pfeilköpfe in D: kissing walls, in E: dilatierter Apex-Bereich.

(Durchgeführt und zur Verfügung gestellt durch Dr. K. Tiemann, Medizinische Klinik II, Kardiologie und Pneumologie, Bonn)

4.III.9.4 Immunfluoreszenz-Analysen an adulten Cx43K258stop Herzen

Wie für neonatale Herzen wurde die Expressionsstärke und Lokalisation von Cx43 und Cx43K258stop, ZO-1, β -Catenin und Cx45 auch in adulten Herzen analysiert. Immunfluoreszenz-Analysen adulter Herzen zeigten, dass sowohl Cx43 (Abb. 4.53 A,C) als auch Cx43K258stop Protein (Abb. 4.53 D) in den Glanzstreifen der ventrikulären Muskulatur lokalisiert war. Im direkten Vergleich der Expressionsstärke mittels der polyklonalen Cx43-L2 Antikörper, welche beide Isoformen detektieren können, schien die Menge des exprimierten Proteins in homozygoten Cx43K258stop Herzen gegenüber dem Wildtyp erhöht zu sein. Dies bestätigte sich jedoch in Immunoblot-Analysen (4.III.9.4) nicht. β -Catenin (Abb. 4.53 E,F) und ZO-1 (Abb. 4.53 G,H) zeigten unveränderte Lokalisation und Expressionsstärke in Herzen beider Genotypen. Auch in der Analyse für Cx45 zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Cx45 (Pfeilköpfe in Abb. 4.54 C-F)

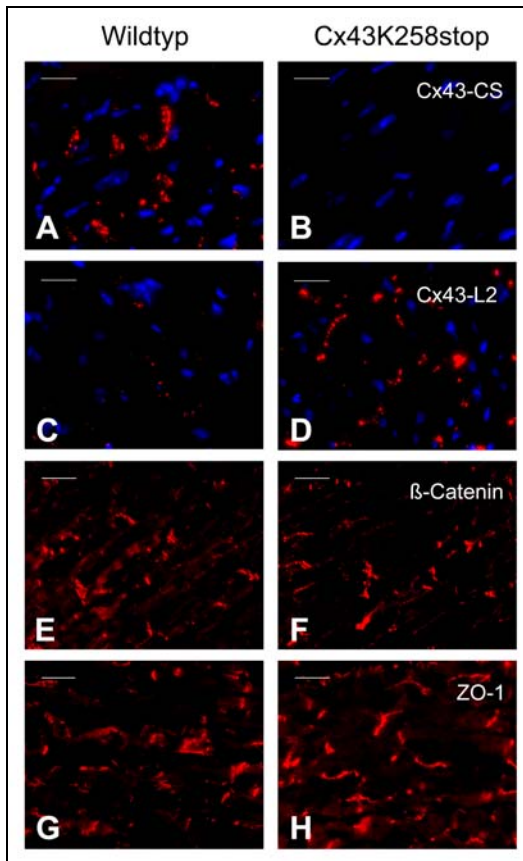


Abb. 4.53: Vergleich der Expression von Cx43, Cx43K258stop, ZO-1 und β -Catenin Protein in adulten Cx43K258stop Herzen

Kryoschnitte adulter Wildtyp (A, C, E, G) und homozygoter Cx43K258stop Herzen (B, D, F, H) wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert und in A-D wurden Zellkerne zusätzlich mittels Hoechst-Färbung dargestellt.

Cx43 (A, C) und Cx43K258stop (D) lokalisierten beide in den Glanzstreifen adulter Ventrikelmuskulatur. Im direkten Vergleich der Expressionsstärke mittels der Antikörper Cx43-L2 (C, D), schien die Expression der verkürzten Cx43 Isoform (D) gegenüber der Wildtyp Cx43 Form (C) erhöht. ZO-1 (H) und β -Catenin (F) waren in ihrer Expression in adulten Cx43K258stop Herzen unverändert gegenüber Wildtyp Herzen (E, G) und zeigten die gleiche Lokalisation in der Zellmembran.

Balken: 20 μ m.

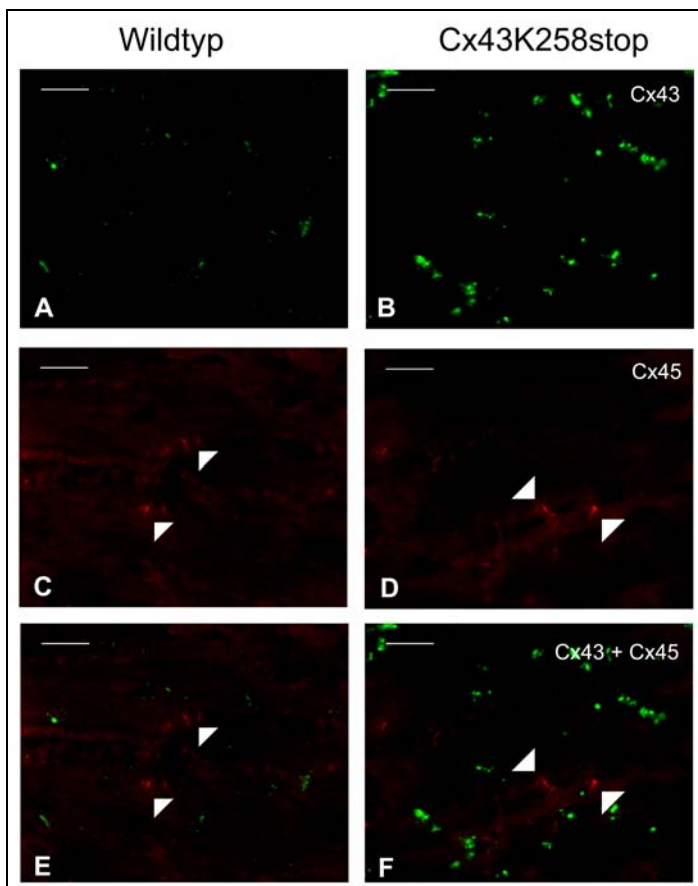


Abb. 4.54: Immunfluoreszenz-Analyse für Cx43 und Cx45 in adulten Cx43K258stop Herzen

Immunfluoreszenz-Analytik für Cx43 (grün: A, B, E, F) und Cx45 (rot: C-F) in adulten Wildtyp (A, C, E) und homozygoten Cx43K258stop Herzen (B, D, F). Cx45 zeigte keinen Expressionsunterschied.

Die Doppelimmunfluoreszenz-Analytik belegte, dass auch in homozygoten Cx43K258stop Herzen Cx43 und Cx45 getrennt voneinander exprimiert wurden. (Zur Sichtbarmachung der sehr kleinen Cx45-immunpositiven Signale, musste die Expositionszeit so gewählt werden, dass unspezifische Hintergrundsignale (C-F) ebenfalls dokumentiert wurde. Cx45-Plaquesignale wurden durch weiße Pfeilspitzen markiert).

Balken: 20 μ m.

zeigte im Ventrikel adulter Herzen weder im Wildtyp noch in homozygoten Cx43K258stop Tieren eine Kolokalisation mit Cx43 (Abb. 4.54 E) noch mit Cx43K258stop (Abb. 4.54 F). Auch war keine kompensatorische Veränderung der Cx45 Expressionsstärke in homozygoten Cx43K258stop Herzen dokumentierbar.

4.III.9.5 Western Blot-Analysen adulter Cx43K258stop Herzen

Immunoblot-Analysen (Abb. 4.55) zeigten überraschenderweise im Gegensatz zu den Daten der Immunfluoreszenz keine erhöhte, sondern eine gegenüber der Cx43 Protein Expression im Wildtyp verminderte Expression an Cx43K258stop in homozygoten Cx43K258stop Herzen. (vgl. auch Abb. 4.23). Eine mögliche Erklärung ist die Maskierung des den polyklonalen Cx43-L2 Antikörpern zugänglichen Epitopes in Cx43 Wildtyp Herzen durch Proteininteraktionen, die auf Grund der Verkürzung an der Cx43K258stop Isoform nicht mehr stattfinden können. Für die kardialen Connexine Cx45 und Cx40 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsstärke. Überraschend war die deutlich erhöhte Expression von ZO-1 Protein in adulten heterozygoten Cx43K258stop Herzen.

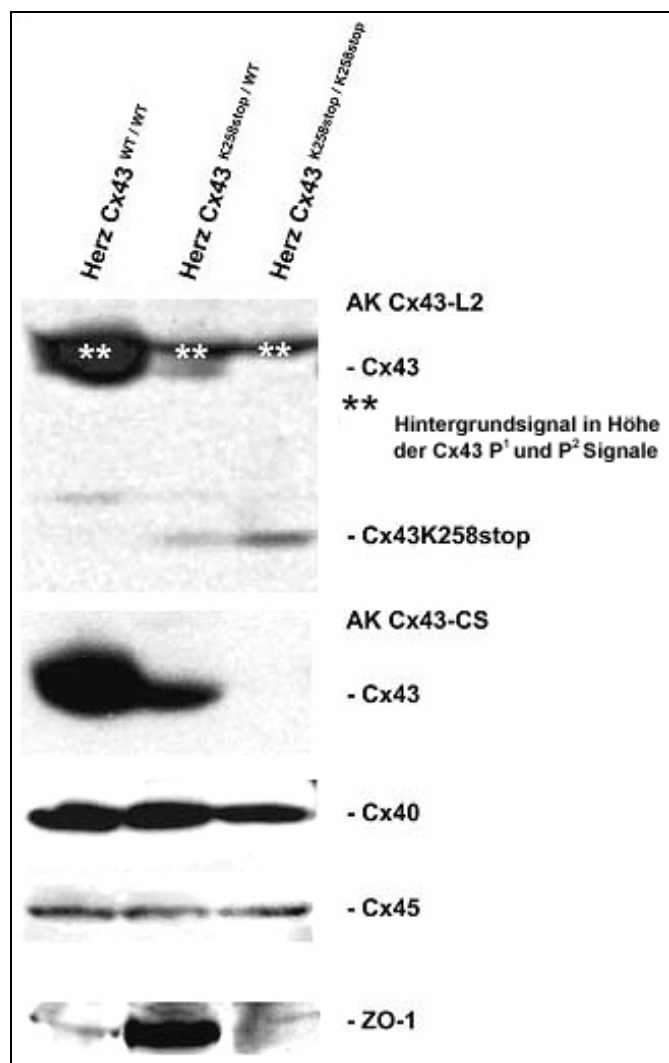


Abb. 4.55: Immunoblot-Analyse an adulten Cx43K258stop Herzen

Cx43K258stop Protein wurde in homozygoten Herzen deutlich schwächer exprimiert als Cx43 in Wildtyp Herzen. Auch war die Menge an Cx43 Protein in heterozygoten Cx43K258stop Tieren gegenüber der Menge in Wildtyp Herzen um mehr als die erwarteten 50% reduziert. Cx45 und Cx40 zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Genotypen. ZO-1 Protein zeigte keine Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp und homozygoten Cx43K258stop Herzen war aber in heterozygoten Cx43K258stop Herzen signifikant erhöht.

In der Analyse von Herz-Lysaten mit den polyklonalen Antikörpern Cx-L2 traten für Wildtyp und heterozygote, nicht aber für homozygote Cx43K258stop Tiere Signale in der der Höhe von 30 kD auf. Diese Signale sind auch durch Yeager und Gilula (1992) für die Immunoblot-Analyse von Cx43 Protein aus Herz mit eben diesen Antikörpern beschrieben. Vermutlich handelt es sich um posttranslationale Modifizierungen von Cx43 Protein im Herzen. Mit gegen die carboxyterminale Domäne des Cx43 Proteins gerichteten Antikörpern wurde dieses Signal nicht immundetektiert.

4.III.9.6 ZO-1 Protein wird in adulten heterozygoten Cx43K258stop Herzen verstärkt exprimiert

Auf Grund der in der Immunoblot-Analytik festgestellten erhöhten ZO-1 Expression in adulten heterozygoten Cx43K258stop Herzen wurden vergleichende Immunfluoreszenz-Analysen für alle Genotypen wiederholt (Abb. 4.56). Es bestätigte sich die veränderten Expressionsstärke und es zeigte sich auch eine veränderte Lokalisation für dieses Protein in heterozygoten adulten Cx43K258stop Herzen (Abb. 4.56 B).

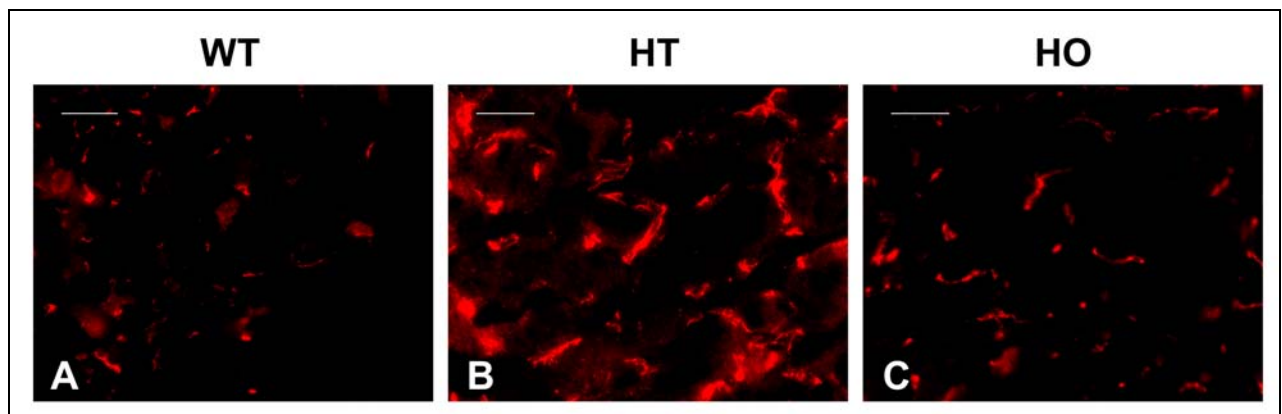


Abb. 4.56: Erhöhte ZO-1 Expression in heterozygoten Cx43K258stop Herzen

Kryoschnitte adulter Wildtyp (A), heterozygoter (B) und homozygoter Cx43K258stop Herzen (C) wurden hinsichtlich der ZO-1 Expression analysiert. Heterozygot mutierte Herzen zeigten eine signifikante Erhöhung und veränderte Lokalisation des ZO-1 Proteins. WT: Wildtyp, HT: heterozygote Cx43K258stop, HO: homozygote Cx43K258stop.

Balken: 20 µm.

4.III.10 Cx43K258stop Tiere zeigen gestörte Verhornung des vorderen Verdauungstraktes

Im Zuge der durchgeführten Wurfbeobachtungen an neonatalen Cx43K258stop Tieren war auffällig, dass überlebende homozygote Cx43K258stop Tiere innerhalb der ersten Woche deutlich geringeren Gewichtszuwachs zeigten als ihre Wildtyp oder heterozygoten Cx43K258stop Geschwister (Abb. 4.57). Auf Grund des ektodermalen Ursprungs des vorderen Verdauungstraktes der Maus, wurde untersucht, ob sich ähnliche histologische Unterschiede wie in der Epidermis auch in Zunge oder Ösophagus nachweisen ließen und somit eine Erklärung für den geringen Gewichtszuwachs homozygoter Tiere geben könnten.

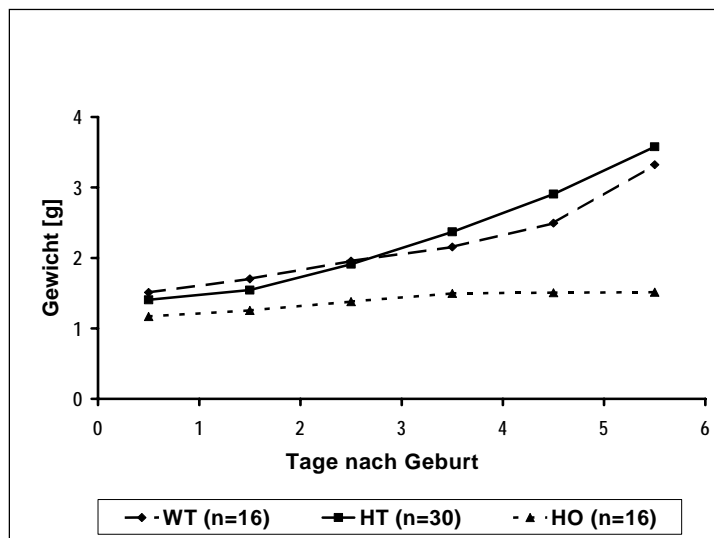


Abb. 4.57: Genotyp-korrelierte, postnatale Gewichtszunahme neonataler Cx43K258stop Tiere

Homozygote Cx43K258stop Tiere zeigten im Gegensatz zu Wildtyp und heterozygoten Cx43K258stop Geschwistern einen deutlich reduzierten postnatalen Gewichtszuwachs.

In Routine-Histologie an Paraffinschnitten zeigte sich in HE-Färbungen, dass in homozygotem Cx43K258stop Zungen- (Abb. 4.58 B) und Ösophagus-Epithel (Abb. 4.58 D) die verhornende Epithelschichten Unterschiede zu Wildtyp-Tieren zeigten. Diese schützende Schicht erschien teilweise zu fehlen, bzw. nicht vollständig intakt zu sein. In Zusammenarbeit mit Prof. Volker Herzog und Ute Kukulies (Institut für Zellbiologie, Bonn) wurden Semidünnschnitte des Ösophagus angefertigt und nach Toluidinblau-Färbung mikroskopisch ausgewertet (Abb. 4.57 E-H). Es bestätigte sich, dass im Wildtyp das Epithel von einer durchgehenden verhornten Schicht geschützt wurde (Pfeile in Abb. 4.57 E,G), während das Epithel im homozygoten Cx43K258stop Ösophagus größtenteils ungeschützt exponiert war (Pfeilspitze in Abb. 4.57 H).

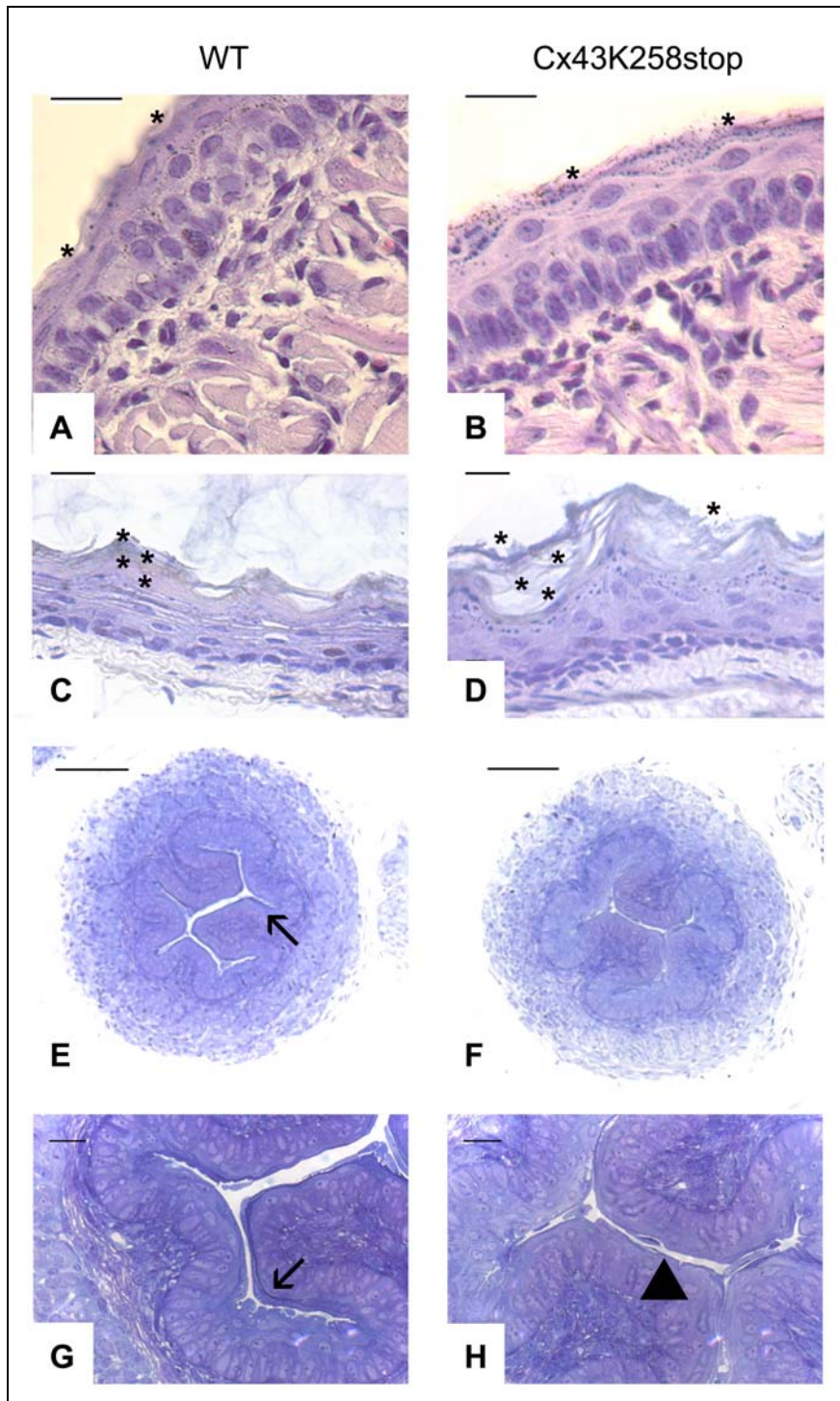


Abb. 4.58: Histologische Analyse des Zungen- und Ösophagus-Epithels in neonatalen Cx43K258stop Tieren

HE-gefärbte Paraffin-Schnitte (A-D) und Toluidinblau-gefärbte Semidünnschnitte (E-H) der Zunge (A, B) und Ösophagi (C-H) von neonatalen Wildtyp (A, C, E, G) und homozygoten Cx43K258stop (B, D, F, H) Tieren wurden histologisch untersucht. Homozygote Epithelien des vorderen Verdauungsapparates zeigten Störungen in der Kontinuität der oberflächlichen, schützenden verhornten Schichten in beiden Geweben (vgl. Sterne in A-D). Während die Oberfläche des Wildtyp-Ösophagus vollständig hiervon bedeckt war (Pfeile in E, G), waren große Bereiche des homozygoten Ösophagus-Epithels ungeschützt (Pfeilkopf in H).

Präparate in E-H hergestellt und zur Verfügung gestellt durch Prof. Volker Herzog und Ute Kukulies (Institut für Zellbiologie, Bonn).

Balken: in A-D, G, H: 20 μ m, in E, F: 100 μ m.

4.III.11 Erste Analysen von Tieren des Genotyps Cx43K258stop/Cx43del

Im Zuge einer Zuchtvorbereitung für Kreuzungen mit Tieren, welche die carboxyterminale Domäne des Cx43 Proteins als Transgen exprimieren (Cecilia Lo, NIH, U.S.A), wurden heterozygote Cx43K258stop Tiere mit heterozygoten Cx43del Tieren (Theis et al., 2001) verpaart. Das *cx43del* Allel entspricht einem *cx43* Knockout Allel, da anstelle der *cx43* kodierenden Region das Reporterogen *lacZ* exprimiert wird. Hierdurch sollte eine Erleichterung der Einzüchtung des Transgens in einen Cx43K258stop Hintergrund ermöglicht werden und zugleich konnte hiermit überprüft werden, ob Tiere mit nur einem *cx43K258stop* Allel lebensfähig sind.

4.III.11.1 Hemizygoter Cx43K258stop Tiere haben gegenüber homozygot mutierten Tieren eine gesteigerte Überlebenswahrscheinlichkeit

Überraschenderweise zeigten Tiere mit einem *cx43K258stop* und einem *cx43del* Allel gegenüber homozygoten Cx43K258stop Tieren eine deutlich gesteigerte Überlebensfähigkeit (Abb. 4.59). Hierzu wurde die überlebende Nachkommenschaft aus Verpaarungen von Cx43/Cx43K258stop Eltern und diejenige aus Verpaarungen von einem Cx43/Cx43K258stop und einem Cx43/Cx43del Elternteil verglichen. Wie in Tabelle 4.7 unter Ergebnisteil 4.III.1 beschrieben, überlebten von insgesamt 415 geborenen Tieren aus Cx43K258stop Heterozygoten-Verpaarungen 219 Tiere, die sich in 81 Wildtyp, 207 heterozygote und 3 homozygote Cx43K258stop Tiere aufteilten. Entsprechend der Mendel'schen Spaltungsregel wurden je 25% Wildtyp und homozygot mutierte Tiere sowie 50% heterozygot mutierte Tiere erwartet. Um somit die Überlebenswahrscheinlichkeit der Gruppen zu berechnen,

Tabelle 4.10: Anzahl überlebender adulter Tiere aus Heterozygoten-Verpaarungen in Abhängigkeit von Genotyp

Gruppe	erwartetes Verhältnisg	observiertes Verhältnis	Anzahl an Tieren
überlebende Wildtyp Tiere	25 %	22,9 %	30
überlebende Cx43/Cx43K258stop Tiere	25 %	24,4 %	32
überlebende Cx43/Cx43del Tiere	25 %	20,6 %	27
überlebende Cx43K258stop/Cx43del Tiere	25%	13,0%	17
Postnatal letal Tiere	0 %	21,6 %	26

wurden die erhaltenen Prozentwerte (Anzahl adulter Tiere eines Genotyps / Anzahl Gesamtzahl geborener Tiere) verdoppelt bzw. vervierfacht. Die Überlebenswahrscheinlichkeit bis ins Alter von mindestens 4 Wochen betrug 78,1% für Wildtyp und 99,8% für heterozygote Cx43K258stop, aber nur 2,9% für homozygote Cx43K258stop Tiere (Abb. 4.59 A). Bei

Vervierfachung der erhaltenen Wahrscheinlichkeiten aus den Verpaarungen von Cx43/Cx43K258stop und Cx43/Cx43del ergaben sich somit folgende Überlebenswahrscheinlichkeiten: Wildtyp: 91,6%, Cx43/Cx43K258stop: 97,6%, Cx43/Cx43del: 82,4% und Cx43K258stop/Cx43del: 52% (vgl. Abb. 4.59 B)

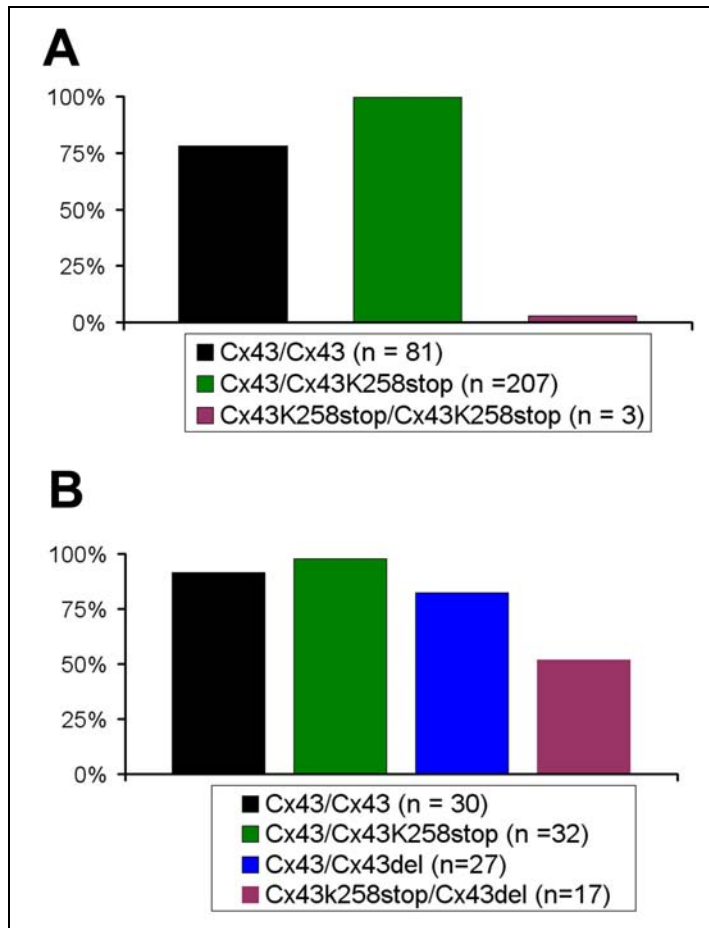


Abb. 4.59: Gesteigertes Überleben von hemizygoten Cx43K258stop Tieren

Die Anzahl der pro Genotyp erhaltenen, adulten Tiere aus heterozygoten Cx43K258stop Verpaarungen (A) und aus heterozygoten Cx43K258stop und heterozygoten Cx43del (B) Verpaarungen wurden verglichen.

Dazu wurden die Werte der Subgruppen entsprechend des erwarteten Mendel'schen Verhältnisses korrigiert. Hierzu wurden die erhaltenen Werte für Wildtyp und homozygote Tiere in A vervierfacht und entsprechend für heterozygote Tiere verdoppelt. In B wurden alle erhaltenen Werte entsprechend verdoppelt. Während von allen erwarteten homozygoten Cx43K258stop Tieren weniger als drei Prozent adult wurden, überlebten mehr als 50 Prozent aller Tiere des Genotyps Cx43K258stop/Cx43del bis ins Erwachsenenalter.

Gesamtzahl geborener Tiere in A: 415, davon neonatal gestorben: 124.

Gesamtzahl geborener Tiere in B: 131, davon neonatal gestorben: 26.

4.III.11.2 Hemizygoten Cx43K258stop Mäuse zeigen keinen funktionalen Defekt der epidermalen Barriere

Nachkommen aus Cx43/Cx43K258stop und Cx43/Cx43del Verpaarungen wurden auf die Funktionalität der epidermalen Barriere untersucht (Abb. 4.60). Es zeigte sich weder bei heterozygoten Cx43del (Abb. 4.60 C) noch bei Cx43K258stop/Cx43del Tieren (Abb. 4.60 B) Anzeichen einer defekten epidermalen Barriere. Im Gegensatz zu dieser *cx43K258stop* Gendosis abhängigen Rettung des epidermalen Phänotyps legten erste *in situ* Analysen von Cx43K258stop/Cx43del Herzen jedoch nahe, dass der in adulten homozygoten Cx43K258stop Herzen beobachtete Phänotyp auch in diesen Tieren auftritt (Abb. 4.61). So wurden auch in adulten Cx43K258stop/Cx43del Tieren "Kugelherzen" mit Infarkten der Apex-nahen linken Ventrikelwand dokumentiert (Pfeilkopf in Abb. 4.61 B, C).

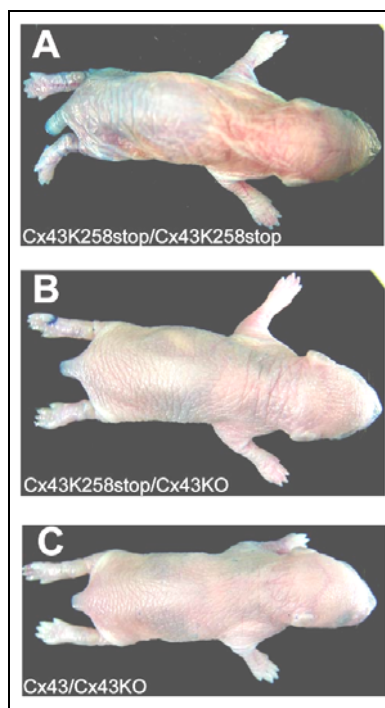


Abb. 4.60: Funktionale Analyse der epidermalen Barriere an Cx43K258stop / Cx43del Tieren

Tag 2 alte homozygote Cx43K258stop (A), Cx43K258stop/Cx43del (B) und heterozygote Cx43del Tiere (C) wurden mittels Toluidinblau-Penetrationsversuchen auf die Funktionalität ihrer epidermalen Barriere analysiert. Während homozygote Cx43K258stop Tiere die bereits dokumentierte Farbstoff-Penetration im Bereich des hinteren Rückens, des Kopfes und der Extremitäten zeigte, zeigten weder Cx43K258stop/del43 (B) noch heterozygote Cx43/Cx43del (C) Tiere einen Defekt der epidermalen Barriere.

KO: Cx43del

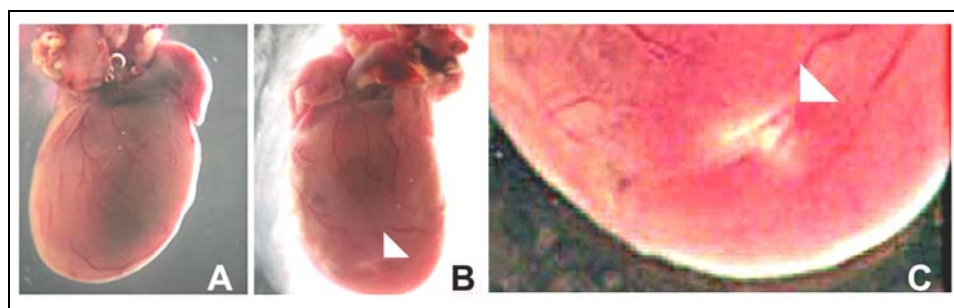


Abb. 4.61 : *In situ* Aufnahmen von adulten Cx43K258stop/Cx43del Herzen

In den ersten Analysen der Herzen adulter Cx43K258stop/Cx43del Tiere traten Kugelform sowie Infarkte im Bereich der Herzspitze auf, wie dies bereits in einigen überlebenden homozygoten Cx43K258stop Tieren gesehen worden war.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erzeugung einer Mausmutante, die anstelle der endogenen eine um die letzten 125 carboxyterminalen Aminosäurereste verkürzte Cx43 Isoform (Cx43K258stop) in allen Zelltypen exprimieren sollte, welche eine Expression des *cx43* Gens zeigen.

Die carboxyterminale Domäne ist wesentlich an der Regulation von Cx43 Gap Junction Kanälen beteiligt. Sie beeinflusst den Öffnungszustand von Cx43 Gap Junction Kanälen, vermittelt direkte intra- und intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkung (Übersicht in Delmar et al., 2004) und bestimmt die Stabilität des Cx43 Proteins (Saffitz et al., 2000; Thomas et al. 2003).

Die Expression der identischen Mutation in *Xenopus* Oozyten (Übersicht in Delmar et al., 2004) oder Fibroblasten (Moorby und Gheradi, 1999) ergab, dass funktionale Gap Junction Kanäle gebildet wurden, denen jedoch wesentliche Regulationseigenschaften fehlten. Entscheidend scheint hierbei die gleichzeitige Funktion der carboxyterminalen Domäne als schneller Sensor für intrazelluläre chemische Veränderungen sowie als aktiver Regulator der Kanaleigenschaften zu sein. Hierdurch kann die interzelluläre Kommunikation über Cx43 Gap Junction Kanäle mittels eines „Ball-and-Chain“ Mechanismus reversibel unterbrochen werden. Dazu bindet ein Bereich der carboxyterminalen Domäne intramolekular an einen Bereich der zytoplasmatischen Schleife (Morley et al., 1996, Delmar et al., 2004). Im Gegensatz zu den aus Cx43 aufgebauten Gap Junction Verbindungen zeigten entsprechende Cx43K258stop Kanäle keinen Verschluss bei intrazellulärer Azidifizierung (Liu et al., 1993), bei Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren (Homma et al., 1998, Moorby und Gheradi, 1999), bei Aktivierung der Src-Kinase (Zhou et al., 1999) sowie infolge einer erhöhten Potentialdifferenz (Moreno et al., 1999).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Auswirkung der Mutation durch die Erzeugung der transgenen Mauslinie Cx43K258stop *in vivo* charakterisiert werden.

5.I Analyse von Cx43 Protein mit stark verkürzter C-terminalen Domäne (Cx43K258stop) in HeLa Zellen

Gleichzeitig mit der Erzeugung der transgenen Cx43K258stop Mauslinie sollte in Zellkultur ein leicht zugängliches Expressionssystem geschaffen werden, um zellbiologische und biochemische Eigenschaften des Cx43K258stop Proteins näher bestimmen zu können. So sollte analysiert werden, ob der Verlust der carboxyterminalen Domäne einen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran sowie die Ausbildung und Funktionalität von homo- und heterotypischen Gap Junction Kanälen hat. Zudem sollte festgestellt werden, ob die Stabilität des Cx43K258stop Proteins gegenüber Cx43 verändert ist.

Hierfür wurde das in der Arbeitsgruppe etablierte HeLa-Zellsystem gewählt (Jones et al., 1971). Diese aus menschlichem epitheliale Cervixkarzinom etablierte Zelllinie ist kommunikationsdefizient. Zahlreiche Arbeiten zur Funktion von Connexinen sind an HeLa-Zelltransfektanten durchgeführt worden (Elfgang et al., 1995; Haubrich et al., 1996; Bedner et al., 2003). Zudem sind in der Arbeitsgruppe stabile HeLa-Transfektanten für die meisten Connexine vorhanden. Aus diesen Gründen wurden HeLa Transfektanten hergestellt, die Cx43K258stop stabil exprimierten.

5.I.1 Cx43K258stop Protein wird in HeLa-Zellen in Form größerer Gap Junction Plaques exprimiert als Cx43

Wildtyp HeLa-Zellen waren vor Beginn der vorliegenden Arbeit erfolgreich durch Birgit Bockemühl mit dem Expressionsvektor *pBEHpac18::Cx43K258stop* stabil transfiziert worden. Immunfluoreszenz-Analysen belegten, dass die Isoform mit stark verkürzter carboxyterminaler Domäne ebenso wie Cx43 Protein vornehmlich in der Plasmamembran lokalisiert war (Abb. 4.2). Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche die identische Mutation in Fibroblasten (Moorby und Gheradi, 1999) oder mittels mRNA Injektion in *Xenopus* Oozyten zur Expression brachten (Morley et al., 1996; Homma et al., 1998; Zhou et al.; 1999, Moreno et al., 2002). Letztere zeigten funktionale Expression durch die elektrophysiologische Analyse von Cx43K258stop Gap Junction Kanälen. Für den Transport zur und die Intergration in die Plasmamembran scheint die an das Tubulin-bindende Motiv anschließende Region der carboxyterminalen Domäne essentiell zu sein, welches in der Cx43K258stop Mutation erhalten ist. Eine um 6 Aminosäuren kürzere Cx43 Isoform ist hingegen vornehmlich zytosolisch lokalisiert (Martinez et al., 2003).

Im Vergleich zu Cx43 exprimierenden HeLa Transfektanten war die Ausdehnung der aus Cx43K258stop aufgebauten Plaques deutlich größer. Interessanterweise sind ähnliche Ergebnisse auch für Fusionsproteine aus Cx43 und grün fluoreszierendem Protein (GFP) veröffentlicht (Falk, 2000; Gaietta et al, 2002; Hunter et al., 2003). Durch die Fusion dieses Proteins an die carboxyterminale Domäne des Cx43 Proteins könnte es auf Grund sterischer Hinderung zu einer veränderten Interaktion mit anderen Proteinen kommen. Entsprechend kann auch das Cx43K258stop Protein in Folge der Deletion von Protein-Bindungsdomänen diese Wechselwirkungen nicht mehr eingehen. Beispielsweise ist die direkte Interaktion der zweiten PDZ-Domäne von ZO-1 mit den letzten vier Aminosäuren der carboxyterminalen Domäne von Cx43 belegt (Giepmans et al., 1998). Da Proteinen mit PDZ-Domänen eine wesentliche Rolle bei der Anordnung von Membranproteinen zugeschrieben wird, kann eine Inhibition der Interaktion mit ZO-1 durch Deletion oder im Fall einiger Fusionsproteine durch eine sterische Blockierung der Bindungsstelle durchaus für die beobachteten größeren immunreaktiven Gap Junction Plaques verantwortlich sein. Auch die Verhinderung der für das Cx43 Protein postulierten Interaktion mit anderen Zytoskelett-assoziierten Proteinen wie

β -Catenin (Wu et al., 2003), p120-Catenin (Xu et al., 2001) oder Debrin (Butkevich et al., 2004) könnte einen entsprechenden Einfluß auf die Größe von Gap Junction Plaques haben.

5.I.2 Cx43K258stop Protein zeigt eine erhöhte Stabilität

Ein andere Grund für die gesteigerte Plaque-Größe kann auch an einer veränderten Internalisation und Degradation liegen. So würde eine gegenüber Cx43 Protein gesteigerte Stabilität des Cx43K258stop Proteins in der Plasmamembran die gesteigerte Größe der Plaques erklären. Der carboxyterminalen Domäne des Cx43 Proteins wird in Einklang mit dieser Vermutung eine entscheidende Rolle für die Regulation des Abbaus dieses Proteins zugeschrieben (Saffitz et al., 2000; Thomas et al., 2003).

Aus diesem Grund wurde die Halbwertszeit des Cx43K258stop Proteins ermittelt (Abb. 4.7). Das in HeLa-Zellen exprimierte Protein zeigte in der Pulse-Chase Analytik eine gegenüber Cx43 Protein mehr als verdoppelte Halbwertszeit. Wie kann nun die Verkürzung der carboxyterminalen Domäne des Cx43 Proteins die Stabilität des Proteins verändern?

Qin et al. (2003) stellten Daten über den Abbau von Cx43 vor, die postulieren, dass die Regulation der Cx43 Protein Degradation ein kooperativer Prozess von sowohl lysosomalem als auch proteosomalem System ist. Hiernach wird über das proteosomale System die Internalisation von Gap Junctions reguliert, während der eigentliche Abbau von Gap Junctions nur lysosomal erfolgt (Naus et al., 1993; Jordan et al., 2001). Da es kaum Belege für eine direkte Ubiquitinierung von Cx43 gibt (Laing und Beyer, 1995), besteht eine Möglichkeit darin, dass zytosolische, mit Cx43 interagierende Proteine wie ZO-1 über das Proteasom abgebaut werden und dadurch die Endozytose und den lysosomalen Abbau des Transmembranproteins erleichtern.

Ein weitergehender Ansatz postuliert eine Regulation der Connexin-Degradation über Interaktionen mit (uncharakterisierten) zytosolischen Proteinen von sehr kurzer Halbwertszeit (Musil et al., 2000). Hierdurch könnte unter Stress-Bedingungen durch Einstellung derer Translation die Halbwertszeit von Connexinen durch die fehlende Anwesenheit ihrer Regulatoren erhöht werden. In beiden Fällen steht die Deletion des größten Teils der carboxyterminalen Domäne des Cx43 Proteins in Einklang mit den vorgeschlagenen Mechanismen. Zum einen würde durch die fehlende Bindung an ZO-1 die primäre Verknüpfung zum Proteasom und letztlich zum lysosomalen Abbau fehlen. Für den endosomal/lysosomalen Abbau von humanem Cx43 Protein wurde zudem durch Thomas et al. (2003) belegt, dass ein Tyrosinrest der carboxyterminalen Domäne, welcher in der Cx43K258stop Mutation nicht mehr vorhanden ist, wesentlich die Halbwertszeit bestimmt. So wird diskutiert, ob dieses Motiv als Bindungsstelle für Proteine des Adaptor Komplexes möglicherweise an der Clathrin-abhängigen Endozytose über Coated Vesicles beteiligt sein könnte. Die Internalisation von annulären Gap Junctions über Coated Pits gilt als wahrscheinlich (Larsen et al., 1979). Zum anderen könnte durch die Deletion auch die

Bindung an das postulierte Halbwertszeit-regulierende Protein (Musil et al., 2000; VanSlyke und Musil, 2003) verhindert werden.

Die direkte oder indirekte Interaktion mit dem Proteasom scheint zudem Auswirkungen auf den Phosphorylierungsstatus von Cx43 zu haben. So wurde nach Hemmung der Proteasomen Cx43 stärker phosphoryliert vorgefunden, was mit einer höheren Dichte an Gap Junction Plaques einherging (Musil et al., 2000; Qin et al., 2003). Auch andere Arbeiten haben gezeigt, dass Phosphorylierung die Stabilität von Gap Junction Plaques erhöhen kann bzw. dephosphoryliertes Cx43 beispielsweise nach Ischämie bevorzugt intrazellulär lokalisiert ist (Beardslee et al., 2000). Dies scheint zunächst im Widerspruch dazu zu stehen, dass Cx43K258stop vermutlich nur moderat phosphoryliert werden kann (Abb. 4.6). Sieht man aber Phosphorylierung auch als eine Möglichkeit der Veränderung oder sogar Verhinderung von Proteininteraktionen an, klärt sich dieser Widerspruch. Beispielsweise ist für die durch die Scr-Kinase vermittelte Phosphorylierung von Cx43 eine Aufhebung der Bindung an ZO-1 gezeigt worden (Toyofuku et al., 2001). Da Protein-Bindungsmotive innerhalb der carboxyterminalen Domäne, die im unphosphorylierten Zustand durch Bindung an andere zytosolische Proteine möglicherweise zur schnellen Degradation führen in der Cx43K258stop Mutante *per se* fehlen, zeigt das Protein auch ohne „schützende“ Phosphorylierung eine höhere Stabilität.

Da *in vitro* Daten aber nicht direkt auf den *in vivo* Zustand rückschließen lassen (Laird et al., 1991; Beardslee et al., 1998), sollten die Ergebnisse der HeLa Transfektanten nicht direkt auf die Situation in einem intakten Gewebe übertragen werden. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Halbwertszeit des Cx43K258stop Proteins *in vivo* von der in HeLa-Zellen festgestellten zelltyp-, entwicklungs- oder auch Situations-spezifisch deutlich abweicht. Dies kann sowohl bedeuten, dass Cx43K258stop Protein in einem Zelltyp/einer physiologischen Situation eine noch deutlich stärker gesteigerte Halbwertszeit als Cx43 Protein hat, aber auch das Gegenteil. Denn durch den Verlust des größten Teils der carboxyterminalen Domäne könnte es auch zu einem Verlust von potentiellen Interaktionen kommen, die das Cx43 Protein stärker gegen Degradation schützen als dies durch die Mutation erfolgt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Halbwertszeit von Connexinen nicht konstant ist, sondern vermutlich durch verschiedene posttranslationale Modifikationen und direkte Protein-Interaktionen dynamisch den jeweiligen zellulären Anforderungen angepasst werden kann und somit als direkte Regelgröße der über Gap Junctions vermittelten interzellulären Kommunikation zu sehen ist.

5.I.3 Das Cx43K258stop Protein bildet ebenso wie Cx43 heterotypische Gap Junction Kanäle aus

Für Connexine ist ein Einfluß zytoplasmatischer Domänen auf die Ausbildung von heterotypischen Gap Junction Kanäle beschrieben (Haubrich et al., 1996). Um zu analysieren, ob die starke Verkürzung der carboxyterminalen Domäne die Kopplungseigenschaften von Cx43K258stop gegenüber Cx43 verändert, wurden daher funktionelle Analysen der heterotypischen Kopplung durchgeführt (Abb. 4.3 und 4.4).

Cx43K258stop Connexone zeigten homotypische Kopplung sowie Kopplung mit aus Cx43 Protein aufgebauten Connexonen. Dies stand in Einklang mit Veröffentlichungen, die den Aufbau funktionaler homotypischer Cx43K258stop Gap Junction Kanäle in anderen Expressionssystemen elektrophysiologisch (Moreno et al., 1996) oder mittels Farbstoff-Ausbreitung zeigten (Moorby und Gheradi, 1999). Darüberhinaus wurde wie für aus Cx43 Proteinen aufgebaute Connexone heterotypische Kopplung mit aus Cx37 und Cx45, nicht aber mit aus Cx26, Cx31, Cx32 oder Cx40 aufgebauten Connexonen belegt. Somit wurde für die untersuchten Connexine gezeigt, dass die verkürzte Cx43-Isoform gleiche Gap Junction Kanalbildung und Kopplungseigenschaften zeigt wie unverändertes Cx43 Protein. Dies legt die Vermutung nahe, dass Cx43K258stop Protein auch *in vivo* gegenüber Cx43 Protein unveränderte Kopplungseigenschaften aufweist.

Nicht aufgeklärt wurde über diese Versuche, ob die Permeabilität und Regulation entsprechender heterotypischer Gap Junction Kanäle verändert sind. Die Ausbreitung von Calcein von Cx43K258stop exprimierenden Zellen zu Cx37 oder Cx45 exprimierenden HeLa Transfektanten erschien gegenüber Cx43 exprimierenden HeLa-Zellen erhöht zu sein. Dies könnte versuchsbedingt sein, da die Zelldichte sowohl von Farbstoff-markierten Cx43K258stop-Zellen als auch von Farbstoff-empfangenden, unmarkierten Zellen gegenüber den Ansätzen mit Cx43-HeLa Transfektanten erhöht war. Der Verlust der carboxyterminalen Cx43 Domäne kann aber auch einen Einfluss auf die Gesamtstruktur von Connexonen und Gap Junction Kanälen haben (Cheng et al., 2003). Damit kann sich die Permeabilität von heterotypischen Gap Junction Kanälen verändern. So ist eine Änderung der pH-Sensitivität von Cx43/Cx43K258stop heterotypischen gegenüber homotypischen Cx43 Kanälen belegt (Francis et al., 1999). Auch eine veränderte bzw. aufgehobene intrazelluläre Bindung an andere Proteine könnte die Struktur heterotypischer Gap Junction Kanäle modifizieren.

Es wurde somit gezeigt, dass aus Cx43K258stop Protein aufgebaute Connexone qualitativ identische homo- und heterotypische Kopplungseigenschaften wie Cx43 Connexone besitzen. Eine veränderte Permeabilität der entsprechenden Kanäle ist jedoch wahrscheinlich. Insbesondere ist hiermit unter Bedingungen zu rechnen, für die Cx43K258stop im Gegensatz zu Cx43 Protein keine Regulation der Kanaleigenschaften über den Ball-and-Chain Mechanismus zeigen kann.

5.I.4 Erhaltene Funktionen des Cx43K258stop Proteins

Das Cx43K258stop Protein wird wie Cx43 Protein in funktionale Gap Junction Kanäle eingebaut. Dies bedeutet, dass Cx43K258stop wie Cx43 Protein während der Translation über in die Membran des Endoplasmatischen Reticulums eingebaut, sich anschließend zu Connexonen zusammenlagern und zur Zellmembran sortiert werden muss. Wie für viele andere Transmembranproteine dient auch Connexinen die erste Transmembrandomäne als Signalsequenz für die Translokation der naszierenden Polypeptidkette ins Lumen des Endoplasmatischen Reticulums (Falk und Gilula, 1998). Da diese Region durch die Mutation nicht betroffen ist, war eine normale Proteintranslation zu erwarten.

Ausgehend von durch Domänen-Austauschmutanten erhaltenen Daten scheint für die Oligomerisierung von Connexinen zu Connexonen innerhalb des Endoplasmatischen Reticulums die dritte Transmembrandomäne entscheiden zu sein (Maza et al., 2003). Da auch hierin durch die Cx43K258stop Mutation keine direkte Veränderung eingebracht wurde, war auch die Ausbildung von Connexonen zu erwarten. Maza et al. (2003) postulieren zudem, dass die zweite extrazelluläre Schleife ein potentieller Bindungsort für Chaperone ist. Sie könnten zum einen die Struktur der dritten Transmembrandomäne innerhalb der Lipid-Doppelschicht während der Oligomerisierung stabilisieren und zum anderen die Zusammensetzung des Connexons regulieren. Da auch hierin keine Mutation eingeführt wurde, ist mit einer normalen Oligomerisierung zu homomeren oder potentiellen heteromeren Connexonen zu rechnen.

Der Transport von Cx43-Connexonen erfolgt vesikulär, Mikrotubuli-assoziiert vom *trans*-Golgi Netzwerk zur Plasmamembran (Lauf et al., 2002). Die unmittelbar an die vierte Transmembrandomäne des Cx43 Proteins anschließende Region beinhaltet eine Tubulin-bindende Domäne (Giepmans et al., 2001). Eine Verkürzung der carboxyterminalen Domäne über die gewählte Cx43K258stop Mutation hinaus an Position 251 führte selbst bei Erhalt der nachgewiesenen Bindungsdomäne für Tubulin (Aminosäurereste 234-243) zu primär zytosolischer Lokalisation von Connexonen (Martinez et al., 2003). Cx43K258stop zeigte hingegen eine überwiegende Lokalisation in der Plasmamembran im Kontaktbereich benachbarter Zellen (Abb. 4.2). Dies legt die Vermutung nahe, dass der Bereich zwischen den Aminosäureresten 251 und 257 essentiell für den vesikulären Transport von Cx43 Connexonen zur Plasmamembran ist. Trotz der nachgewiesenen Bindung an Tubulin erscheint es unwahrscheinlich, dass der Transport ohne konventionelle Mikrotubuli-assoziierte Transportproteine erfolgt. Interessanterweise wurde für das p120-Catenin Protein nachgewiesen, welches zumindest nach Immunpräzipitations-Analysen direkt mit Cx43 zu interagieren scheint (Xu et al., 2001), dass es an Kinesin binden kann und die Geschwindigkeit des Mikrotubuli-assoziierten Transports von Cadherin-haltigen Vesikeln zur Plasmamembran beeinflusst (Chen et al., 2003). Es wäre daher sehr interessant festzustellen,

ob eine direkte Interaktion von Cx43 Protein mit p120-Catenin Protein eventuell in eben dieser Region stattfindet.

Für eine der wenigen in der verkürzten carboxyterminalen Domäne des Cx43 Proteins verbliebenen potentiellen Phosphorylierungsstellen wurde eine schwache cAMP-abhängige Phosphorylierung, vermutlich an Serinrest 244, nachgewiesen (vgl. Gergs, Dissertation 1997). Damit erscheint der verbliebene Rest der carboxyterminalen Domäne noch schwach durch die Proteinkinase A phosphoryliert werden zu können.

5.I.5 Zusammenfassung der im HeLa-System gewonnenen Erkenntnisse im Hinblick auf die *in vivo* Expression des Cx43K258stop Proteins

Das Cx43K258stop Protein wurde vornehmlich in Form von Plaques in den Membranen benachbarter Zellen gefunden und zeigte gegenüber Cx43 unveränderte heterotypische Kopplungseigenschaften. Es ist davon auszugehen, dass Cx43K258stop Protein *in vivo* ebenso die intrinsischen Voraussetzungen für eine funktionale Zusammenlagerung und Expression besitzt. Unterschiede der Expression hinsichtlich Stärke und Lokalisation könnten jedoch auf Grund veränderter Proteininteraktionen oder posttranskriptioneller Modifikationen erfolgen. Die veränderte Plaque-Größe sowie die gesteigerte Halbwertszeit in HeLa-Zellen legen die Vermutung nahe, dass ähnliche Veränderungen auch *in vivo* auftreten. Die Ergebnisse können jedoch nicht direkt auf die *in vivo* Situation übertragen werden, da beispielsweise deutliche Unterschiede der Cx43 Degradation zwischen intaktem Herzmuskel und primären Kardiomyozyten (Saffitz et al., 2000) bestehen.

5.II Herstellung der transgenen Mauslinie Cx43K258stop

Zur Erzeugung homolog rekombinierter embryonaler Stammzellen mit dem *cx43k258stop* Allele wurde die Methode des genetischen Doppellersatzes erfolgreich angewendet. Dazu konnten Vektorvorstufen verwendet werden, die bereits zuvor für den Austausch der kodierenden Region des *cx43* Gens zum Einsatz gekommen waren (Maaß, Diplomarbeit 1999; Plum et al., 2000; Theis et al., 2001). Außerdem waren embryonale Stammzellen der Maus vorhanden, in denen die kodierende Region des *cx43* Gens gegen ein *hprt*-Minigen ausgetauscht worden war (Plum et al., 2000).

Im Zielgenvektor *Cx43K258stop* wurde neben der *cx43K258stop* Mutation auch der in den zur Verfügung stehenden Genaustausch-Vektoren fehlende Intron-Exon II Übergang des *cx43* Gens vollständig wiedereingebracht. Hiermit sollte eine gegenüber *cx43* möglichst unveränderte Transkription des *cx43K258stop* Allels sowie Spleißen und Stabilität der *cx43K258stop* mRNA gewährleistet werden. Der Zielgenvektor wurde mittels Restriktionen (Abb. 4.12) und kommerzieller Sequenzierung überprüft (Anhang) und keine Abweichungen von der erwarteten Sequenz wurden gefunden.

In der etablierten PCR-Reaktion ließen sich für homolog rekombinierter ES-Zellklone die Produkte für das Wildtyp *cx43*-Allel und das *cx43K258stop*-Allel spezifisch amplifizieren. Zusätzlich trat jedoch in der nicht-denaturierenden Gelelektrophorese ein weiteres Signal von intermediärer Größe auf (Abb. 4.15). Dieses Signal entstand auch bei Ansätzen mit PCR-Testvektor Plasmid-DNS und genomischer WT-DNS, nicht aber bei Anwesenheit von nur einer dieser Komponenten. Darum handelte es sich hierbei vermutlich um ein Hybridmolekül aus einem Einzelstrang Wildtyp *cx43*-Amplikon und einem Einzelstrang *cx43K258stop*-Amplikon. Entsprechend traten auch später in der PCR-Analyse heterozygoter *Cx43K258stop* Tiere Hybridsignale auf (Abb. 4.19). In Wildtyp und homozygoten *Cx43K258stop* Tieren traten diese Signale in Übereinstimmung mit der Vermutung nicht auf. Das *cx43K258stop*-Amplikon wurde auf Grund seiner geringeren Größe zudem jeweils bevorzugt gebildet. Um heterozygote Tiere mit sehr schwachen Wildtyp *cx43*-Signalen eindeutig von homozygoten *Cx43K258stop* Tieren zu unterscheiden, wurde eine weitere PCR durchgeführt, welche nur in Anwesenheit eines Wildtyp *cx43*-Allels ein Signal lieferte.

Der Anteil von 14% homolog rekombinierter unter allen isolierten ES-Zellklonen lag etwas höher als die für den zweiten Schritt des doppelten Gensatzes veröffentlichten 10% (Stacey et al., 1994). Andere Anwendungen dieser Methode in unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch bereits Schwankungen zwischen 6% und 27% (Theis et al., 2000). Die übrigen isolierten ES-Zellklone waren mit hoher Wahrscheinlichkeit Wildtyp-Revertanten. Southern Blot-Analysen von isolierten, PCR-negativen ES-Zellklonen in einer anderen Anwendung des genetischen Doppelsatzes hatte dies gezeigt (Diplomarbeit Maaß, 1999). Dies steht in Einklang mit der durch Stacey et al. (1994) formulierten These, dass Genkonversion durch den herrschenden 6-Thioguanin-Selektionsdruck auftreten kann. Hierbei erfolgte in Ausgangszellklonen eine Rekombination zwischen dem *hprt*-markiertem *cx43*-Allel und dem *cx43*-Allel unter Verdopplung des Wildtyp und Verlust des *hprt*-markierten *cx43*-Allels.

6-Thioguanin resistente ES-Zellklone wurden über einen Zeitraum von sechs Tagen isoliert (Abschnitt 4.II.4), da früh auftretende ES-Zellklone häufig einen Wachstumsvorteil auf Grund von Aneuploidie haben (Liu et al., 1997). ES-Zellen, die für die Erzeugung transgener Mauslinien die Keimbahn der zu erzeugenden Chimären besiedeln müssen, sollten jedoch einen hohen Euploidiegrad besitzen (Abbondanzo et al., 1993; Theis et al., 2000). Von den PCR-positiven ES-Zellklonen konnten 31 erfolgreich expandiert werden. Die übrigen zehn ES-Zellklone hatten eine bereits differenzierte Zellmorphologie und ließen sich nicht expandieren. Hierbei handelte es sich um sehr spät isoliert Klone, die vermutlich schon ihre Totipotenz verloren hatten. Durch vorhergehende Anwendungen des genetischen Doppelsatzes (Diplomarbeit Maaß, 1999; Theis et al., 2000) war bekannt, dass erhaltene ES-Zellklone häufig einen geringen Euploidiegrad aufweisen. Bei Anwendung dieser Methode kann die Anhäufung von Mutationen, inklusive Chromosomenabberationen durch die lange *in vitro* Kultur inklusive zweier Elektroporationen erklärt werden (Fedorov et al., 1997; Nagy et al., 2003). So zeigte schon der verwendeten Ausgangsklon vor der zweiten

Transfektion einen Euploidiegrad von unter 40% (Diplomarbeit Maaß, 1999). Daher wurden die PCR-positiven ES-Zellklone zuerst hinsichtlich ihres Karyotyps untersucht (Abb. 4.16). Es ergaben sich durchschnittlich nur zu 20% Kerne mit euploidem Karyotyp (Tabelle 4.4). Ein ES-Zellklon zeigte 90 (± 10)% Euploidie und wurde aus diesem Grund weiter verwendet. In der Southern Blot-Analytik wurde die homologe Rekombination und einfache Integration des Zielgenvektors *Cx43K258stop* im Genom für diesen ES-Zellklon erfolgreich nachgewiesen (Abb. 4.17).

Nach Blastozysteninjektionen dieses ES-Zellklones wurden chimäre Mäuse mit 65 bis 100 prozentigem agouti-farbenen Fellfarbchimärismus geboren (Tabelle 4.6). Für Maus-Chimären ist mehrfach nachgewiesen worden, dass Chimärenanteile, die durch die Fellfarbe reflektiert werden, gut mit der prozentualen Verteilung des Chimärismus in anderen Geweben und Organen übereinstimmen (Mystkowska et al., 1979). Auch chimäre Mäuse, die aus weiblichen embryonalen Zellen (Spendertier-Blastozysten) und männlichen ES-Zellen (manipulierte ES-Zellen) entstehen, prägen in der Regel einen männlichen Phänotyp aus (Robertson et al., 1986). Entsprechend waren auch neun der zehn erhaltenen Chimären Männchen. Drei dieser Tiere zeigten Keimbahn-Transmission des *cx43K258stop*-Allels, d.h. sie vererbten an 50% ihrer Nachkommenschaft das mutierte *cx43K258stop*-Allel. PCR- (Abb. 4.19) und Southern Blot-Analysen (Abb. 4.21) bestätigten die Etablierung der gewünschten *Cx43K258stop* transgenen Mauslinie

5.II.5 Transkriptmenge des *cx43K258stop*-Allels ist gegenüber *cx43*-mRNS unverändert

Gezielte Veränderungen des *cx43* Locus wirkten sich teilweise in einer veränderten Transkriptmenge des jeweiligen Allels im Vergleich zu Wildtyp *cx43*-mRNS aus (Dissertationen Theis, 2001; Eckardt, 2004). Dieser Effekt wurde auf eingeführte Veränderungen des *cx43*-Introns unter Zerstörung einer alternativen Spleißakzeptorstelle zurückgeführt. Da im Zuge der Herstellung des verwendeten Zielgenvektors *Cx43K258stop* der endogene Intron-Exon II Übergang des *cx43* Gens wieder vollständig hergestellt wurde, war ein entsprechender Effekt in *Cx43K258stop* Tieren nicht zu erwarten. Da es ansonsten nur zu einer minimalen Deletion der 3' untranslatierten Region kam (Entfernung von 26 bp zwischen endogenem Stop-Kodon des *cx43* Gens und der zur Einbringung der verkürzten *cx43K258stop* kodierenden Region verwendeten *Cla*I Restriktionsendonuklease-Erkennungsstelle), waren mit großer Wahrscheinlichkeit keine der für Initiation und Termination der Transkription sowie anschließendes Spleißen der prä-mRNS notwendigen Sequenzen verändert worden. Vergleichende Analysen der Transkriptmengen von *cx43*- und *cx43K258stop*-mRNS aus Gesamt-RNS Präparationen zeigten erwartungsgemäß keine Unterschiede (Abb. 4.22).

5.III Homozygote Cx43K258stop Tiere zeigen eine sehr hohe postnatale Letalität

Weniger als drei Prozent aller homozygoten Cx43K258stop Tiere erreichten ein Alter von mindestens vier Wochen. Die Analyse neugeborener Tiere ergab sowohl eine Defizienz in der vollständigen Ausbildung der epidermalen Barriere als auch das Auftreten von Repolarisationsstörungen des Herzens in 20% aller mittels Elektrokardiographie untersuchten Tiere. Im Folgenden wird diskutiert, wie die eingebrachte Cx43K258stop Mutation zu diesen Anormalitäten führen könnte.

5.III.1 Defekt der epidermalen Barriere in neonatalen Cx43K258stop Tieren

Die epidermale (Permeabilitäts-) Barriere ist eine komplexe Struktur, welche aus terminal differenzierten Keratinozyten und Lipiden besteht. Sie ist für ein terrestrisches Leben *ex utero* überlebenswichtig, da sie die Dehydratation und das Eindringen schädlicher Substanzen und Mikroorganismen verhindert (Cartlidge, 2000). Die epidermale Barriere bildet sich zwischen Tag 16 und 18 der Emryonalentwicklung der Maus aus (Hardman et al., 1998). Die Epidermis ist zu diesem Zeitpunkt schon stratifiziert, hat aber noch kein funktionales *Stratum corneum* ausgebildet. Im Zuge des Verschlusses der Barriere verliert die Epidermis ihre Anfärbbarkeit durch Farbstoffe wie beispielsweise Toluidinblau (Abb. 5.1). Parallel finden sukzessive die letzten Prozesse der terminalen Kerationzyten-Differenzierung statt. So tritt erst zu diesem Zeitpunkt vollständig prozessiertes, monomeres Filaggrin auf, welches mit Keratinfilamenten aggregieren kann (Hardman et al., 1998). In den letzten Jahren sind verschiedene transgene Mauslinien mit Defekten der epidermalen Barriere beschrieben worden (Übersicht in: Segre et al, 2003; siehe auch Einleitung 1.II.2.1B) Während Tiere mit einem kompletten Verlust der epidermalen Barriere meist innerhalb der ersten zwei Tage nach der Geburt auf Grund von Dehydratation sterben, können Tiere mit nur punktuellen Barriere-defekten (Chidgey et al., 2001; Reichelt et al., 2001) überleben.

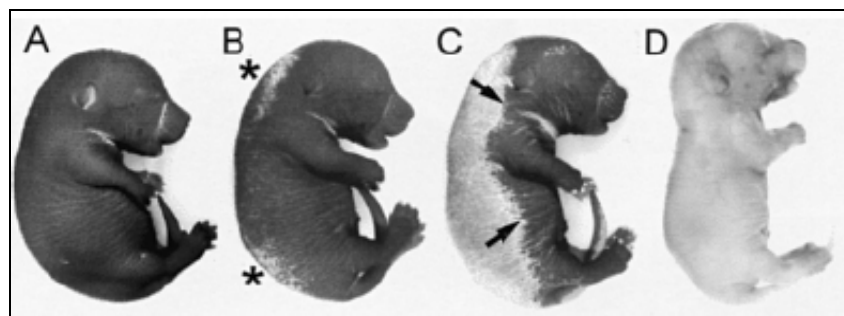


Abb. 5.1: Ausbildung der epidermalen Barriere der Maus zwischen Tag 16 (A) und Tag 18 (D)

Ab Tag 16 der Embryonalentwicklung bildet sich die epidermale Permeabilitätsbarriere aus, wodurch es zum Verlust der zunächst vollständigen Anfärbbarkeit durch Toluidinblau kommt [A-C, schwarze Bereiche]. Von Initiationsorten aus [* in B] schließt sich die Barriere als Front zunächst dorsal [B, C], dann über die Falken [C] und schließlich ventral und an den Extremitäten [D] (modifiziert nach Marschall et al., 2000).

5.III.1.1 Interpretation der makroskopischen Analyse der epidermalen Barriere

Homozygote Cx43K258stop Tiere zeigten in der postnatalen Farbstoff-Penetrationsanalyse mit Toluidinblau und X-Gal unterschiedliche Ergebnisse (Abb. 4.26). Während Toluidinblau insbesondere im Bereich des hinteren Rückens, im Bereich der Stirn und im Bereich der Gelenke eindrang, zeigte durch endogene β -Galctosidasen umgesetztes X-Gal eine Färbung der gesamten Körperoberfläche. Obwohl auch in diesem Versuch keine Anfärbung bei Wildtyp und heterozygoten Tieren gesehen wurde, muss anmerkt werden, dass die X-Gal Färbung nur einmal durchgeführt wurde, und dass dies im Gegensatz zu den Angaben nach Hardman et al. (1998) an Tieren erfolgte, die zuvor einer Toluidinblau-Färbung ausgesetzt waren. Aus diesem Grund werden hier ausschließlich die Ergebnisse der Toluidinblau-Färbung diskutiert

Die für Toluidinblau permeable Fläche war deutlich größer als in transgenen Mäusen, die nur punktuelle Defekte der epidermalen Barriere aufweisen und keine postnatale Letalität zeigen (Chidgey et al., 2001; Reichelt et al., 2001). Dies kann erklären, warum über 90 Prozent aller homozygoten Tiere innerhalb der ersten Woche starben. Dadurch dass jedoch kein vollständiger Verlust der epidermalen Barriere dokumentiert wurde, kann gleichzeitig aber auch erklärt werden, warum nicht alle Cx43K258stop Tiere schon innerhalb der ersten 48 h nach der Geburt starben und ein sehr kleiner Prozentsatz überlebte.

Der Barriere Defekt wurde mittels Toluidinblau Penetration insbesondere im hinteren Rückenbereich dokumentiert (Abb. 4.26 A, B). Dies ist eine Region, die sich schon sehr früh innerhalb der epidermalen Barrierenbildung schließt (vgl. Abb. 5.1 B) und wird als ein Initiationsort der Barrierenbildung angesehen (Hardman et al., 1998). Da auch embryonale Tiere an Tag 17 der Embryonalentwicklung im Vergleich zu heterozygoten und Wildtyp Tieren in diesem Bereich Anzeichen einer verbleibenden Anfärbbarkeit zeigten (Daten nicht gezeigt), könnte es durch die eingebrachte Mutation primär zu einer gestörten Einleitung des Verschließens der epidermalen Barriere kommen. Die postnatale Ausbreitung der Toluidinblau-permeablen Fläche auch auf die Extremitäten sowie das Auftreten von anderen epidermalen Anomalitäten (vgl. 5 III.2) deuten hingegen auf eine generelle Veränderungen der Epidermis dieser Tiere hin. Ein Grund für die Lokalisation der beobachteten Anfärbbarkeit kann daran liegen, dass sich die veränderten Eigenschaften der Epidermis, insbesondere des *Stratum corneums*, durch mechanische Beanspruchung hier besonders stark auswirken.

So zeigte sich in Rasterelektronenmikroskopie-Analysen, dass die Oberfläche der betroffenen Rückenepidermis anders als in Wildtyp Tieren Risse aufwies, welche mehrere Lagen von Korneozyten betrafen (Abb. 4.28). Neben der beobachteten Fragilität zeigte sich auch, dass das Volumen der Korneozyten deutlich reduziert war. Dies deutet auf eine fehlerhafte Hydratation der Korneozyten hin. Die Homöostase der epidermalen Barriere sowie die Integrität und funktionale Desquamation von Korneozyten wird wesentlich durch die

Ausbildung eines sauren pH-Wertes im *Stratum corneum* reguliert (Hachem et al., 2003; Behne et al., 2003). Diese Ansäuerung setzt erst postnatal ein und beginnt an der Grenze zwischen *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* (Behne et al. 2003). Sie ist essentiell für die Lipid-Prozessierung zur Ausbildung funktionaler multilammeller Lipidschichten (Mauro et al., 1998). Eine Möglichkeit der Azidifizierung des *Stratum corneums* besteht im Abbau von monomerem Filaggrin (Elias, 2004). Der mögliche Zusammenhang zwischen der verzögerten Filaggrinprozessierung und dem beobachteten epidermalen Barriere Defekt wird unter 5.III.1.2 ausführlich diskutiert.

Neben einem verzögerten Einsetzen von ansäuernden Prozessen kann aber auch eine generelle Störung der Proteinexpression innerhalb der Lage des *Stratum granulosum* für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sein. Beispielsweise zeigen Mäuse mit Deletion des *loricrin* Gens eine verspätete Ausbildung eines funktionalen *Stratum corneums*, da Loricrin 80% der Proteinmasse des cornified envelopes ausmacht. Durch eine kompensatorische Überexpression von anderen Proteinen des „cornified envelopes“, so von Repetin und Small prolin rich region (SPRR) Proteinen, kann das Fehlen von Loricrin jedoch ausgeglichen werden. Ab Tag 5 bilden die Tiere ein funktionstüchtiges *Stratum corneum* aus und können überleben (Koch et al., 2000; Steinert et al., 2000). In Immunfluoreszenz- und Immunoblot Analysen wurden für Loricrin, das Hauptprotein des „cellular envelope“ keine Unterschiede zwischen homozygot mutierten und Wildtyp Tieren festgestellt. Eine veränderte Expression anderer „cornified envelope“ Proteine in Cx43K258stop Tieren kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die weitergehende Analyse der Expression von „cornified envelope“ Proteinen sowie proteinmodifizierender Enzyme wie der Transglutaminase 1 wird im Ausblick (6.II) angesprochen.

Zudem kann auch eine veränderte Lipid-Synthese (Attar et al., 1997), -Sekretion oder – Prozessierung (Elias et al., 2004) die Funktion der epidermalen Barriere beeinflussen. So führt eine Störung der epidermalen Barriere auch häufig zu einer kompensatorischen Sekretion von „Lamellar Bodies“ (Elias et al., 2002). Ein mögliches Zeichen für eine erhöhte, aber scheinbar fehlerhafte Sekretion von „Lamellar Bodies“ könnten die in der Rasterelektronenmikroskopie beobachteten „Bubbles“ der Korneozytenoberfläche sein (Abb. 4.29). Mögliche diesbezügliche weitergehende Analysen werden im Ausblick (6.II.) behandelt.

Neben der gestörten Verhornung der Epidermis wurden entsprechende Anzeichen auch innerhalb der in Mäusen ebenfalls verhornenden Epithelien des vorderen Verdauungsstraktes gesehen (Abb. 4.58). Beim Menschen führt eine Störung der epithelialen Barriere des Ösophagus, beispielsweise bei gastroösophagalem Reflux (Marcinkiewicz et al., 2000) zu einer schmerzhaften Ösophagitis. Dies könnte durch Erschwerung der Nahrungsaufnahme die sehr geringe Gewichtszunahme neonataler Tiere im Fall homozygoter Cx43K258stop Tiere erklären (Abb.4.57).

5.III.1.2 Einfluss des Cx43K258stop Protein in neonataler Epidermis

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Cx43K258stop Protein in neonataler Epidermis verändert exprimiert wird. Im Vergleich zu Cx43 Protein wurde eine veränderte Lokalisation (Abb. 4.31) sowie eine erhöhte Expressionsmenge nachgewiesen (Abb. 4.35). Eine mögliche Erklärung besteht in einer verlängerten Halbwertszeit des mutierten Proteins. Hierfür spricht, dass die Transkriptmenge des *cx43K258stop* Allels in neonataler Haut nicht verändert war (Abb. 4.33) und für Cx43K258stop Protein in HeLa-Zellen eine verlängerte Halbwertszeit festgestellt wurde (Abb. 4.7).

5.III.1.2.A Veränderte Lokalisation von Cx43K258stop in der Epidermis

Im Zuge der Embryonalentwicklung verändert sich das epidermale Connexin-Expressionsprofil (Choudhry et al., 1997): Während Cx43 und Cx26 Protein zwischen Tag 12 und 15 in suprabasalen und basalen Kerationzyten koexprimiert werden, findet sich Cx26 Protein ab Tag 17 nur noch im *Stratum granulosum*, während Cx43 Protein in basalen sowie den suprabasalen Kerationzyten des *Stratum spinosum* lokalisiert ist (Brissette et al., 1994). Da sich im Zuge der terminalen Differenzierung ein ansteigender Kalzium-Gradient innerhalb der Epidermis aufbaut (Kalinin et al., 2002) und in primären Keratinozyten ein Wechsel der Connexin-Expression durch Kalzium induziert werden kann, wird vermutet, dass auch der vollständige Wechsel von einer breiten zu einer auf die tiefen Lagen der Epidermis beschränkten Expression des Cx43 Proteins von der Kalzium-Konzentration abhängig ist (Brissette et al., 1994). Eine PKC-vermittelte Reduktion der über Cx43 vermittelten interzellulären Gap Junction Kommunikation ist beispielsweise während der Herzentwicklung beschrieben (Duncan und Fletcher, 2002). Eine entsprechende durch PKC-vermittelte Phosphorylierung und resultierende Schließung von Gap Junction Kanälen könnte somit trotz hoher Kalzium-Konzentration auf Grund der starken Verkürzung der carboxyterminalen Domäne für das Cx43K258stop Protein also nicht mehr eintreten. Gleichzeitig könnten durch die Verkürzung auch Interaktionen mit anderen Proteinen nicht mehr erfolgen (Musil et al., 2000), welche eventuell die Stabilität von Cx43 in den verschiedenen Lagen der Epidermis regulieren.

5.III.1.2.B Veränderte Gap Junction vermittelte Kommunikation in Cx43K258stop der Epidermis

Der Zeitpunkt der Veränderung der epidermalen Connexinausprägung überschneidet sich mit dem Beginn der terminale Kerationzyten-Differenzierung und somit der Ausbildung der epidermalen Permeabilitätsbarriere (Hardman et al., 1998). Die Veränderung des Connexin-Expressionsprofils geht vermutlich auch mit einem selektiven Wechsel der Gap Junction vermittelten interzellulären Kommunikation einher (Brissette et al., 1994). Obwohl durch Farbstoff-Injektionen in murine embryonale (Choudhry et al., 1997) oder humane adulte Epidermis (Wiszniewski et al., 2000) bis jetzt noch keine der Gap Junction Expression entsprechende epidermale Subkompartimentierung festgestellt werden konnte, zeigten adulte

Mäuse mit konditionell deletiertem Cx43 eine gegenüber dem Wildtyp deutlich reduzierte Ausbreitung von Farbstoff (Kretz et al., 2003), während Cx31 defiziente Epidermis keine verminderte Farbstoffausbreitung zeigte. Vergleichbare Versuche an Cx43K258stop Epidermis konnten bisher nicht zufriedenstellend durchgeführt werden (Carsten Euwens, persönliche Mitteilung). Die Anwesenheit großer Mengen an Cx43K258stop in den oberen Schichten der Epidermis könnte aber die terminale Differenzierung durch gesteigerte interzelluläre Kommunikation zwischen Keratinozyten des *Stratum granulosum* und *Stratum spinosum* stören. Dies könnte sich auf die schichtspezifische Konzentration an cAMP (Denda et al., 2004) oder Kalzium (Denda et al., 2003) auswirken. Der im Zuge der Keratinozyten-Differenzierung ansteigende und für den Erhalt der Barrierefunktionen essentielle Kalzium-Gradient (Elias et al., 2002) könnte somit zerstört werden bzw. sich gar nicht erst funktionstüchtig ausbilden können. Ein Indiz hierfür ist in der veränderten Expression und Prozessierung von Filaggrin zu sehen (vgl. 5.III.1.3). Neben der erhöhten Anzahl könnte sich auch die stark eingeschränkte Regulierung des Öffnungszustandes von Cx43K258stop Gap Junction Kanälen durch Verlust des „Ball-and-Chain“ Verschlussmechanismus negativ auf die terminale Differenzierung auswirken. So zeigen Gap Junction Kanäle einen Verschluss bei hohen Kalzium-Konzentrationen (Saez et al., 1989). Falls der Verschlussmechanismus hierbei für Cx43 Protein wie im Zuge einer Ansäuerung über den „Ball-and-Chain“ Mechanismus erfolgt (Morley et al., 1996), könnte auch diese Regulation im Fall des Cx43K258stop Proteins nicht erfolgen. Dies würde zusätzlich für eine Zerstörung des epidermalen Kalzium-Gradienten sorgen.

5.III.1.3 Veränderte Expression und Prozessierung von Profilaggrin-Protein neonataler Epidermis

In neonataler Cx43K258stop Haut zeigte sich eine veränderte Expression und Prozessierung von Filaggrin bzw. des Vorläuferproteins Profilaggrin. Dies wurde zum einen durch das vorzeitige Auftreten von Keratohyalin granulae in den mittleren Lagen der Epidermis in histologischen und elektronenmikroskopischen Analysen deutlich (Abb. 4.27). Zum anderen zeigten Immunfluoreszenz-Analysen mit Antikörpern, die gegen ein Epitop aus Filaggrin gerichtet waren, ebenfalls positive Signale in Lagen, die histologisch dem *Stratum spinosum* zugerechnet werden. (Abb. 4.30). Dabei kann durch die Epitoperkennung nicht zwischen der Detektion von Profilaggrin, Prozessierungsintermediaten und vollständig prozessiertem Filaggrin unterschieden werden. Immunoblot-Analysen belegten keine generell gesteigerte Expression, jedoch eine Störung der Filaggrinprozessierung in neonataler Cx43K258stop Epidermis (Abb. 4.34). Filaggrin, welches beim Übergang vom *Stratum granulosum* zum *Stratum corneum* mit Keratinfilamenten assoziiert und hierdurch das Innenskelett der Keratinozyten ausbildet, wird im Zuge der Stratifizierung zunächst als Profilaggrin gebildet. Dieser inaktive hochphosphorylierte Vorläufer besteht aus Filaggrinmonomeren und einer aminoterminalen Domäne, welches einem Kalzium-bindenden Protein der S-100 Familie

entspricht (Rothnagel und Steinert; 1990, Presland et al.; 1992, Zhang et al., 2002). Im Zuge der terminalen Differenzierung wird dieser Vorläufer Kalzium-abhängig dephosphoryliert und zu Filaggrinmonomeren und dem aminoterminalen S-100 Protein prozessiert. Die Filaggrinmonomere können Keratinfilamente bündeln und stellen zudem 10% der Proteinmasse des „cornified envelopes“ (Steven und Steinert, 1994). Außerdem wird Filaggrin über verschiedene Enzyme in den obersten Schichten des *Stratum corneum* zu modifizierten freien Aminosäuren abgebaut, den sogenannten „Humectans“ (Elias, 2004). Hierbei entstehen die osmotisch wirksamen „Humectans“, welche für die Flexibilität des *Stratum corneums* als essentiell angesehen werden; zum anderen führt die Bereitstellung von Protonen aus diesem Abbau zur Regulation des pH-Wertes, welcher für (Schutz-)Funktionen des *Stratum corneums* entscheidend ist (siehe Abb. 5.2).

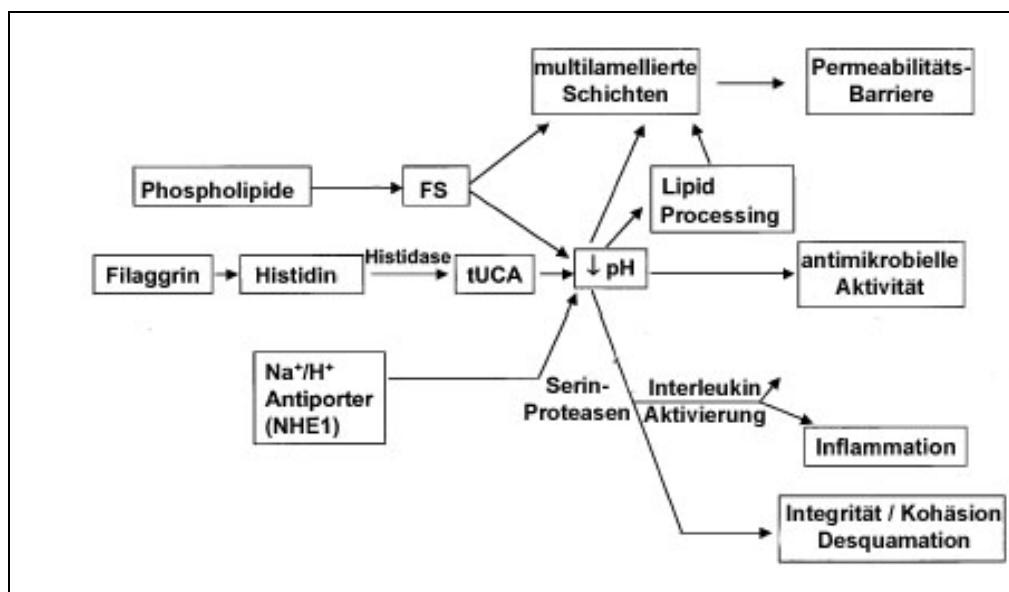


Abb. 5.2: Metabolische Aktivitäten und Funktionen des *Stratum corneums*

Die Proteolyse von Filaggrin zu Aminosäuren (z.B. Histidin) und deren Desaminierung führt zur Bildung von Humectants (z.B. trans-Urocansäure, tUCA) und Protonen. Weitere Ansäuerung erfolgt durch die Hydrolyse von polaren Lipiden (z.B. Phospholipide) zu unpolaren Lipiden des „lipid envelopes“ (z.B. freie Fettsäuren, FS) sowie die Aktivität eines Natrium/Protonen-Antiporters (NHE-1). Diese Ansäuerung reguliert die Aktivität mehrerer Enzyme: verschiedene Proteasen (u.a. Serin-Proteasen) vermitteln durch Abbau der Korneodesmosomen die Desquamation (Abblättern von Korneozyten). Zudem erfolgen weitere Modifikationen des lipid envelopes (modifiziert nach Elias, 2004).

Interessanterweise transloziert das aminoternale Filaggrin S-100 Protein nach der proteolytischen Freisetzung in den Zellkern und scheint als Kalzium-abhängiger Transkriptionsfaktor an der Regulation von Genen der terminalen Kerationzyten-Differenzierung beteiligt zu sein (Pearson et al., 2002). Nach der verspäteten Freisetzung von monomerem Filaggrin in neonataler Epidermis (Abb. 4.34) wäre es interessant, die Freisetzung dieses Regulatorproteins mit der Hilfe eines entsprechenden Antikörpers zu verfolgen.

Neben dem aminoterminalen Filaggrin S100 Protein sind mindestens 13 weitere S100-Proteine epidermal exprimiert (Eckert et al., 2004). Diese Proteine interagieren nach Bindung von Kalzium mit verschiedenen Effektor-Proteinen. Ihre wichtige Funktion in der Epidermis wird dadurch unterstrichen, dass sie beispielsweise während der Wundheilung oder in verschiedenen epidermalen Erkrankungen überexprimiert werden (Übersicht in: Eckert et al., 2004). Von Bedeutung könnte in diesem Zusammenhang auch die Tatsache sein, dass zudem das direkt an Cx43 Protein bindende NOV-Protein einen Teil seiner regulativen Wirkungen über S100 Proteine erfüllt. So wurde eine direkte Interaktion des NOV Proteins mit dem Protein S100A4 nachgewiesen (Li et al., 2002). Da NOV primär in Gehirn und im Herz exprimiert wird (Joliot et al., 1992), könnte eventuell ein verwandtes Protein an einer direkten Kopplung zwischen der Regulation der Cx43 Expression und Regulierung der Lokalisation oder Aktivität von Kalzium-bindenden S100-Proteinen in der Epidermis beteiligt sein.

Zusammenfassend ist zu betonen, dass in Cx43K258stop Epidermis ein verspätetes Auftreten vollständig prozessierten Filaggrins festgestellt wurde. Die vollständige Prozessierung von Profilaggrin ist jedoch essentiell für die funktionale Ausbildung der epidermalen Barriere (Hardman et al., 1998; List et al., 2003). Eine wesentliche Rolle der veränderten Filaggrin Expression und Prozessierung für den epidermalen Phänotyp von neonatalen Cx43K258stop Mäusen ist auch darin zu sehen, dass überlebende homozygot mutierte Mäuse eine gegenüber Wildtyp Mäusen unveränderte zelluläre Lokalisation und Prozessierung dieses Proteins zeigten.

5.III.1.4 Veränderte Expression von Cx26 und ZO-1 Protein in neonataler Epidermis

Neben der veränderten Cx43K258stop und Filaggrin Proteinexpression wurde in homozygot mutierter Epidermis eine verstärkte Expression von Cx26- (Abb. 4.31) und ZO-1-Protein (Abb. 4.32) festgestellt. Die erhöhte Expression von Cx26-Protein steht mit Beobachtungen in Einklang, dass Cx26-Protein in verletzter Haut generell verstärkt ausgeprägt wird (Lucke et al., 1999).

Die erhöhte Expression von ZO-1-Protein ist schwerer zu erklären, da Cx43- und ZO-1-Protein ihre normalen Ausprägungshöhepunkte in unterschiedlichen Lagen der Epidermis haben. Während Cx43 insbesondere in den unteren Schichten der Epidermis exprimiert wird, findet sich Tight Junction assoziiertes ZO-1 insbesondere in den Lagen des *Stratum granulosum*. Es gibt jedoch für beide Proteine eine Überschneidungszone im Bereich des *Stratum spinosum*. Hier könnte es zu direkten Protein-Protein-Wechselwirkungen der beiden Proteine kommen. Eventuell haben Regulationen, die in diesen Lagen am carboxyterminalen Schwanz des Cx43 Proteins erfolgen, auch Einfluss auf das Lokalisationsmuster von ZO-1. Für ZO-1 sind Interaktionen mit anderen Proteinen beschrieben, die einen rückwirkenden Einfluss auf die Expressionsstärke und Lokalisation dieses Proteins haben. Hierzu zählen das GTPase-aktivierende Protein SPAL (Roy et al., 1999) und der Transkriptionsfaktor ZONAB (Balda et al., 2003). Eine veränderte Interaktion mit Cx43 könnte auch Einfluss auf diese ZO-

1 bindenden Proteine nehmen und schließlich rückwirkend eine veränderte Expression von ZO-1 nach sich ziehen. Die verstärkte Expression von ZO-1 Protein, insbesondere in den Lagen des *Stratum spinosum*, könnte aber auch unabhängig von einer veränderten Interaktion mit Cx43K258stop in homozygoter Cx43K258stop Epidermis indirekt erfolgen. So ist eine verstärkte Expression von ZO-1 Protein im *Stratum spinosum* in menschlichen Hauterkrankungen beschrieben, die mit einer gestörten Differenzierung der Epidermis einhergehen. Dies wurde durch Pummi et al. (2001) für die Epidermis von Psoriasis, Lichen planus und Ichthyosis vulgaris Patienten beschrieben.

5.III.2 Vohwinkel Syndrom ähnlicher Phänotyp in neonatalen Cx43K258stop Mäusen

Das Auftreten von Einschnürungen in den Schwänzen neugeborener Cx43K258stop Tiere (Abb. 4.24 und 4.36), welches bei überlebenden Tieren zu Autoamputation von Teilen des Schwanzes führen konnte (Abb. 4.25), erinnert an das Erscheinungsbild der humanen Erkrankung Vohwinkel Syndrom. Hierbei handelt es sich um eine Keratose, die mit Fingerverstümmelung einhergeht. Zwei Formen dieser Erkrankung sind bekannt, eine konnte mit dem *loricrin*-Genlocus (Korge et al., 1997), eine andere, die mit dem Auftreten von Taubheit verknüpft ist, mit dem *cx26*-Genlocus in Verbindung gebracht werden (VanSteensel et al., 2002). Mauslinien, die entweder mutiertes Loricrin (Suga et al., 2000) oder mutiertes Cx26 exprimieren (Bakirtzis et al., 2003), prägten Merkmale dieser humanen Erkrankung aus. Einschnürungen wurden insbesondere im Bereich des Schwanzes aber auch der Phalangen dokumentiert.

Mäuse, die mutiertes Loricrin exprimierten, zeigten neben der makroskopische Ausbildung des Vohwinkel Syndrom Phänotyps eine gestörte epidermale Barriere Funktion (Suga et al., 2000). Auch in Patienten mit der Loricrin korrelierten Form des Vohwinkel Syndroms konnte eine veränderte Permeabilitätsbarriere nachgewiesen werden. Zudem zeigten die Korneozyten der Patienten eine gesteigerte Fragilität, erkennbar durch gestörte Hydratisierung und Desquamation (Schmuth et al., 2004). Dies traf auch auf die Korneozyten von Cx43K258stop Epidermis zu. Mäuse, welche die Cx26D66H Mutation epidermal exprimierten, zeigten in der Rasterelektronenmikroskopie ebenfalls eine Defizienz der Desquamation. Hierdurch erschien die epidermale Oberfläche des Schwanzes vollständig glatt (Bakirtzis et al., 2003). Dieses wurde auch in der Analyse von homozygoten Cx43K258stop Neugeborenen gesehen (Abb. 4.36). Im Vergleich zu Wildtyp Wurfgeschwistern zeigten diese Tiere in Rasterelektronenmikroskopie-Analysen eine vollständig glatte Oberfläche ohne Anzeichen abblätternder Korneozyten. Die Einschnürungen entstanden durch lokale Invagination der Epidermis. Routine-Histologie im Bereich der Einschnürungen zeigte, dass es sich hierbei um Invagination von kompakten Bereichen des *Stratum corneums* handelte.

Der ähnliche Phänotyp in Cx43K258stop und Cx26D66H Mäusen deutet darauf hin, dass die verstärkte Expression von mutierten Connexinproteinen in den Lagen des *Stratum granulosum* zumindest postnatal zu einer eingeschränkten Funktionalität des *Stratum corneum* führen kann, welches sich in einem Vohwinkel Syndrom Phänotyp auswirkt.

5.III.3 Morphologische und elektrophysiologische Anomalien in neonatalen Cx43K258stop Herzen

5.III.3.1 Cx43K258stop Herzen zeigen nicht den morphologischen Phänotyp von Tieren mit genereller Deletion des *cx43* Gens

Homozygote Cx43K258stop Herzen zeigten nicht die morphologischen Anomalien (Abb. 4.41), die für Mäuse mit genereller Deletion des *cx43* Gens beschrieben sind (Reaume et al., 1995). In diesen Tieren kommt es zu einer Verengung des rechtsventrikulären Ausflusstraktes durch die vermehrte Bildung von Muskelbälkchen (*Trabeculae carnae*), die teilweise zu blind endenden Taschen fusionieren (Reaume et al., 1995; Ya et al., 1998). Lo et al. (1999) konnten anhand verschiedener transgener Mauslinien nachweisen, dass dieser Phänotyp direkt mit der *cx43* Gendosis verknüpft ist, die in migrierenden Neuralleistenzellen exprimiert wird. Da homozygote Cx43K258stop Tiere diesen Phänotyp nicht ausbilden, kann davon ausgegangen werden, dass die Einwanderung von Neuralleistenzellen durch die starke Verkürzung der carboxyterminalen Domäne des Cx43 Proteins nicht beeinflusst wird. Veränderte Regulation oder Proteininteraktion scheint somit anders als die Variation der exprimierten Cx43 Proteinmenge nicht diesen morphogenetischen Prozess zu beeinflussen.

5.III.3.2 Cx43K258stop Herzen zeigen eine veränderte Herzform und Proteinexpression

Dennoch zeigten die neonatalen Herzen homozygoter Cx43K258stop Tiere morphologische Anomalien (Abb. 4.42, 4.43). So waren die Herzen kleiner und zeigten eine veränderte, kugelige Gesamtform. Anzeichen einer Fehlfunktion des linken Ventrikels waren vorhanden, erkennbar in der Dilatation des herzspitzennahen Bereichs. Diese Veränderung spiegelt vermutlich wechselseitige Einflüsse von sowohl veränderter Kardiomyozyten-Architektur als auch veränderten elektrophysiologischen Eigenschaften der Cx43K258stop Herzen wider (siehe 5.III.3.4).

So wurden Veränderungen in der Expression von Cx43K258stop und ZO-1 Protein gegenüber der Ausprägung in Wildtyp Herzen neonataler Tiere dokumentiert (Abb. 4.45). In neonatalen Herzen sind noch keine Glanzstreifen ausgebildet, wie man sie im adulten Myokard findet (Barker et al., 2002). Stattdessen sind Cx43 und Kalzium-abhängige Zell-Zellkontakt Proteine, so auch ZO-1, gleichmäßig in der Plasmamembran von Kardiomyozyten verteilt. Erst innerhalb der ersten Wochen bilden sich funktionale Glanzstreifen aus, in denen

Adhärenzverbindungen mit Gap Junctions kolokalisiert sind (Peters et al., 1994; Angst et al., 1997).

Zur Zeit werden für die Lokalisierung von Cx43 zu den *Disci intercalares* zwei verschiedene Möglichkeiten diskutiert. Zum einen könnte innerhalb der Myozyte eine unterschiedliche Degradationsgeschwindigkeit für Cx43 Protein bestehen (Saffitz et al., 2000). Bei Übertragung der in HeLa-Transfektanten ermittelten verlängerten Halbwertszeit des Cx43K258stop Proteins könnte dieser Mechanismus in den homozygoten neonatalen Herzen gestört sein.

Eine andere These, aufgestellt von Toyofuku et al. (1998), postuliert, dass Cx43 über direkte Protein-Protein Wechselwirkung zu den präsumtiven Glanzstreifen lokalisiert wird. Einer veränderten Wechselwirkung zwischen Cx43 und ZO-1 liegt auch die Umorganisation von Cx43 Gap Junction Plaques im ischämischen Herz zugrunde. So findet man im Zuge der Ansäuerung eine Schwächung der Wechselwirkung mit ZO-1 unter gleichzeitiger präferenzzieller Interaktion mit c-Src (Toyofuku et al., 2001; Duffy et al., 2004). Dies führt zu Phosphorylierung und Internalisierung von Cx43. Dies würde, übertragen auf die Bildung von Glanzstreifen bedeuten, dass im Bereich von zukünftigen *Disci intercalares* an ZO-1 gebundenes Cx43 besser vor Internalisierung und Abbau geschützt ist. Wiederum würde dieser regulative Effekt bei Deletion des größten Teils der carboxyterminalen Domäne ausgesetzt.

Für den ZO-1 vermittelten Transport von Cx43 und die Ausbildung von Gap Junction Plaques scheint die Bindung von ZO-1 Protein an Catenine wichtig zu sein (Wu et al., 2003). Erste Analysen zeigten auch eine leichte Erhöhung der β -Catenin Expression in neonatalen Cx43K258stop Herzen (Abb. 4.46). Zukünftige Analysen an primären Kardiomyozyten sollten es ermöglichen, den Aufbau von Adhärenzverbindungen und Gap Junction Plaques in homozygoten Cx43K258stop und Wildtyp Zellen unter Berücksichtigung der verschiedenen möglicherweise beteiligten Proteine genauer zu vergleichen (Ausblick 6.III).

5.III.3.3 Atrioseptaler Defekt in einem neonatalem Cx43K258stop Herz

Im neonatalen Herzen eines homozygoten Cx43K258stop Tieres wurde ein persistierendes *Foramen ovale* detektiert (Abb. 4.43). Ein Einfluß der Gendosis von Cx43 auf die Bildung atrialer und ventrikulärer Septen ist zumindest für Tiere belegt, die eine generelle Defizienz des *cx40* Gens und eine Haplodefizienz des *cx43* Gens tragen (Lo, 2000; Kirchhoff et al., 2000). Interessanterweise wurden in zwei Familien, die an der Cx43 verknüpften Erbkrankheit ODDD leiden, Herzanomalitäten dokumentiert. Für einen Patienten, der die Cx43G21R Mutation trug, wurde ein Defekt des atrialen Septums dokumentiert (Paznekas et al., 2003). Zudem wurde eine Korrelation von ODDD und Septierungsdefekten des Herzens beschrieben, bevor diese Erkrankung überhaupt mit Mutationen des *cx43* Gens in Verbindung gebracht wurde (Schneider et al., 1977; Judisch et al., 1979). Somit kann eine veränderte

Regulation oder Permeabilität von Cx43 Gap Junction Kanälen offensichtlich die Ausbildung eines funktionellen Septums zwischen linkem und rechtem Vorhof stören.

5.III.3.4 Repolarisationsstörungen in neonatalen Cx43K258stop Herzen

Gap Junctions wird eine entscheidende Rolle für die Geschwindigkeit und Richtung der Reizweiterleitung im Herzen zugeschrieben (Übersichten in: Severs et al., 2004; Gros et al. 2004). Gleichzeitig erlaubt die Kopplung der Zytoplasmata benachbarter Kardiomyozyten das Angleichen der individuell erzeugten Aktionspotentiale durch das Fließen elektrotonischer Ströme. Der wesentliche Befund für neonatale homozygote Cx43K258stop Herzen in Oberflächen-Elektrokardiographien war eine drastische Verlängerung des QT-Intervalls sowie eine gleichzeitig auftretenden Veränderung der Form der T-Welle in 20% aller Tiere (Abb. 4.44). Diese Veränderung von EKG-Parametern lassen sich als Überlagerung von LongQT- und Brugada-Syndrom interpretieren und deuten auf eine gestörte Repolarisation des Ventrikels hin (Roberts und Brugada, 2000). Der beobachtete Repolarisationsdefekt kann entweder durch die intrinsischen Eigenschaften des mutierten Cx43 Gap Junction Kanals ausgelöst werden oder indirekt durch eine veränderte Interaktion und/oder Lokalisation von Ionenkanälen.

5.III.3.4.A Direkter Einfluss der Cx43K258stop Mutation auf die Repolarization

Die carboxyterminale Domäne ist an der schnellen Verschließung von Cx43 Gap Junction Kanälen im Zuge einer transjunktionalen Potentialveränderung beteiligt. Dies könnte für die gerichtete Weiterleitung von myokardialen Aktionspotentialen wichtig sein, insbesondere im Zuge von Tachykardien (Moreno et al., 2002). Durch Verlust dieser Regulation kann es somit insbesondere in Regionen hoher Cx43K258stop Gap Junction Plaque Dichte zu Störungen der Erregungsrückbildung kommen. Molekular wurde in neonatalen Herzen eine Veränderung der Cx43K258stop Proteinexpression in der Ventrikelwand im Vergleich zu Wildtyp Herzen festgestellt. Cx43 zeigte insbesondere eine erhöhte Expression in epikardialen Bereichen des Ventrikels.

5.III.3.4.B Indirekter Einfluss der Cx43K258stop Mutation auf die Repolarization

Für Cx43 Gap Junction Plaques und Natrium-Kanälen ist im Herzen eine Kolokalisation beschrieben (Kucera et al., 2002). Eine veränderte Expression von Cx43K258stop Protein könnte somit auch indirekt über eine Beeinflussung der Lokalisierung oder ausgeprägten Menge an Ionenkanälen zu der beobachteten Veränderung der Repolarisation führen. Insbesondere Mutationen im SCN5A Kanal sind im Menschen mit Repolarisationsstörungen wie Brugada-Syndrom oder LongQT-Syndrom in Verbindung gebracht worden (Rivolta et al., 2001; Priori et al., 2000). Beide Syndrome lassen sich auf Störungen der ventrikulären Repolarisation durch veränderte Dauer des Aktionspotentials in einer Subgruppe von Zellen

rückführen. So ist die typische Erhöhung des ST-Segments im Brugada-Syndrom auf eine Verkürzung der Dauer des epikardialen Aktionspotentials zu erklären (Yan and Antzelevitch, 1999). Die Verlängerung des QT-Intervalls im LongQT-Syndrom ist auf eine selektive Verlängerung des Aktionspotentials der M-Zellen zurückzuführen, welche eine Kardiomyozyten-Subpopulation in der mittleren Region der Ventrikelwand sind (Akar et al., 2002). Für das LongQT-Syndrom ist zudem beschrieben, dass Repolarisationsstörungen sich nicht immer in einem Oberflächen-EKG dokumentieren lassen. Dies könnte bedeuten, dass sich in epikardialen Ableitungen in mehr als 20% aller homozygot mutierten Tiere Repolarisationsstörungen messen werden lassen. Sowohl Brugada als auch Long-QT-Syndrom können im jungen Alter zu tödlichen Arrhythmien führen (Antzelevitch et al., 1999). Auch wird ein Zusammenhang zwischen LongQT-Syndrom und plötzlichem Kindstod diskutiert (Schwartz et al., 1998). Daher ist es möglich, dass ein Teil der homozygoten Cx43K258stop Tiere auf Grund von Repolarisationsstörungen des Herzens sterben.

Für die genaue elektrophysiologische Analyse des zugrunde liegenden Mechanismus der Repolarisationsstörung kann die zukünftige Etablierung von primären Kardiomyozyten-Kulturen oder dreidimensionalen Ventrikelpräparaten helfen. Letztere ermöglichen die Bestimmung der Einzelaktionspotentiale in verschiedenen Kardiomyozyten-Subpopulationen innerhalb der ventrikulären Wand.

5.IV Erkenntnisse aus der Analyse adulter Cx43K258stop Tiere und Cx43del/Cx43K258stop Tiere

Da weniger als ein Prozent aller homozygoten Cx43K258 Tiere ein Alter von vier Wochen oder mehr erreichten, konnten für die verschiedenen Fragestellungen nur eine begrenzte Anzahl von Versuchen durchgeführt werden. Die Ergebnisse werden dementsprechend als Tendenzen angesehen und diskutiert. Zugleich werden erste Ergebnisse von adulten Tieren der Cx43del/Cx43K258stop transgenen Mauslinie mit in die Diskussion eingebracht.

5.IV.1 Erzeugung der Cx43K258stop/Cx43del Mauslinie

In Kooperation mit Cecilia Lo (NIH, Bethesda, USA.) sollte eine *in vivo* Rettung durch Kreuzung von Cx43K258stop Tieren mit transgenen Mäusen versucht werden, welche die carboxyterminale Domäne des *cx43* Gens unter Kontrolle eines *CMV*-Promotors ektopisch exprimieren.

Um die Einzüchtung des Transgens in einen *cx43K258stop* Hintergrund zu beschleunigen, wurden dazu heterozygote *cx43 KO* Tiere geschickt, welche zusätzlich das Transgen der carboxyterminalen Domäne exprimieren sollten. Durch die Verpaarung mit heterozygoten Cx43K258stop Tieren sollten so innerhalb einer Generation Tieren geboren werden, welche nur die verkürzte Cx43K258stop Protein Isoform sowie das carboxyterminale Polypeptid exprimieren. Diese Tiere tragen entsprechend ein *cx43K258stop* und ein *cx43 KO* Allel im *cx43* Locus.

Zur Überprüfung der Lebensfähigkeit von Tieren mit nur der halben *cx43K258stop* Gendosis wurden darum auch heterozygote Cx43K258stop Tiere mit heterozygoten Cx43del Tieren verpaart. *Cx43del* entspricht einem *cx43 KO* Allel, da die kodierende Region des *cx43* Gens in allen Zellen gegen ein *LacZ* Reportergen ausgetauscht ist (Theis et al., 2001). Überraschenderweise zeigten Tiere mit einem *cx43K258stop* und einem *cx43del* Allel gegenüber homozygoten Cx43K258stop Tieren eine signifikant erhöhte Überlebensfähigkeit (Abb. 4.59).

Aussagen zu einer *in vivo* Rettung durch die Expression der carboxyterminalen Domäne des Cx43 Proteins sind jedoch noch nicht möglich, da die versendeten Mäuse nicht das gewünschte Transgen trugen. Nach zahlreichen durchgeführten Verpaarungen wurde durch Cecilia Lo mitgeteilt, dass das Transgen in falscher Orientierung hinter den *CMV*-Promotor eingebracht worden war. Da die empfohlene PCR-Analyse über Amplifikation der im Transgen enthaltenen Dehydrofolatreduktase-Sequenz erfolgte, war die invertierte Orientierung der für die carboxyterminalen Domäne des Cx43 Proteins kodierenden Sequenz nicht ersichtlich. Die Zucht dieser Linie wurde daher eingestellt. Die Zusendung neuer transgener Mäuse, in welchen dieser Fehler behoben ist, soll in nächster Zukunft erfolgen.

5.IV.2 Epidermis überlebender Cx43K258stop Tiere zeigt normale Filaggrin-Expression und Prozessierung

Die Analyse der Lokalisation und Expressionsstärke von Proteinen, die in neonataler Cx43K258stop Epidermis Veränderungen gezeigt hatten (Abschnitt 4.III.6), ergab eine gesteigerte Expression von Cx43K258stop und ZO-1 Protein auch in adulter Epidermis (4.37 und Abb. 4.38). Cx43K258stop Protein war im Gegensatz zu neonataler Epidermis deutlich schwächer im *Stratum granulosum* ausgeprägt und somit bezüglich der Lokalisation vergleichbar der Wildtyp-Epidermis insbesondere in *Stratum basale* und *Stratum spinosum* exprimiert. ZO-1 Protein war in beiden Genotypen hauptsächlich im Bereich von Zellkontakten im *Stratum granulosum* lokalisiert. Wie in neonataler Cx43K258stop Epidermis war aber auch in adulten Tieren die Größe der immunpositiven Signale gesteigert.

Im Gegensatz zu Cx43K258stop und ZO-1 Protein war Filaggrin ebenso wie in Wildtyp Epidermis ausgeprägt und ausschließlich im *Stratum granulosum* lokalisiert (Abb. 4.37). In Western Blot-Analysen zeigte sich auch eine unveränderte Filaggrin-Prozessierung im Vergleich zu Wildtyp und heterozygoten Cx43K258stop Tieren (Abb. 4.38). Somit besteht der wesentliche innerhalb der vorliegenden Arbeit ermittelte Unterschied zwischen überlebenden und neonatalen Cx43K258stop Tieren in einer Wiederherstellung der normalen Filaggrinexpression und -prozessierung. Mögliche Zusammenhänge zwischen der Cx43K258stop Mutation und den Veränderungen hinsichtlich der Filaggrinexpression und -prozessierung sind unter 5.III.1.2 ausführlich diskutiert.

Interessanterweise zeigten unter 5.IV.1 erwähnte transgene Mäuse, die ein generell deletiertes *cx43* Allel und ein *cx43K258stop* Allel in sich tragen, nicht den epidermalen Phänotyp homozygoter Cx43K258stop Mäuse. Diese Tiere haben somit nur die halbe Gendosis an *cx43K258stop*. In ersten Immunfluoreszenz-Analysen zeigten sie zwar auch ein verändertes Ausprägungsmuster von Cx43K258stop Protein in der Epidermis und eine gegenüber Cx43 Wildtyp Epidermis erhöhte Proteinmenge. Jedoch war die Menge an Cx43K258stop Protein deutlich geringer als in homozygoten Tieren. Gendosis-Effekte von ektopisch exprimierten Proteinen sind auch in anderen transgenen Mauslinien mit Defekten der epidermalen Barriere beschrieben (Elias et al., 2001). Eventuell könnte somit auch eine Varianz in der Expression des Cx43K258stop Proteins in der Epidermis homozygoter Cx43K258stop Mäuse erklären, warum knapp ein Prozent dieser Tiere überleben können.

5.IV.3 Ovarien überlebender Cx43K258stop Weibchen zeigen eine gestörte Follikelreifung

Adulte homozygote Cx43K258stop Weibchen sind infertil (Abschnitt 4.III.7). Histologische Untersuchungen ergaben, dass sich in den Ovarien von homozygoten Cx43K258stop Tieren keine reifen Tertiärfollikel ausbildeten. Es kam zu keiner funktionalen *Antrum*-Bildung. Zudem erschien es ohne Ovulation zur Bildung von Gelbkörpern zu kommen (Abb. 4.39).

Interessanterweise spiegelt dieser ovariale Phänotyp den transgener Mäusen mit genereller *cx37* Deletion wider (Simon et al., 1997). Es gilt heute als abgesichert, dass Oozyten zumindest während der späten Follikelreifung ausschließlich Cx37 Protein ausprägt (Kidder und Mhawi, 2002), während in Granulosazellen sechs verschiedene Connexine inklusive Cx43 exprimiert werden (Wright et al., 2001). Follikel aus Mäusen mit genereller *cx43* Deletion zeigten nach Verpflanzung und Reifung der Ovarien in den Nierenkapseln von Wildtyp Mäusen schon eine Störung der frühen Follikelreifung. Das Wachstum wurde auf der Stufe der Primärfollikel eingestellt (Juneja et al., 1999). Neben der Versorgung der Oozyte mit Nährstoffen scheint auch die Arretierung der Meiose mittels Erhaltung eines hohen cAMP Spiegels die wesentliche Aufgabe von Cx43 Gap Junctions während der Follikelreifung zu sein.

In der Analyse der heterotypischen Kopplung wurde nachgewiesen, dass aus Cx43K258stop Protein aufgebaute Halbkanäle funktionstüchtige heterotypische Gap Junction Kanäle mit Cx37 Connexonen ausbilden können (Abb. 4.3). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die für die metabolische Versorgung der Oozyte essentielle Kopplung über Cx37 Protein auf Seite der Oozyte und Cx43K258stop Protein auf Seite der Granulosazellen erfolgen kann. Entsprechend tritt auch keine Störung der frühen Follikelreifung auf wie dies bei genereller Deletion von *cx43* beobachtet wird.

Nach Stimulation mit luteinzierendem Hormon (LH) erfährt Wildtyp Cx43 Protein eine Phosphorylierung und anschließende Reduktion der Expression (Granot und Dekel, 1998). Dies scheint entscheidend für eine Ovulation zu sein. LH führt somit zur Unterbrechung der Zell-Zell-Kommunikation, was zu einer Reduktion der cAMP-Konzentration in der Oozyte, der Wiederaufnahme der Meiose und zum Eisprung führt. Der Verlust der LH-vermittelten Regulation für aus Cx43K258stop Protein aufgebaute Connexone kann den beobachteten Phänotyp erklären.

Neben der veränderten Kanalregulation kann auch eine veränderte Stabilität des Cx43K258stop Proteins einen gravierenden Einfluß haben. In ersten Western Blot-Analysen zeigte sich eine deutlich gegenüber Cx43 Protein gesteigerte Menge an Cx43K258stop Protein in heterozygoten und homozygoten Ovarien. Während in heterozygoten Tieren der Effekt scheinbar durch die kooperative Wirkung von unveränderten Cx43 Proteinen in heteromeren Cx43/Cx43K258stop Connexonen aufgefangen werden kann, führt in

homozygoten Tieren die gesteigerte Expression und zum Verlust der Regulation und somit zu der beobachteten Fertilitätsdefizienz homozygoter Cx43K258stop Weibchen.

5.IV.4 Cx43K258stop Protein in adulten Cx43K258stop Herzen

Überraschenderweise zeigte das Cx43K258stop Protein wie das Cx43 Protein eine Lokalisation in den Glanzstreifen adulter Herzen (Abb. 4.53).

Dies bedeutet, dass zumindest in der kleinen Gruppe überlebender homozygoter Cx43K258stop Tiere die verkürzte Connexin-Isoform auch ohne die Funktionen der carboxyterminalen Domäne in den *Disci intercalares* exprimiert wird. Eventuell ist somit für die Lokalisierung des Proteins eine Region entscheidend, die im verkürzten Cx43 Protein noch erhalten ist. So kann neben der Wechselwirkung mit ZO-1 Protein (Toyofuku et al., 1998) auch eine direkte Interaktion mit Mitgliedern der Catenin-Familie, wie α - und β -Catenin (Wu et al., 2003) oder p120-Catenin (Xu et al., 2001) für den Aufbau von Gap Junction Plaques in Kardiomyozyten essentiell sein.

Xu et al. (2003) zeigten in kultivierten Kardiomyozyten, dass die Injektion von Antikörpern gegen α - oder β -Catenin den Aufbau von Gap Junction Plaques verhinderte. Auch die Expression von N-Cadherin mit Deletion der extrazellulären Domäne (Hertig et al., 1996) untermauern die Vermutung, dass der Aufbau funktionaler Adhärenzvermingungen essentiell für den Aufbau von Gap Junction Plaques ist. Da die Ablation von Gap Junctions jedoch im Gegensatz keinen Einfluß auf den Aufbau von Adhärenzverbindungen hat (Gutstein et al., 2002), scheint der Aufbau bzw. der Prozess des Aufbaus dieser Zellkontakte eine Vorbedingung oder verknüpft mit dem Aufbau von Gap Junction Plaques zu sein.

In Western Blot-Analysen adulter Herzen zeigte sich im Gegensatz zu neonatalen Herzen eine deutlich schwächere Expression von Cx43K258stop als Cx43 Protein (Abb. 4.55). Dies deutete auf eine reduzierte Stabilität des Cx43K258stop Proteins in adulten Herzen hin. Vermutlich ist dies auf den Verlust von posttranslationalen Modifikationen zurückzuführen.

Eine Phosphorylierung von Cx43 kann unter verschiedenen Bedingungen zu unterschiedlichen Veränderungen der Gap Junction vermittelten Kopplung sowie Proteininstabilität führen. So führt die Aktivierung der Stress-aktivierten Protein Kinase JNK (Petrich et al., 2002) oder von c-Src (Toyofuku et al., 2001) beispielsweise zu einer verminderten Kopplung und zumindest im ersten Fall auch zu einer Reduktion der Proteinmenge. Andererseits liegt Cx43 Protein im intakten Myokard vornehmlich in phosphorylierten Form vor und Dephosphorylierung in Folge von Ischämie führt zu einem Verlust der Kopplung (Beardslee et al., 2000).

Vermutlich erfolgt in der carboxyterminalen Domäne eine zelltyp-spezifische Abstimmung aus Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen (Giepmans et al., 2003). Dabei erfolgen Phosphorylierungen, die essentiell für die Expression von funktionalen Gap Junction Kanälen sind, solche die Proteine-Protein-Interaktionen modifizieren und andere, welche die Stabilität

dieses Proteins modifizieren (Hossain und Boynton, 2000; Saffitz et al., 2000; Toyofuku et al., 2001). Durch den Verlust von stabilisierenden Phosphorylierungen oder Protein-Protein-Wechselwirkungen erfolgt also im adulten Herzen eine schwächere Expression des Cx43K258stop Proteins.

Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen des linken Ventrikels zeigten ebenso wie in neonatalen Cx43K258stop Herzen keine kompensatorischen Expressionsunterschiede der ebenfalls im Herzen exprimierten Connexine Cx40 und Cx45 (Abb. 4.47, Abb. 4.48, Abb. 4.54 und Abb 4.55).

5.IV.5 Veränderte Morphologie und Funktionalität adulter Cx43K258stop Herzen

Adulte Cx43K258stop Herzen zeigten häufig eine veränderte Form sowie großflächige Infarkte (Abb. 4.50). Die veränderte Herzform war auch schon in neonatalen Tieren aufgetreten. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine persistierende Anomalie, welche durch das Zusammenspiel aus veränderter Kardiomyozytenarchitektur und elektrophysiologischer Eigenschaften der Cx43K258stop Herzen resultiert (vgl. 5.III.3.2).

Eine höhere Anfälligkeit für oder größere Ausdehnung von Infarkten kann auf die verlorene Schutzfunktion durch die Deletion der carboxyterminale Domäne zurückzuführen sein. Cx43 zeigt bei intrazellulärer Ansäuerung, einer Begleiterscheinung von Sauerstoffunterversorgung, eine schnelle Schließung von Gap Junction Kanälen durch den Ball-and-Chain Mechanismus (Morley et al., 1996; Delmar et al., 2004). Durch die große Deletion der carboxyterminalen Domäne ist somit diese Interaktion verhindert und die ischämische Situation kann mehr Kardiomyozyten erfassen als in Herzen, die unverändertes Cx43 exprimieren. Im Einklang hiermit stehen erste Analysen an Cx43del/Cx43K258stop Herzen, welche ebenfalls Infarkte zeigten. Auch hier wird nur die verkürzte Cx43 Isoform in Kardiomyozyten ausgeprägt.

In ersten Telemetrie-Analysen adulter Cx43K258stop Tiere zeigte sich eine Tendenz zu einer Verlängerung des QRS-Komplexes (Abb. 4.51), welches einer Verzögerung der Erregungsweiterleitung im Ventrikel entspricht. Dies steht vermutlich in direktem Zusammenhang mit der beobachteten Reduktion der Menge an Cx43K258stop Protein. So führte sowohl die Entkopplung von Kardiomyozyten (Rohr et al., 1998) als auch die Deletion von Cx43 zu einer verlangsamten ventrikulären Reizweiterleitung (Vaidya et al., 2001). Verschiedene Mausmodelle, die zu einer starken Reduktion der Menge an exprimiertem Cx43 Protein führten, zeigten eine verzögerte Propagation der ventrikulären Erregung (Übersicht in: Gros et al., 2004). Gegensätzliche Ergebnisse bestehen dazu, ob schon eine 50 prozentige Verringerung der Cx43 Proteinmenge zu einer Reduktion der Reizleitgeschwindigkeit führt. Während Gutstein et al. (2001) eine signifikante Reduktion der Reizleitungsgeschwindigkeit nachwies, stellten Morley et al. (1999) keine Veränderung gegenüber Wildtyp Mäusen fest. Ähnliche Ergebnisse liegen auch von van Rijen et al. (2004) vor, wonach eine zumindest 70-

95 prozentige Abnahme der Cx43 Expression erfolgen muss, um eine signifikante Verkürzung der Reizweiterleitung feststellen zu können. Dies stimmt überein mit der deutlich mehr als 50 prozentigen Verringerung des Cx43K258stop Protein in adulten homozygot mutierten Herzen gegenüber der Menge an Cx43 Protein, welche in Wildtyp Tieren exprimiert wird.

Erste Echokardiographie-Analysen an homozygoten Cx43K258stop Herzen wiesen auf eine eingeschränkte Funktion des linken Ventrikels hin. Auf Grund der geringen Anzahl überlebender Tiere konnten nur zwei Tiere analysiert werden. Ein Tier zeigte eine signifikante Hypertrophie des linken Ventrikels, was zu einem drastisch reduzierten Volumen und somit eingeschränkter Pumpleistung des Herzens führte. Das zweite Tier wies die typische Kugelform neonataler, homozygoter Cx43K258stop Herzen auf. Das Herz war deutlich dilatiert und zeigte eine stark eingeschränkte Funktion des linken Ventrikels. Weite Teile der Ventrikelwand waren akinetisch. Im Bereich der Herzbasis, also nahe der Atrien, zeigte die Muskulatur hyperkinetische, aber völlig unsynchrone Kontraktionen. Auch in diesem Herz war die Pumpfunktion des Herzens sehr stark eingeschränkt. Auf Grund der kleinen Anzahl analysierter Tiere kann nur die Tendenz zu einer eingeschränkten Funktion des linken Ventrikels festgestellt werden.

Mausmodelle, die Arrhythmien ohne Veränderungen der Herzstruktur entwickeln, wurden durch Mutationen verschiedener Ionenkanal-Gene erzeugt. Im Gegensatz dazu waren Mausmodelle, die Arrhythmien im Zuge von Veränderungen der Herzstruktur entwickeln, durch Mutationen von Zytoskelettproteinen des Sarcomers entstanden (Übersicht in: Roberts und Brugada, 2000). Da in neonatalen Tieren stets eine Veränderung der Herzform, aber nur in 20% aller Fälle eine Veränderung der Elektrophysiologie des Herzens nachgewiesen wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die Veränderungen in Cx43K258stop Herzen primär auf einen Einfluss der Kardiomyozyten-Architektur rückzuführen ist.

Insbesondere zukünftige Analysen an Kardiomyozyten Kulturen sowie die weitergehende Analyse von adulten Cx43/Cx43K258stop sowie überlebender homozygoter Cx43K258stop Tieren sollten helfen, die verändernden Mechanismen aufzuklären, welche durch die Cx43K258stop Mutation entstehen.

5.IV.6 Veränderte Expression von ZO-1 in heterozygoten, adulten Cx43K258stop Herzen

Wie zuvor erwähnt scheint zumindest im Herzen die Ausbildung von *Maculae* und *Zonulae adhaerens* nicht auf die Anwesenheit von funktionalen Gap Junctions angewiesen zu sein. Gutstein et al. (2003) zeigten, dass sich bei konditioneller Ausschaltung des *cx43* Gens in Abwesenheit von Gap Junction Kanälen funktionelle Adhärenzverbindungen und somit Glanzstreifen ausbilden. Wie kann ausgehend von diesen Ergebnissen die stark veränderte

ZO-1 Expression in adulten heterozygoten, aber nicht homozygoten Cx43K258stop Herzen erklärt werden (Abb. 4.55 und 4.55)?

Eine Erklärung wäre darin zu sehen, dass die gleichzeitige Expression von Cx43 und Cx43K258stop Protein einen dominanten Effekt auf die ZO-1 Expression und Lokalisation ausübt. Während sich in Wildtyp, homozygoten Cx43K258stop und generell Cx43 deletierten Herzen letztendlich funktionale Adhärenzverbindungen aufbauen, führt die Coexpression von Cx43 und Cx43K258stop zu drastischen Veränderungen.

Dies kann nicht auf die Gendosis der carboxyterminalen Domäne von Cx43 Protein zurückzuführen sein, da Tiere mit einem *cx43* Allel und einem konditional ausgeschalteten *cx43* Allel in Immunoblot- und Immunfluoreszenz-Analysen eine unveränderte ZO-1 Expression zeigten (Dominik Eckardt, persönliche Mitteilung). Eine Möglichkeit besteht darin, dass aus Cx43 und Cx43K258stop aufgebaute Gap Junction Plaques eine veränderte Regulation und/ oder Halbwertszeit haben, welches sich direkt auf die Expression von ZO-1 auswirkt. Wiederum könnte dies durch veränderte Interaktionen mit anderen Proteinen ausgelöst werden, die mit ZO-1 interagieren und die Expression dieses Proteins regulieren, so SPAL (Roy et al., 1999) oder ZONAB (Balda et al., 2003).

5.V Vergleich der Cx43K258stop Mausslinie mit humanen Erkrankungen durch Mutationen des *cx43* Gens

5.V.1 Cx43K258stop und Oculodentodigitale Dysplasie (ODDD)

ODDD zeichnet sich insbesondere durch Anomalien der Größe und des Abstandes der Augen sowie Zahnschmelzdysplasie und Missbildungen der Mittelhand und Mittelfuß Knochen aus. In wenigen Patienten, die unter ODDD leiden, ist eine Hyperkeratose der Handinnenflächen und Fußsohlen beschrieben (Paznekas et al., 2003).

Ein Grund, weshalb ODDD-Mutationen nicht zu einer schweren epidermalen Anomalie führen, wie dies die Cx43K258stop-Mutation in Mäusen zeigt, könnte in dem unterschiedlichen Expressionmuster von epidermalen Connexinen in Mensch und Maus liegen. Im Gegensatz zur Maus wird Cx43 Protein in menschlicher Epidermis insbesondere im *Stratum granulosum* ausgeprägt, während die Keratinozyten des *Stratum basale* vornehmlich Cx26 exprimieren (Richard, 2000).

Zudem liegen die bis heute ermittelten Mutationen des *cx43* Gens, die mit ODDD in Zusammenhang stehen, nicht innerhalb der carboxyterminalen Domäne. Dies könnte bedeuten, dass der Effekt der ODDD-Mutationen eher darin besteht, die Permeabilität oder die Ausbildung von Kanälen zu verändern, während die Cx43K258stop Mutation in erster Linie die Regulation der Cx43 Gap Junction Kanäle sowie ihre Stabilität modifiziert. Vielleicht ist eine vergleichbare Mutation im Menschen auch schon vorgeburtlich letal, da die Mutation eine normale Embryonalentwicklung unmöglich macht. Dies würde bedeuten, dass

die Veränderung der Regulation von Cx43 Gap Junction Kanälen im Menschen eine schwerwiegendere Auswirkung hätte als die Veränderung der Permeabilität. Dies könnte erklären, wieso noch keine ODDD-assoziierten Mutationen innerhalb der carboxyterminalen Domäne des Cx43 Proteins beschrieben sind.

Bezüglich der festgestellten Herzanomalien in Cx43K258stop Mäusen besteht jedoch eine Übereinstimmung mit Beobachtungen an ODDD-Patienten. So zeigte ein Patient mit der Cx43G21R Mutation einen Defekt des Vorhofseptums. Schon bevor ODDD Mutationen dem *cx43* Gens zugeordnet werden konnten, wurde eine Verbindung zwischen diesem Syndrom und Septenfehlbildungen im Herz dokumentiert (Schneider et al., 1977; Judisch et al., 1979).

5.V.2 Cx43K258stop und menschliche Herzmissbildungen

Punktmutationen, die zum Verlust von phosphorylierbaren Aminosäureresten des Cx43 Proteins führen, konnten beim Menschen mit dem Auftreten komplexer Herz-Mißbildungen in Verbindung gebracht werden (Britz-Cunningham et al., 1995). Hierbei handelt es sich um viszeralatriale Heterotaxien, wobei die schweren Herz-Mißbildungen mit veränderter Organlage einhergehen. Dasgupta et al. (2001) zeigten zudem einen Zusammenhang zwischen *cx43* Mutationen und einer Unterentwicklung des linken Ventrikels. Es wird vermutet, dass diese Mutationen die funktionale Phosphorylierung und somit Regulation von Cx43 während der Herzentwicklung behindern.

In Cx43K258stop Herzen konnte weder eine auffällige Veränderung der Organlage noch eine signifikante Hypoplasie des linken Ventrikels festgestellt werden. Es konnten jedoch eindeutig eine Veränderung der Herzform und Anzeichen einer Dilatation des linken Ventrikels in neugeborenen homozygoten Cx43K258stop Tieren dokumentiert werden. In adulten Tieren zeigte sich eine eingeschränkte Funktion des linken Ventrikels.

Insgesamt zeigten die Herzen homozygoter Cx43K258stop Tiere eine veränderte Morphogenese und in adulten Tieren manifestierte sich eine persistierende Fehlfunktion. Zusammen mit den unter 5.III.3 und 5.IV.4 diskutierten Punkten spricht dies dafür, dass eine funktionale Regulation von Cx43K258stop Gap Junction Kanälen im embryonalen und postnatalen Herzen für die Ausbildung einer geordneten Kardiomyozyten-Architektur und somit funktioneller Aktivität der Ventrikel wichtig ist.

6. Ausblick

6.I Ausblick für Cx43K258stop exprimierende HeLa-Zellen

Mit Hilfe dieses Zellkultursystems können die veränderten Funktionen des Cx43K258stop Proteins weiterhin in einem leicht zugänglichen System analysiert werden. Beispielsweise könnte durch eine von Peter Bedner in der Arbeitsgruppe etablierten Methode (Bedner et al., 2003) die Permeabilität von Cx43K258stop Gap Junctions für cAMP direkt mit der von Cx43 Gap Junctions verglichen werden.

Desweiteren kann durch die Verbindung von Farbstoffinjektion und Gabe verschiedener Stimuli die Veränderung der Regulation der interzellulären Kopplung in Cx43K258stop exprimierenden HeLa-Zellen untersucht werden. So kann die Auswirkung der Deletion zahlreicher Proteinkinase-Erkennungsstellen in der carboxyterminalen Domäne des Cx43 Proteins durch Veränderung der Farbstoffkopplung bei Gabe von spezifischen Kinasen-Aktivatoren oder Inhibitoren im Vergleich mit Cx43 exprimierenden HeLa-Zellen untersucht werden.

Neben Stimulationen, die zu Veränderungen des Öffnungszustandes führen, können auch die Auswirkungen einer veränderten Degradation analysiert werden. So sind für die Cx43K258stop HeLa-Zellen erste Analysen bezüglich einer Hemmung der proteosomalen und lysosomalen Degradation im Vergleich zu Cx43 Transfektanten durch Dr. Stephanie Urschel in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt worden.

Bis zu einer Etablierung von primären Zellkulturen aus Geweben der Maus verbleibt dieses System die einzige Möglichkeit der Analyse von verschiedenen biochemischen Eigenschaften der Cx43K258stop Mutation, so der Bestimmung der Halbwertszeit des Proteins unter verschiedenen physiologischen Bedingungen.

6.II Ausblick für die weitere Aufklärung des epidermalen Phänotyps homozygoter Cx43K258stop Mäuse

Für die weitere Aufklärung der zu Grunde liegenden Veränderungen der epidermalen Anomalie können weiterführende Analysen direkt an neonatalen Cx43K258stop Tieren oder an primären Keratinozyten Kulturen durchgeführt werden.

6.II.1 Ausblick für die weitere Aufklärung des epidermalen Phänotyps an neonatalen Tieren

Zunächst können Analysen der Lipidzusammensetzung des *Stratum corneums* durchgeführt werden. Im Zuge der terminalen Differenzierung wird die Plasmamembran in eine vollständige Lipidhülle umgebaut. Hierbei kommt es zu einem bevorzugten Einbau von unpolaren Lipiden. Verbliebene polare Phospholipide werden in unpolare Lipide umgebaut. Zudem erfolgt die Exozytose und Prozessierung von Lipiden unter Bildung multilamellierter Schichten zwischen den Corneozyten-Lagen. Für diese Prozesse ist die Synthese und Sekretion von „Lamellar Bodies“ essentiell. Auch im Zuge einer Störung der epidermalen Barriere erfolgt kompensatorisch eine verstärkte Sekretion von Lamellar Bodies. Ein Zeichen für eine Störung der Lamellar Bodies Sekretion könnten die in der Rasterelektronenmikroskopie beobachteten „Bubbles“ der Corneozyten-Oberfläche sein.

Der Lipidgehalt, die Form der multilammetierten Schichten und die Lamellar Bodies Sekretion kann histologisch mittels Färbung mit Nile Red oder elektronenmikroskopisch mittels Rutheniumtetroxid überprüft werden (Denda et al., 2003). Die Lipidzusammensetzung der gesamten Epidermis oder aber auch von bestimmten Regionen kann über Dünnschichtchromatographie der enthaltenen Lipide untersucht werden (in Absprache mit AG. Sandhoff, Bonn).

Für eine Überprüfung der Funktionen des *Stratum corneum* könnten zudem verschiedene modifizierende Enzyme wie Transglutaminasen und Proteasen untersucht werden (Elias, 2004). Neben der Analyse des *Stratum corneums* sollte auch das *Stratum granulosum* weiter analysiert werden. So kann es bei langanhaltender Störung der epidermalen Barriere zu einer veränderten Genexpression von Proteinen der terminalen Differenzierung kommen (Elias et al., 1998; 2002). Transkriptmengen-Analysen könnten somit Rückschlüsse auf eine veränderte Genregulation und damit auf einen Einfluss einer veränderten Connexinexpression auf die Regulation der terminalen Differenzierung auf Genregulationsebene ergeben.

Gleichzeitig sollten die Veränderungen auf Proteinexpressionsebene näher untersucht werden. So könnte die Epidermis überlebender Tiere hinsichtlich einer kompensatorischen Veränderungen der Expression anderer „cornified envelope“ Proteine als den bis jetzt analysierten untersucht werden. So bilden beispielsweise Loricrin defizienten Mäusen postnatal kompensatorisch gesteigert small prolin region rich Proteine (SPRR) und Repetin aus (Koch et al., 2000).

Da die veränderte Lokalisation und Prozessierung von Filaggrin auf einen gestörten Kalzium-Gradienten innerhalb der Epidermis hindeutet, sollte die Kalziumkonzentration in den verschiedenen Schichten der Epidermis ermittelt werden. Eine Methode besteht in der elektronenmikroskopischen Auswertung von Ultradünnschnitten, welche mit Kalium-

Pyroantimonat postfixiert werden. Hierdurch bildet sich abhängig von der Kalziumkonzentration ein elektronendichtes Präzipitat (Elias et al., 2002, vgl. Einleitung Abb. 1.7).

Auch die Analyse der vollständigen Prozessierung von Profilaggrin hinsichtlich der Erzeugung des N-terminalen Proteins aus der Familie der Kalzium-bindenden S100-Proteine sollte weitergeführt werden. Da dieses Prozessierungsprodukt einen entscheidenden Einfluss auf die Genregulation der terminalen Differenzierung zu haben scheint, könnten Unterschiede in der Freisetzung dieses Proteins mit zu der Erzeugung des beobachteten epidermalen Phänotyps führen.

Die unterschiedlichen angesprochenen Analysen sollten vergleichend für die verschiedenen epidermalen Bereiche der Tiere durchgeführt werden. So sollte feststellbar sein, welche Unterschiede zwischen den makroskopisch und hinsichtlich Farbstoff-Penetration veränderten Arealen und der restlichen Epidermis bestehen. Zudem sollten diese Vergleiche auch zeitlich erfolgen, so dass ein Vergleich zwischen homozygoter Cx43K258stop und Wildtyp Epidermis ab dem Zeitpunkt der Ausbildung der epidermalen Barriere an Tag 16 vor der Geburt und dem letalen Zeitpunkt zwischen Tag 3 und 5 nach der Geburt ermöglicht werden kann.

6.II.2 Ausblick für die weitere Aufklärung des epidermalen Phänotyps an primären Keratinozyten

Anders als für beispielsweise menschliche Keratinozyten (Asselineau et al., 1986; Boukamp et al., 1988), können für die Maus noch keine über einen längeren Zeitraum stabilen organotypischen Epidermiskulturen erzeugt werden. Alternativ können embryonale Stammzellen der Maus in Gegenwart von Bone Morphogenetic Protein-4 zu dreidimensionalen, stratifizierenden Epidermisklonen differenzieren, welche die verschiedenen Lagen einer differenzierten Epidermis ausbilden (Coraux et al., 2003). Jedoch sind diese Kulturen sehr inhomogen und erschweren somit Reproduzierbarkeit und vergleichende Analysen.

Einige Eigenschaften der Cx43K258stop Epidermis könnten jedoch auch an primären Keratinozyten untersucht werden. So könnte mittels Farbstoffinjektionen untersucht werden, ob Wildtyp und homozygote Cx43K258stop Keratinozyten einen grundlegenden Unterschied der interzellulären Kopplung zeigen (Brissette et al., 1994; Choudhry et al., 1997). Zudem könnte der Einfluß von erhöhten Kalziumkonzentration vergleichend analysiert werden. Durch Pulse Chase Analyse könnte die Halbwertszeit des Cx43K258stop Proteins in primären Keratinozyten überprüft bzw. exakt bestimmt werden. Wie für Cx43K258stop HeLa-Zellen vorgeschlagen (6.1), könnte der Einfluss verschiedener Stimuli in diesem System spezifisch für Keratinozyten ermittelt werden.

6.II.3 Analyse der epidermalen Wundheilung

Im Zuge der epidermalen Wundheilung verändert sich das Expressionsmuster migrierender Keratinozyten (Hodgings, 2004; Brandner et al., 2004). Cx43 wird dabei zunächst deutlich reduziert exprimiert. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass eine weitere Reduktion der exprimierten Cx43 Proteinmenge zu einer schnelleren Wundheilung führt (Kretz et al., 2003; Coutinho et al., 2003). Es ist zu vermuten, dass die Expression einer nicht regulierbaren Cx43 Isoform ebenfalls einen Einfluss auf diesen Prozess hat. Zur Zeit werden daher durch Markus Kretz in unserer Arbeitsgruppe Wundheilungsexperimente an Cx43K258stop/Cx43del Mäusen durchgeführt, um sowohl das exprimierte Connexinprofil als auch die Histologie der Wundheilung im Vergleich zu Wildtyp Tieren und Mäusen mit konditioneller Ablation des *cx43* Gens zu analysieren.

6.III Ausblick für die weitere Aufklärung der veränderten Funktion homozygoter Cx43K258stop Herzen

6.III.1 Ausblick für die Untersuchung von primären Cx43K258stop Kardiomyozyten Kulturen

Durch die Erzeugung von Kardiomyozyten Kulturen (Thomas et al., 2000) können die Einzelzell-Aktionspotentiale zwischen Wildtyp und homozygoten Cx43K258stop Herzen verglichen werden. Durch Veränderungen, insbesondere in der Phase der Repolarisation, sollte der genaue Mechanismus der im Oberflächen EKG beobachteten Abweichungen besser erklärbar werden.

Eine mögliche Veränderung der Lokalisation oder Expressionsstärke von Ionenkanälen zwischen Wildtyp und homozygoten Cx43K258stop Kardiomyozyten kann untersucht werden. Dies kann wiederum einen direkten Einfluss auf Form und Länge des Aktionspotentials haben und somit die Repolarisation beeinflussen (Priori et al., 1991).

Neben den beobachteten elektrophysiologischen Veränderungen trat auch eine veränderte Herzform auf. Dies lässt auf einen Einfluss der Cx43K258stop Proteins auf die Architektur der Kardiomyozyte schließen (Roberts und Brugada, 2000). Analysen der Lokalisation und Expressionsstärke von Strukturproteinen des Sarkomers sowie der Glanzstreifen werden sich daher anschließen. Neben der Modellierung der Entstehung dieser Strukturen kann in primären Kardiomyozyten auch der Einfluss von physiologischen Veränderungen untersucht werden.

So können beispielsweise die Auswirkungen ischämischer Bedingungen zwischen Wildtyp und homozygoten Cx43K258stop Kardiomyozyten verglichen werden. Natürlich lassen sich an diesem System auch biochemische Unterschiede leichter ermitteln als am intakten Herzen, so etwa Veränderungen der Proteindegradation (Saffitz et al, 2000).

6.III.2 Ausblick für die Untersuchung von Cx43K258stop/Cx43del Herzen

Auf Grund der hohen Letalität homozygoter Cx43K258stop Tiere sowie den beobachteten ähnlichen makroskopischen Herzanomalien adulter Cx43K258stop/Cx43del Tiere werden *in vivo* Studien zum Einfluss der Cx43K258stop Mutation auf die Funktion des Herzens zukünftig an Cx43K258stop/Cx43del Tieren durchgeführt werden. Hierzu werden sowohl genaue histologische Analysen als auch elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt werden. So kann mittels spannungssensitiver Farbstoffe die Ausbreitung der Erregung am intakten Herzen optisch dargestellt werden (Morley et al., 1999).

Durch die Prädisposition homozygoter Cx43K258stop Herzen für große Infarkte kann mit dieser Methode neben der generellen Reizausbreitung auch die Anfälligkeit für Arrhythmien in Cx43K258stop/Cx43del Herzen analysiert werden. Durch serielle Echokardiographie-Analysen wird zudem festgestellt werden, ob die beobachteten „Kugelherzen“ in adulten Tieren aus primär kugeligen neonatalen Herzen hervorgehen oder ob der Großteil der Cx43K258stop/Cx43del Tiere zunächst eine kompensatorische Hypertrophie des Herzens ausbilden, welche schließlich zu der in vielen adulten Tieren beobachteten starken Dilatation und eingeschränkten Funktion des Herzens führt (vgl. Hall et al., 2000).

Neben vergleichenden Immunfluoreszenz-Analysen, werden auch elektronenmikroskopische Analysen für neonatale und adulte Herzen durchgeführt werden. Hierdurch soll die Ultrastruktur der Kardiomyozyten genauer analysiert werden. Besonders interessant sollte dabei auch die Analyse heterozygoter Cx43K258stop Herzen auf Grund der beobachteten verstärkten Expression von ZO-1 Protein sein.

6.IV Ausblick für die weitere Aufklärung homozygoter Cx43K258stop Ovarien

Durch die hohe Letalität homozygoter Cx43K258stop Tiere sollte zunächst überprüft werden, ob Cx43K258stop/Cx43del Weibchen einen vergleichbaren Defekt der Follikelreifung zeigen. Ist dies der Fall, so können weitere Analysen an diesen Tieren durchgeführt werden.

Dazu sollte zunächst die Cx43K258stop Expression bezüglich Lokalisation und Stärke im Zuge des Östrus mit der Cx43 Protein Expression in Wildtyp Tieren verglichen werden. Dies kann durch Kombination von Immunfluoreszenz- und Immunoblot-Analytik Östrus-kontrollierter Tiere erfolgen. Zeigt sich in homozygoten Cx43K258stop Ovarien im Gegensatz zu Wildtyp Tieren keine Reduktion der Expression der Cx43 Isoform würde dies den vermuteten Mechanismus der gestörten Follikelreifung untermauern. Demzufolge bleibt trotz Stimulation mit luteinisierendem Hormon die heterotypische Kopplung zwischen Oozyte und Granulosazellen bestehen und verhindert so eine erfolgreiche Ovulation.

Zeigen Cx43K258stop/Cx43del Ovarien jedoch eine ungestörte Follikelreifung können alternativ die Ovarien neugeborener homozygoter Cx43K258stop Weibchen in die Nierenkapsel adulter Wildtyp Weibchen verpflanzt und zur Reifung gebracht werden (Ackert et al., 2001). Ovariale Explantate und die Wirkung von hormoneller Stimulierung auf die Follikelreifung können auch *in vitro* analysiert werden (Bolamba et al., 2002; Granot und Dekel, 1998). Zudem können Immunogold-Analysen in elektronenmikroskopischen Analysen von homozygoten Cx43K258stop Ovarien dazu beitragen aufzuklären, ob die Kopplung zwischen Oozyte und Granulosazellen tatsächlich über heterotypische Cx37/Cx43 Gap Junction Plaques erfolgt.

6.IV Ausblick für die Analyse anderer Cx43 exprimierender Gewebe

6.IV.1 Analyse der Blutgefäße hinsichtlich Atherosklerose

Cx43 Protein wird in endothelialen Zellen (Haefliger et al., 2004; Theis et al., 2004) sowie in der glatten Muskulatur der Gefäße (Haefliger et al., 2004) exprimiert. Eine erhöhte Expression von Cx43 wird im Zuge von Bluthochdruck beobachtet (Haefliger et al., 1997). Auch bei Atherosklerose erfolgt eine veränderten Connexinexpression (Kwak et al., 2002). Kürzlich konnte ein Einfluß der *cx43* Gendosis auf die Entwicklung von atherosklerotischen Plaques gezeigt werden (Wong et al., 2003). Dabei waren Tiere besser gegen Atherosklerose geschützt, welche nur ein *cx43* Allel in sich trugen und auf einen LDL Rezeptor negativen genomischen Hintergrund gekreuzt worden waren. Die fehlende Regulierbarkeit des Cx43K258stop Proteins könnte eventuell einen verstärkenden Einfluss auf die Bildung von atherosklerotischen Plaques haben.

6.IV.2 Analysen der Astrozytenfunktion

Den in Astrozyten exprimierten Cx43 Gap Junction Kanälen wird eine Funktion bei der Kalium-Homöostase sowie der Begrenzung von ischemischen Zuständen zugesprochen. Astrozyten-spezifische Ausschaltung des *cx43* Gens führte zu einer beschleunigten Ausbreitung der neuronalen Inaktivierung (Theis et al., 2003).

Dies beruht vermutlich auf einem Ausfall der Kaliumabführung durch stark verminderte astrozytäre Kopplung, einer resultierenden erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration und somit einer Beschleunigung der neuronalen Inaktivierung. Die Anwesenheit von nicht-regulierbarem Cx43K258stop könnte im Gegensatz dazu eine erhöhte Kalium-Aufnahme und somit eine verzögerte Inaktivierung nach sich ziehen.

Schädigung des Zentralen Nervensystems durch örtlich begrenzte Ischämie führen zu einer Umverteilung von Cx43 Protein und verminderter Kopplung im geschädigten Gewebe (Li et al., 1998). Der postulierten Schutzfunktion einer reduzierten Kopplung im Zuge der eintretenden ischämischen Azidose (Dirnagl et al., 1999), welche experimentell durch die

mildernde Wirkung von Inhibitoren der Gap Junction-vermittelten Kommunikation auf eine Ausbreitung einer fokalen Ischämie demonstriert wurde (Rawanduzy et al., 1997), widersprechen neue Erkenntnisse durch Mäuse mit astrozytenspezifischer Deletion von Cx43 Proteine zumindest teilweise. In diesen Tieren kam es bei Ischämie ebenfalls zur Bildung nekrotischer Plaques (Nakase et al., 2004). Eine Erklärung kann in der Expression anderer Connexine in Astrozyten liegen. Ausgehend von den Beobachtungen an adulten homozygoten Herzen spricht vieles dafür, dass sich auch im Gehirn eine Ischämie durch den Verlust der pH-Regulation des Cx43K258stop Proteins über eine weitere Region ausbreiten wird als in Wildtyp Tieren. Zur Analyse der Auswirkung der Cx43K258stop Mutation werden daher zur Zeit an Cx43K258stop/Cx43del Mäusen durch Christian Naus (Vancouver, Kanada) Versuche durch Induktion lokaler Ischämien durchgeführt.

7. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der carboxyterminal verkürzten Cx43 Protein Isoform Cx43K258stop sowohl in HeLa-Zellen als auch in der transgenen Mauslinie Cx43K258stop erreicht.

Mit Hilfe der HeLa Transfektanten wurde festgestellt, dass Cx43K258stop Protein eine verlängerte Halbwertszeit besitzt und größere Gap Junction Plaques ausbildet. Zudem wiesen aus Cx43K258stop Protein aufgebaute Connexone qualitativ dieselben homo- und heterotypischen Kopplungseigenschaften auf wie aus Cx43 Protein aufgebaute Halbkanäle.

Mittels des hergestellten Zielgenvektors *Cx43K258stop* konnte der Austausch der *cx43* kodierenden Region gegen die gewählte Mutation durch die Methode des genetischen Doppellersatzes erfolgreich in HM1 embryonalen Stammzellen der Maus erreicht werden. Nach Blastozysteninjektion homolog rekombinierter ES-Zellklone wurde mit Hilfe von chimären Mäusen, welche die Cx43K258stop Mutation über ihre Keimbahn an ihre Nachkommen vererbten, die transgene Mauslinie Cx43K258stop etabliert.

Mehr als 97% dieser homozygot mutierter Mäuse starben auf Grund eines Defektes der epidermalen Permeabilitätsbarriere innerhalb der ersten 5 Tage nach der Geburt. Molekular wurde dieser Defekt der terminalen Kerationzyten-Differentiation von einer stark veränderten Expression des verkürzten Cx43 Proteins sowie einer veränderten Prozessierung und Lokalisation des Filaggrin Proteins begleitet. Die wenigen überlebenden Cx43K258stop Tiere zeigten eine Kompensation des epidermalen Phänotyps begleitet von einer gegenüber Wildtyp Tieren unveränderten Filaggrin Expression. Da Tiere mit einem *cx43K258stop* und einem vollständig deletierten *cx43* Allel den epidermalen Phänotyp nicht zeigten, konnte der Barriere Defekt direkt mit der exprimierten Cx43K258stop Proteinmenge korreliert werden.

Im Gegensatz zu Mäusen mit genereller Cx43 Defizienz, zeigten neonatale Cx43K258stop Mäuse keine Blockade des rechten ventrikulären Ausflusstraktes des Herzens. Dennoch prägten neonatale und einige der überlebenden homozygot mutierten Tiere eine signifikante Herzanomalie in Form eines stark kugeligen Herzens aus. Echokardiographie adulter Tiere wies auf eine eingeschränkte Funktionalität des linken Ventrikels hin. Elektrokardiographien neonataler Tiere deckten Repolarisationsstörungen des Ventrikels in 20% aller homozygot mutierten Tiere auf. Molekular zeigte sich eine erhöhte epikardiale Expression des Cx43K258stop Proteins. Die beobachteten morphologischen Veränderungen beruhen vermutlich auf einem Einfluss der Cx43K258stop Mutation sowohl auf die Elektrophysiologie als auch auf die Architektur des Zytoskeletts der Kardiomyozyten.

Überlebende homozygot mutierte Weibchen waren auf Grund einer gestörten Folikelmreifung und Ovulation unfruchtbar.

Die Ergebnisse untermauern die essentielle Bedeutung der regulativen carboxyterminalen Domäne für aus Cx43 Protein aufgebaute Gap Junction Kanäle *in vivo*.

8. Literaturverzeichnis

- Abbondanzo, S.J., Gadi, I., und Stewart, C.L. (1993). Derivation of embryonic stem cell lines. *Methods Enzymol.* **225**, 803-823.
- Ackert, C.L., Gittens, J.E., O'Brien, M.J., Eppig, J.J., Kidder, G.M. (2001). Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* **233**, 258-270.
- Ai, Z., Fischer, A., Spray, D.C., Brown, A.M., Fishman, G.I. (2000). Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* **105**, 161-171.
- Akar, F.G., Yan, G.X., Antzelevitch, C., Rosenbaum, D.S. (2002). Unique topographical distribution of M cells underlies reentrant mechanism of torsade de pointes in the long-QT syndrome. *Circulation* **105**, 1247-1253.
- Alves, L.A., Campos de Carvalho, A.C., Cirne Lima, E.O., Rocha e Souza CM, Dardenne, M., Spray, D.C., Savino, W. (1995). Functional gap junctions in thymic epithelial cells are formed by connexin 43. *Eur. J. Immunol.* **25**, 431-437.
- Angst, B.D., Khan, L.U., Severs, N.J., Whitely, K., Rothery, S., Thompson, R.P., Magee, A.I., Gourdie, R.G. (1997). Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium. *Circ. Res.* **80**, 88-94.
- Antzelevitch, C., Yan, G.X., Shimizu, W. (1999). Transmural dispersion of repolarization and arrhythmogenicity: the Brugada syndrome versus the long QT syndrome. *J. Electrocardiol.* **32** *Suppl:158-65.*, 158-165.
- Antzelevitch, C., Fish, J. (2001). Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res. Cardiol.* **96**, 517-527.
- Askew, G.R., Doetschman, T., Lingrel, J.B. (1993). Site-directed point mutations in embryonic stem cells: a gene-targeting tag-and-exchange strategy. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4115-4124.
- Asselineau, D., Bernard, B.A., Bailly, C., Darmon, M., Prunieras, M. (1986). Human epidermis reconstructed by culture: is it "normal"? *J. Invest Dermatol.* **86**, 181-186.
- Attar, P.S., Wertz, P.W., McArthur, M., Imakado, S., Bickenbach, J.R., Roop, D.R. (1997). Inhibition of retinoid signaling in transgenic mice alters lipid processing and disrupts epidermal barrier function. *Mol. Endocrinol.* **11**, 792-800.
- Bakirtzis, G., Jamieson, S., Aasen, T., Bryson, S., Forrow, S., Tetley, L., Finbow, M., Greenhalgh, D., Hodgins, M. (2003). The effects of a mutant connexin 26 on epidermal differentiation. *Cell Commun. Adhes.* **10**, 359-364.
- Balda, M.S., Garrett, M.D., Matter, K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J. Cell Biol.* **160**, 423-432.
- Barker, R.J., Price, R.L., Gourdie, R.G. (2002). Increased association of ZO-1 with connexin43 during remodeling of cardiac gap junctions. *Circ. Res.* **90**, 317-324.
- Baroudi, G., Pouliot, V., Denjoy, I., Guicheney, P., Shrier, A., Chahine, M. (2001). Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an SCN5A mutant (R1432G). *Circ. Res.* **88**, E78-E83.
- Beardslee, M.A., Laing, J.G., Beyer, E.C., Saffitz, J.E. (1998). Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ. Res.* **83**, 629-635.

- Beardslee, M.A., Lerner, D.L., Tadros, P.N., Laing, J.G., Beyer, E.C., Yamada, K.A., Kleber, A.G., Schuessler, R.B., Saffitz, J.E. (2000). Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ.Res.* 87, 656-662.
- Bedner, P., Niessen, H., Odermatt, B., Willecke, K., Harz, H. (2003). A method to determine the relative cAMP permeability of connexin channels. *Exp.Cell Res.* 291, 25-35.
- Behne, M.J., Meyer, J.W., Hanson, K.M., Barry, N.P., Murata, S., Crumrine, D., Clegg, R.W., Gratton, E., Holleran, W.M., Elias, P.M., Mauro, T.M. (2002). NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis. Microenvironment acidification assessed with fluorescence lifetime imaging. *J.Biol.Chem.* 277, 47399-47406.
- Bennett, M.V. (1997). Gap junctions as electrical synapses. *J.Neurocytol.* 26, 349-366.
- Bevans, C.G., Kordel, M., Rhee, S.K., 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., Goodenough, D.A. (1987). Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J.Cell Biol.* 105, 2621-2629.
- Bezprozvanny, I., Maximov, A. (2001). PDZ domains: More than just a glue. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 787-789.
- Bolamba, D., Russ, K.D., Olson, M.A., Sandler, J.L., Durrant, B.S. (2002). In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology* 58, 1689-1703.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J.Cell Biol.* 106, 761-771.
- Boyett, M.R., Harrison, S.M., Janvier, N.C., McMorn, S.O., Owen, J.M., Shui, Z. (1996). A list of vertebrate cardiac ionic currents nomenclature, properties, function and cloned equivalents. *Cardiovasc.Res.* 32, 455-481.
- Boyett, M.R., Honjo, H., Kodama, I. (2000). The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc.Res.* 47, 658-687.
- Brandner, J.M., Houdek, P., Husing, B., Kaiser, C., Moll, I. (2004). Connexins 26, 30, and 43: differences among spontaneous, chronic, and accelerated human wound healing. *J.Invest Dermatol.* 122, 1310-1320.
- Brigstock, D.R. (1999). The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr.Rev.* 20, 189-206.
- Brisette, J.L., Kumar, N.M., Gilula, N.B., Hall, J.E., Dotto, G.P. (1994). Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 6453-6457.
- Britz-Cunningham, S.H., Shah, M.M., Zuppan, C.W., 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.
- Brugada, P., Brugada, J. (1992). Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J.Am.Coll.Cardiol.* 20, 1391-1396.
- Brugada, J., Brugada, R., Brugada, P. (1998). Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V1 through V3: a marker for sudden death in patients without demonstrable structural heart

- disease. *Circulation* 97, 457-460. Bruzzone, R., White, T.W., Goodenough, D.A. (1996). The cellular Internet: on-line with connexins. *Bioessays* 18, 709-718.
- Bruzzone, R., White, T.W., Paul, D.L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur.J.Biochem.* 238, 1-27.
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S.G., Barbe, M.T., Herb, A., Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 13644-13649.
- Bullock, W., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA E.coli strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques*. 5, 376-380.
- Butkevich, E., Hulsmann, S., Wenzel, D., Shirao, T., Duden, R., Majoul, I. (2004). Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr.Biol.* 14, 650-658.
- Capecchi, M.R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 244, 1288-1292.
- Calero, G., Kanemitsu, M., Taffet, S.M., Lau, A.F., Delmar, M. (1998). A 17mer peptide interferes with acidification-induced uncoupling of connexin43. *Circ.Res.* 82, 929-935.
- Cartlidge, P. (2000). The epidermal barrier. *Semin.Neonatol.* 5, 273-280.
- Castro, C.H., Stains, J.P., Sheikh, S., Szejnfeld, V.L., Willecke, K., Theis, M., Civitelli, R. (2003). Development of mice with osteoblast-specific connexin43 gene deletion. *Cell Commun.Adhes.* 10, 445-450.
- Chen, Q., Kirsch, G.E., Zhang, D., Brugada, R., Brugada, J., Brugada, P., Potenza, D., Moya, A., Borggrefe, M., Breithardt, G., Ortiz-Lopez, R., Wang, Z., Antzelevitch, C., O'Brien, R.E., Schulze-Bahr, E., Keating, M.T., Towbin, J.A., Wang, Q. (1998). Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 392, 293-296.
- Chen, X., Kojima, S., Borisy, G.G., Green, K.J. (2003). p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J.Cell Biol.* 163, 547-557.
- Cheng, A., Schweissinger, D., Dawood, F., Kumar, N., Yeager, M. (2003). Projection structure of full length connexin 43 by electron cryo-crystallography. *Cell Commun.Adhes.* 10, 187-191.
- Chidgey, M., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Cruchley, A., Hail, C., Kirk, S., Merritt, A., North, A., Tselepis, C., Hewitt, J., Byrne, C., Fassler, R., Garrod, D. (2001). Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation. *J.Cell Biol.* 155, 821-832.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162, 156-159.
- Choudhry, R., Pitts, J.D., 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.
- Coppen, S.R., Kodama, I., Boyett, M.R., Dobrzynski, H., Takagishi, Y., Honjo, H., Yeh, H.I., Severs, N.J. (1999). Connexin45, a major connexin of the rabbit sinoatrial node, is co-expressed with connexin43 in a restricted zone at the nodal-crista terminalis border. *J.Histochem.Cytochem.* 47, 907-918.
- Coraux, C., Hilmi, C., Rouleau, M., Spadafora, A., Hinnrasky, J., Ortonne, J.P., Dani, C., Aberdam, D. (2003). Reconstituted skin from murine embryonic stem cells. *Curr.Biol.* 13, 849-853.
- Coutinho, P., Qiu, C., Frank, S., Tamber, K., Becker, D. (2003). Dynamic changes in connexin expression correlate with key events in the wound healing process. *Cell Biol.Int.* 27, 525-541.

- Dahl,E., Winterhager,E., Traub,O., Willecke,K. (1995). Expression of gap junction genes, connexin40 and connexin43, during fetal mouse development. *Anat.Embryol.(Berl)* 191, 267-278.
- Dahl,E., Manthey,D., Chen,Y., Schwarz,H.J., Chang,Y.S., Lalley,P.A., Nicholson,B.J., Willecke,K. (1996a). Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30,a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *J.Biol.Chem.* 271, 17903-17910.
- Dahl,E., Winterhager,E., Reuss,B., Traub,O., Butterweck,A., Willecke,K. (1996b). 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.
- Dale,B.A., Lonsdale-Eccles,J.D., Holbrook,K.A. (1980). Stratum corneum basic protein: an interfilamentous matrix protein of epidermal keratin. *Curr.Probl.Dermatol.* 10:311-25., 311-325.
- Dang,X., Doble,B.W., Kardami,E. (2003). The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol.Cell Biochem.* 242, 35-38.
- Darrow,B.J., Laing,J.G., Lampe,P.D., Saffitz,J.E., Beyer,E.C. (1995). Expression of multiple connexins in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ.Res.* 76, 381-387.
- Dasgupta,C., Martinez,A.M., Zuppan,C.W., Shah,M.M., Bailey,L.L., Fletcher,W.H. (2001). Identification of connexin43 (alpha1) gap junction gene mutations in patients with hypoplastic left heart syndrome by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Mutat.Res.* 479, 173-186.
- Davis,M.A., Ireton,R.C., Reynolds,A.B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J.Cell Biol.* 163, 525-534.
- de Sousa,P.A., Valdimarsson,G., Nicholson,B.J., Kidder,G.M. (1993). Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos. *Development* 117, 1355-1367.
- De Zeeuw,C.I., Chorev,E., Devor,A., Manor,Y., Van Der Giessen,R.S., De Jeu,M.T., Hoogenraad,C.C., Bijman,J., Ruigrok,T.J., French,P., Jaarsma,D., Kistler,W.M., Meier,C., Petrasch-Parwez,E., Dermietzel,R., Sohl,G., Gueldenagel,M., Willecke,K., Yarom,Y. (2003). Deformation of network connectivity in the inferior olive of connexin 36-deficient mice is compensated by morphological and electrophysiological changes at the single neuron level. *J.Neurosci.* 23, 4700-4711.
- Delmar,M., Coombs,W., Sorgen,P., Duffy,H.S., Taffet,S.M. (2004). Structural bases for the chemical regulation of Connexin43 channels. *Cardiovasc.Res.* 62, 268-275.
- Delorme,B., Dahl,E., Jarry-Guichard,T., Briand,J.P., Willecke,K., Gros,D., Theveniau-Ruissy,M. (1997). Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system. *Circ.Res.* 81, 423-437.
- Denda,M., Fuziwara,S., Inoue,K. (2003). Influx of calcium and chloride ions into epidermal keratinocytes regulates exocytosis of epidermal lamellar bodies and skin permeability barrier homeostasis. *J.Invest Dermatol.* 121, 362-367.
- Denda,M., Fuziwara,S., Inoue,K. (2004). Association of cyclic adenosine monophosphate with permeability barrier homeostasis of murine skin. *J.Invest Dermatol.* 122, 140-146.
- Deng,C., Thomas,K.R., Capecchi,M.R. (1993). Location of crossovers during gene targeting with insertion and replacement vectors. *Mol.Cell Biol.* 13, 2134-2140.
- Dirnagl,U., Iadecola,C., Moskowitz,M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391-397.
- Doble,B.W., Ping,P., Kardami,E. (2000). The epsilon subtype of protein kinase C is required for cardiomyocyte connexin-43 phosphorylation. *Circ.Res.* 86, 293-301.

- Dubina, M.V., Iatckii, N.A., Popov, D.E., Vasil'ev, S.V., Krutovskikh, V.A. (2002). Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer. *Oncogene* 21, 4992-4996.
- DuBrul, E.F. (1972). Fine structure of epidermal differentiation in the mouse. *J. Exp. Zool.* 181, 145-158.
- Duhl, D.M., Vrieling, H., Miller, K.A., Wolff, G.L., Barsh, G.S. (1994). Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice. *Nat. Genet.* 8, 59-65.
- Duffy, H.S., Delmar, M., Coombs, W., Taffet, S.M., Hertzberg, E.L., Spray, D.C. (2001). Functional demonstration of connexin-protein binding using surface plasmon resonance. *Cell Commun. Adhes.* 8, 225-229.
- Duffy, H.S., Sorgen, P.L., Girvin, M.E., O'Donnell, P., Coombs, W., Taffet, S.M., Delmar, M., Spray, D.C. (2002). pH-dependent intramolecular binding and structure involving Cx43 cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* 277, 36706-36714.
- Duffy, H.S., Ashton, A.W., O'Donnell, P., Coombs, W., Taffet, S.M., Delmar, M., Spray, D.C. (2004). Regulation of connexin43 protein complexes by intracellular acidification. *Circ. Res.* 94, 215-222.
- Duncan, J.C., Fletcher, W.H. (2002). α 1 Connexin (connexin43) gap junctions and activities of cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C in developing mouse heart. *Dev. Dyn.* 223, 96-107.
- Dupont, E., Matsushita, T., Kaba, R.A., Vozzi, C., Coppens, S.R., Khan, N., Kaprielian, R., Yacoub, M.H., Severs, N.J. (2001). Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* 33, 359-371.
- Ebihara, L. (2003). New roles for connexons. *News Physiol Sci.* 18:100-3, 100-103.
- Eckardt, D. Erzeugung und Charakterisierung von konditionalen Mausmutanten zur funktionellen Untersuchung von Connexin43 Gap Junction Kanälen im Herzen. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2004).
- Eckardt, D., Theis, M., Degen, J., Ott, T., van Rijen, H.V., Kirchhoff, S., Kim, J.S., de Bakker, J.M., Willecke, K. (2004). Functional role of connexin43 gap junction channels in adult mouse heart assessed by inducible gene deletion. *J. Mol. Cell Cardiol.* 36, 101-110.
- Eckert, R.L., Yaffe, M.B., Crish, J.F., Murthy, S., Rorke, E.A., Welter, J.F. (1993). Involucrin--structure and role in envelope assembly. *J. Invest Dermatol.* 100, 613-617.
- Eckert, R.L., Broome, A.M., Ruse, M., Robinson, N., Ryan, D., Lee, K. (2004). S100 proteins in the epidermis. *J. Invest Dermatol.* 123, 23-33.
- Einthoven W, Fahr G, de Waart, A. (1913) Über die Richtung und manifeste Größe der Potentialschwankungen im menschlichen Herzen und über den Einfluß der Herzlage auf die Form des Elektrokardiogramms. *Pfl Arch Physiol.*;150:275.
- Ek-Vitorin, J.F., Calero, G., Morley, G.E., Coombs, W., Taffet, S.M., Delmar, M. (1996). PH regulation of connexin43: molecular analysis of the gating particle. *Biophys. J.* 71, 1273-1284.
- Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., Hulser, D.F., Willecke, K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* 129, 805-817.
- Elias, P.M., Nau, P., Hanley, K., Cullander, C., Crumrine, D., Bench, G., Sideras-Haddad, E., Mauro, T., Williams, M.L., Feingold, K.R. (1998). Formation of the epidermal calcium gradient coincides with key milestones of barrier ontogenesis in the rodent. *J. Invest Dermatol.* 110, 399-404.
- Elias, P.M., Matsuyoshi, N., Wu, H., Lin, C., Wang, Z.H., Brown, B.E., Stanley, J.R. (2001). Desmoglein isoform distribution affects stratum corneum structure and function. *J. Cell Biol.* 153, 243-249.

- Elias,P., Ahn,S., Brown,B., Crumrine,D., Feingold,K.R. (2002). Origin of the epidermal calcium gradient: regulation by barrier status and role of active vs passive mechanisms. *J.Invest Dermatol.* 119, 1269-1274.
- Elias,P.M., Crumrine,D., Rassner,U., Hachem,J.P., Menon,G.K., Man,W., Choy,M.H., Leypoldt,L., Feingold,K.R., Williams,M.L. (2004). Basis for abnormal desquamation and permeability barrier dysfunction in RXLI. *J.Invest Dermatol.* 122, 314-319.
- Elias PM. The epidermal permeability barrier: from the early days at Harvard to emerging concepts. *J.Invest Dermatol.* 2004; 122:xxxvi-xxxix
- Emdad,L., Uzzaman,M., Takagishi,Y., Honjo,H., Uchida,T., Severs,N.J., Kodama,I., Murata,Y. (2001). Gap junction remodeling in hypertrophied left ventricles of aortic-banded rats: prevention by angiotensin II type 1 receptor blockade. *J.Mol.Cell Cardiol.* 33, 219-231.
- Evans,M.J., Kaufman,M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Evans,W.H., Martin,P.E. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Mol.Membr.Biol.* 19, 121-136.
- Ewart,J.L., Cohen,M.F., Meyer,R.A., Huang,G.Y., Wessels,A., Gourdie,R.G., Chin,A.J., Park,S.M., Lazatin,B.O., Villabon,S., Lo,C.W. (1997). Heart and neural tube defects in transgenic mice overexpressing the Cx43 gap junction gene. *Development* 124, 1281-1292.
- Falk,M.M., Gilula,N.B. (1998). Connexin membrane protein biosynthesis is influenced by polypeptide positioning within the translocon and signal peptidase access. *J.Biol.Chem.* 273, 7856-7864.
- Falk,M.M. (2000). Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. *J.Cell Sci.* 113, 4109-4120.
- Fedorov,L.M., Haegel-Kronenberger,H., Hirchenhain,J. (1997). A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants. *Transgenic Res.* 6, 223-231.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.(1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". *Addendum. Anal.Biochem.* 137, 266-267.
- Fisher,C., Holbrook,K.A. (1987). Cell surface and cytoskeletal changes associated with epidermal stratification and differentiation in organ cultures of embryonic human skin. *Dev.Biol.* 119, 231-241.
- Fluhr,J.W., Kao,J., Jain,M., Ahn,S.K., Feingold,K.R., Elias,P.M. (2001). Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *J.Invest Dermatol.* 117, 44-51.
- Francis,D., Stergiopoulos,K., Ek-Vitorin,J.F., Cao,F.L., Taffet,S.M., Delmar,M. (1999). Connexin diversity and gap junction regulation by pHi. *Dev.Genet.* 24, 123-136.
- Fraser,S.E., Green,C.R., Bode,H.R., Gilula,N.B. (1987). Selective disruption of gap junctional communication interferes with a patterning process in hydra. *Science* 237, 49-55.
- Fuchs,E. (1990). Epidermal differentiation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2, 1028-1035.
- Fujimoto,K., Nagafuchi,A., Tsukita,S., Kuraoka,A., Ohokuma,A., Shibata,Y. (1997). Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *J.Cell Sci.* 110, 311-322.
- Furuse,M., Hata,M., Furuse,K., Yoshida,Y., Haratake,A., Sugitani,Y., Noda,T., Kubo,A., Tsukita,S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J.Cell Biol.* 156, 1099-1111.

- Gabriel,H.D., Jung,D., Bützler,C., Temme,A., Traub,O., Winterhager,E., Willecke,K. (1998). Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J.Cell Biol.* 140, 1453-1461.
- Gaietta,G., Deerinck,T.J., Adams,S.R., Bouwer,J., Tour,O., Laird,D.W., Sosinsky,G.E., Tsien,R.Y., Ellisman,M.H. (2002). Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296, 503-507.
- Gao,Y., Spray,D.C. (1998). Structural changes in lenses of mice lacking the gap junction protein connexin43. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 39, 1198-1209.
- Gellhaus,A., Dong,X., Propson,S., Maass,K., Klein-Hitpass,L., Kibschull,M., Traub,O., Willecke,K., Perbal,B., Lye,S.J., Winterhager,E. (2004). Connexin43 interacts with NOV: A possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. *J.Biol.Chem.* ..
- Gergs,U. Untersuchungen zur Isolierung und Identifizierung von Proteinkinasen, die das Gap Junction Protein Connexin43 phosphorylieren. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (1997).
- Giepmans,B.N., Moolenaar,W.H. (1998). The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr.Biol.* 8, 931-934.
- Giepmans,B.N., Verlaan,I., Hengeveld,T., Janssen,H., Calafat,J., Falk,M.M., Moolenaar,W.H. (2001a). Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr.Biol.* 11, 1364-1368.
- Giepmans,B.N., Hengeveld,T., Postma,F.R., Moolenaar,W.H. (2001b). Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *J.Biol.Chem.* 276, 8544-8549.
- Giepmans,B.N., Feiken,E., Gebbink,M.F., Moolenaar,W.H. (2003). Association of connexin43 with a receptor protein tyrosine phosphatase. *Cell Commun.Adhes.* 10, 201-205.
- Gimlich,R.L., Kumar,N.M., Gilula,N.B. (1990). Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos. *J.Cell Biol.* 110, 597-605.
- Gittens,J.E., Mhawi,A.A., Lidington,D., Ouellette,Y., Kidder,G.M. (2003). Functional analysis of gap junctions in ovarian granulosa cells: distinct role for connexin43 in early stages of folliculogenesis. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 284, C880-C887.
- Goldberg,G.S., J.F.Bechberger, and C.C.Naus. 1995. A pre-loading method of evaluating gap junctional communication by fluorescent dye transfer. *Biotechniques.* 18,490-497.
- Goodenough,D.A., Paul,D.L. (2003). Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4, 285-294.
- Granot,I., Dekel,N. (1998). Cell-to-cell communication in the ovarian follicle: developmental and hormonal regulation of the expression of connexin43. *Hum.Reprod.* 13 *Suppl* 4:85-97., 85-97.
- Gros,D.B., Nicholson,B.J., Revel,J.P. (1983). Comparative analysis of the gap junction protein from rat heart and liver: is there a tissue specificity of gap junctions? *Cell* 35, 539-549.
- Gros,D.B., Jongsma,H.J. (1996). Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 18, 719-730.
- Gros,D., Dupays,L., Alcolea,S., Meysen,S., Miquerol,L., Theveniau-Ruissy,M. (2004). Genetically modified mice: tools to decode the functions of connexins in the heart-new models for cardiovascular research. *Cardiovasc.Res.* 62, 299-308.
- Gschwind, M. und Huber, G.(1998). Introduction of hereditary disease-associated mutations into the beta- amyloid precursor protein gene of mouse embryonic stem cells: a comparison of homologous recombination methods. *Mol.Cell Biol.* 18, 4651-4658.

- Guerrero,P.A., Schuessler,R.B., Davis,L.M., Beyer,E.C., Johnson,C.M., Yamada,K.A., Saffitz,J.E. (1997). Slow ventricular conduction in mice heterozygous for a connexin43 null mutation. *J.Clin.Invest* 99, 1991-1998.
- Gupta,N., Wang,H., McLeod,T.L., Naus,C.C., Kyurkchiev,S., Advani,S., Yu,J., Perbal,B., Weichselbaum,R.R. (2001). Inhibition of glioma cell growth and tumorigenic potential by CCN3 (NOV). *Mol.Pathol.* 54, 293-299.
- Gutstein,D.E., Morley,G.E., Tamaddon,H., Vaidya,D., Schneider,M.D., Chen,J., Chien,K.R., Stuhlmann,H., Fishman,G.I. (2001). Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ.Res.* 88, 333-339.
- Gutstein,D.E., Liu,F.Y., Meyers,M.B., Choo,A., Fishman,G.I. (2003). The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. *J.Cell Sci.* 116, 875-885.
- Hachem,J.P., Crumrine,D., Fluhr,J., Brown,B.E., Feingold,K.R., Elias,P.M. (2003). pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *J.Invest Dermatol.* 121, 345-353.
- Haefliger,J.A., Castillo,E., Waeber,G., Aubert,J.F., Nicod,P., Waeber,B., Meda,P. (1997). Hypertension differentially affects the expression of the gap junction protein connexin43 in cardiac myocytes and aortic smooth muscle cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 432:71-82., 71-82.
- Haefliger,J.A., Nicod,P., Meda,P. (2004). Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc.Res.* 62 , 345-356.
- Hagendorff,A., B.Schumacher, S.Kirchhoff, B.Lüderitz, and K.Willecke. 1999. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation.* 99,1508-1515.
- Hall,D.G., Morley,G.E., Vaidya,D., Ard,M., Kimball,T.R., Witt,S.A., Colbert,M.C. (2000). Early onset heart failure in transgenic mice with dilated cardiomyopathy. *Pediatr.Res.* 48, 36-42.
- Hanahan, D. und Meselson, M.(1983). Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.* 100, 333-342.
- Hanks,M., Wurst,W., Anson-Cartwright,L., Auerbach,A.B., Joyner,A.L. (1995). Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science* 269, 679-682.
- Hardman,M.J., Sisi,P., Banbury,D.N., Byrne,C. (1998). Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development* 125, 1541-1552.
- Haubrich,S., Schwarz,H.J., Bukauskas,F., Lichtenberg-Frate,H., Traub,O., Weingart,R., Willecke,K. (1996). Incompatibility of connexin 40 and 43 Hemichannels in gap junctions between mammalian cells is determined by intracellular domains. *Mol.Biol.Cell* 7, 1995-2006.
- Hennemann,H., Kozjek,G., Dahl,E., Nicholson,B., Willecke,K. (1992a). 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., Dahl,E., White,J.B., Schwarz,H.J., Lalley,P.A., Chang,S., Nicholson,B.J., 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.
- Hertig,C.M., Eppenberger-Eberhardt,M., Koch,S., Eppenberger,H.M. (1996). N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. I. Functional role of N-cadherin and impairment of cell-cell contact by a truncated N-cadherin mutant. *J.Cell Sci.* 109, 1-10.

- Hertlein,B., A.Butterweck, S.Haubrich, K.Willecke, and O.Traub. 1998. Phosphorylated carboxy terminal serine residues stabilize the mouse gap junction protein connexin45 against degradation. *J. Membr. Biol.* 162, 247-257.
- Herzog,F., Winter,H., Schweizer,J. (1994). The large type II 70-kDa keratin of mouse epidermis is the ortholog of human keratin K2e. *J.Invest Dermatol.* 102, 165-170.
- Hilton,D.J., Nicola,N.A., Metcalf,D. (1991). Distribution and comparison of receptors for leukemia inhibitory factor on murine hemopoietic and hepatic cells. *J.Cell Physiol* 146, 207-215.
- Hodgins,M.B. (2004). Connecting wounds with connexins. *J.Invest Dermatol.* 122, IX.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. 1994. Manipulating the mouse embryo – A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Hohl,D., Mehrel,T., Lichti,U., Turner,M.L., Roop,D.R., Steinert,P.M. (1991). Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *J.Biol.Chem.* 266 , 6626-6636.
- Holmes, D.S. und Quigley, M.(1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal.Biochem.* 114, 193-197.
- Hombach,S., Janssen-Bienhold,U., Söhl,G., Schubert,T., Büssow,H., Ott,T., Weiler,R., Willecke,K. (2004). Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *Eur.J.Neurosci.* 19, 2633-2640.
- Homma,N., Alvarado,J.L., Coombs,W., Stergiopoulos,K., Taffet,S.M., Lau,A.F., Delmar,M. (1998). A particle-receptor model for the insulin-induced closure of connexin43 channels. *Circ.Res.* 83, 27-32.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., und Monk, M.(1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326, 292-295.
- Horst,E., P.L.Wijngaard, M.Metzelaar, E.J.Bast, and H.C.Clevers. 1991. A method for cDNA cloning in COS cells irrespective of subcellular site of expression. *Nucleic Acids Res.* 19,4556.
- Hoshi,T., Zagotta,W.N., Aldrich,R.W. (1990). Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250, 533-538.
- Hossain,M.Z., Boynton,A.L. (2000). Regulation of Cx43 gap junctions: the gatekeeper and the password. *Sci.STKE.* 2000, E1.
- Hsieh,C.L., Kumar,N.M., Gilula,N.B., Francke,U. (1991). Distribution of genes for gap junction membrane channel proteins on human and mouse chromosomes. *Somat.Cell Mol.Genet.* 17, 191-200.
- Huang,G.Y., Cooper,E.S., Waldo,K., Kirby,M.L., Gilula,N.B., Lo,C.W. (1998). Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. *J.Cell Biol.* 143, 1725-1734.
- Huang,X.D., Horackova,M., Pressler,M.L. (1996). Changes in the expression and distribution of connexin 43 in isolated cultured adult guinea pig cardiomyocytes. *Exp.Cell Res.* 228, 254-261.
- Hung,A.Y., Sheng,M. (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J.Biol.Chem.* 277, 5699-5702.
- Hunter,A.W., Jourdan,J., Gourdie,R.G. (2003). Fusion of GFP to the carboxyl terminus of connexin43 increases gap junction size in HeLa cells. *Cell Commun.Adhes.* 10, 211-214.
- Jackson,I.J. (1997). Homologous pigmentation mutations in human, mouse and other model organisms. *Hum.Mol.Genet.* 6, 1613-1624.

- Jalife, J., Morley, G.E., Vaidya, D. (1999). Connexins and impulse propagation in the mouse heart. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 10, 1649-1663.
- Joliot, V., Martinerie, C., Dambrine, G., Plassiart, G., Brisac, M., Crochet, J., Perbal, B. (1992). Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. *Mol. Cell Biol.* 12, 10-21.
- Jones, H.W., Jr., McKusick, V.A., Harper, P.S., Wu, K.D. (1971). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet. Gynecol.* 38, 945-949.
- Jordan, K., Chodock, R., Hand, A.R., Laird, D.W. (2001). The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J. Cell Sci.* 114, 763-773.
- Judisch, G.F., Martin-Casals, A., Hanson, J.W., Olin, W.H. (1979). Oculodentodigital dysplasia. Four new reports and a literature review. *Arch. Ophthalmol.* 97, 878-884.
- Juneja, S.C., Barr, K.J., Enders, G.C., Kidder, G.M. (1999). Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol. Reprod.* 60, 1263-1270.
- Kalinin, A.E., Kajava, A.V., Steinert, P.M. (2002). Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays* 24, 789-800.
- Kalinin, A.E., Kajava, A.V., Steinert, P.M. (2002). Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays* 24, 789-800.
- Kalma, Y., Granot, I., Galiani, D., Barash, A., Dekel, N. (2004). Luteinizing hormone-induced connexin 43 down-regulation: inhibition of translation. *Endocrinology* 145, 1617-1624.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Neurowissenschaften: Eine Einführung.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg. 1996.
- Kidder, G.M., Mhawi, A.A. (2002). Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction.* 123, 613-620.
- Kim, D.Y., Kam, Y., Koo, S.K., Joe, C.O. (1999). Gating connexin 43 channels reconstituted in lipid vesicles by mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274, 5581-5587.
- Kirchhoff, S., Kim, J.S., Hagendorff, A., Thönnissen, E., Krüger, O., Lamers, W.H., Willecke, K. (2000). Abnormal cardiac conduction and morphogenesis in connexin40 and connexin43 double-deficient mice. *Circ. Res.* 87, 399-405.
- Koch, P.J., de Viragh, P.A., Scharer, E., Bundman, D., Longley, M.A., Bickenbach, J., Kawachi, Y., Suga, Y., Zhou, Z., Huber, M., Hohl, D., Kartasova, T., Jarnik, M., Steven, A.C., Roop, D.R. (2000). Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *J. Cell Biol.* 151, 389-400.
- Koizumi, H., Kartasova, T., Tanaka, H., Ohkawara, A., Kuroki, T. (1996). Differentiation-associated localization of small proline-rich protein in normal and diseased human skin. *Br. J. Dermatol.* 134, 686-692.
- Korge, B.P., Ishida-Yamamoto, A., Punter, C., Dopping-Hepenstal, P.J., Iizuka, H., Stephenson, A., Eady, R.A., Munro, C.S. (1997). Loricrin mutation in Vohwinkel's keratoderma is unique to the variant with ichthyosis. *J. Invest. Dermatol.* 109, 604-610.
- Kostin, S., Rieger, M., Dammer, S., Hein, S., Richter, M., Klovekorn, W.P., Bauer, E.P., Schaper, J. (2003). Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol. Cell Biochem.* 242, 135-144.
- Krenacs, T., van Dartel, M., Lindhout, E., Rosendaal, M. (1997). Direct cell/cell communication in the lymphoid germinal center: connexin43 gap junctions functionally couple follicular dendritic cells to each other and to B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 27, 1489-1497.

- Kretz,M., Euwens,C., Hombach,S., Eckardt,D., Teubner,B., Traub,O., Willecke,K., Ott,T. (2003). Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice. *J.Cell Sci.* 116, 3443-3452.
- Krien,P.M., Kermici,M. (2000). Evidence for the existence of a self-regulated enzymatic process within the human stratum corneum -an unexpected role for urocanic acid. *J.Invest Dermatol.* 115, 414-420.
- Krüger,O., Plum,A., Kim,J.S., Winterhager,E., Maxeiner,S., Hallas,G., Kirchhoff,S., Traub,O., Lamers,W.H., Willecke,K. (2000). Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 127, 4179-4193.
- Kucera,J.P., Rohr,S., Rudy,Y. (2002). Localization of sodium channels in intercalated disks modulates cardiac conduction. *Circ.Res.* 91, 1176-1182.
- Kuechle,M.K., Thulin,C.D., Presland,R.B., Dale,B.A. (1999). Profilaggrin requires both linker and filaggrin peptide sequences to form granules: implications for profilaggrin processing in vivo. *J.Invest Dermatol.* 112, 843-852.
- Kumar,N.M., Gilula,N.B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381-388.
- Kwak,B.R., Mulhaupt,F., Veillard,N., Gros,D.B., Mach,F. (2002). Altered pattern of vascular connexin expression in atherosclerotic plaques. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 22, 225-230.
- Kühnel W. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. 7. Auflage. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1989.
- Laemmli,U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Laing,J.G., 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., Tadros,P.N., Green,K., Saffitz,J.E., Beyer,E.C. (1998). Proteolysis of connexin43-containing gap junctions in normal and heat-stressed cardiac myocytes. *Cardiovasc.Res.* 38, 711-718.
- 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.* 273, 67-72.
- Laird,P.W., A.Zijderveld, K.Linders, M.A.Rudnicki, R.Jaenisch, and A.Berns. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* 19,4293.
- Lampe,P.D., TenBroek,E.M., Burt,J.M., Kurata,W.E., Johnson,R.G., Lau,A.F. (2000). Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J.Cell Biol.* 149, 1503-1512.
- Landisman,C.E., Long,M.A., Beierlein,M., Deans,M.R., Paul,D.L., Connors,B.W. (2002). Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *J.Neurosci.* 22, 1002-1009.
- Larsen,W.J., Tung,H.N., Murray,S.A., Swenson,C.A. (1979). Evidence for the participation of actin microfilaments and bristle coats in the internalization of gap junction membrane. *J.Cell Biol.* 83, 576-587.
- Lauf,U., Giepmans,B.N., Lopez,P., Braconnot,S., Chen,S.C., Falk,M.M. (2002). Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 10446-10451.
- Laux-Fenton,W.T., Donaldson,P.J., Kistler,J., Green,C.R. (2003). Connexin expression patterns in the rat cornea: molecular evidence for communication compartments. *Cornea* 22, 457-464.

- Lecanda,F., Warlow,P.M., Sheikh,S., Furlan,F., Steinberg,T.H., Civitelli,R. (2000). Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *J.Cell Biol.* 151, 931-944.
- Li,C.L., Martinez,V., He,B., Lombet,A., Perbal,B. (2002). A role for CCN3 (NOV) in calcium signalling. *Mol.Pathol.* 55, 250-261.
- Li,W.E., Ochalski,P.A., Hertzberg,E.L., Nagy,J.I. (1998). Immunorecognition, ultrastructure and phosphorylation status of astrocytic gap junctions and connexin43 in rat brain after cerebral focal ischaemia. *Eur.J.Neurosci.* 10, 2444-2463.
- List,K., Haudenschild,C.C., Szabo,R., Chen,W., Wahl,S.M., Swaim,W., Engelholm,L.H., Behrendt,N., Bugge,T.H. (2002). Matriptase/MT-SP1 is required for postnatal survival, epidermal barrier function, hair follicle development, and thymic homeostasis. *Oncogene* 21, 3765-3779.
- List,K., Szabo,R., Wertz,P.W., Segre,J., Haudenschild,C.C., Kim,S.Y., Bugge,T.H. (2003). Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1. *J.Cell Biol.* 163, 901-910.
- Liu,S., Taffet,S., Stoner,L., Delmar,M., Vallano,M.L., 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, X., Wu, H., Loring, J., Hormuzdi, S., Distech, C.M., Bornstein, P., und Jaenisch, R.(1997). Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev.Dyn.* 209, 85-91.
- Lo,C.W., Waldo,K.L., Kirby,M.L. (1999). Gap junction communication and the modulation of cardiac neural crest cells. *Trends Cardiovasc.Med.* 9, 63-69.
- Lo,C.W. (2000). Role of gap junctions in cardiac conduction and development: insights from the connexin knockout mice. *Circ.Res.* 87, 346-348.
- Lukas,A., Antzelevitch,C. (1996). Phase 2 reentry as a mechanism of initiation of circus movement reentry in canine epicardium exposed to simulated ischemia. *Cardiovasc.Res.* 32, 593-603.
- Maaß,K. gezielte Veränderungen im Connexin43-Gen in embryonalen Stammzellen der Maus. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (1999).
- Madison,K.C. (2003). Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J.Invest Dermatol.* 121, 231-241.
- Magin,T.M., McWhir,J., Melton,D.W. (1992). A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res.* 20, 3795-3796.
- Manjunath,C.K., Goings,G.E., Page,E. (1984). Cytoplasmic surface and intramembrane components of rat heart gap junctional proteins. *Am.J.Physiol* 246, H865-H875.
- Marcinkiewicz,M., Han,K., Zbroch,T., Poplawski,C., Gramley,W., Goldin,G., Sarosiek,J. (2000). The potential role of the esophageal pre-epithelial barrier components in the maintenance of integrity of the esophageal mucosa in patients with endoscopically negative gastroesophageal reflux disease. *Am.J.Gastroenterol.* 95, 1652-1660.
- Marshall,D., Hardman,M.J., Byrne,C. (2000). SPRR1 gene induction and barrier formation occur as coordinated moving fronts in terminally differentiating epithelia. *J.Invest Dermatol.* 114, 967-975.
- Martin,G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78, 7634-7638.
- Martin,P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.

- Martin,P.E., Blundell,G., Ahmad,S., Errington,R.J., Evans,W.H. (2001). Multiple pathways 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.D., Hayrapetyan,V., Moreno,A.P., Beyer,E.C. (2003). A carboxyl terminal domain of connexin43 is critical for gap junction plaque formation but not for homo- or hetero-oligomerization. *Cell Commun.Adhes.* 10, 323-328.
- Matsuki,M., Yamashita,F., Ishida-Yamamoto,A., Yamada,K., Kinoshita,C., Fushiki,S., Ueda,E., Morishima,Y., Tabata,K., Yasuno,H., Hashida,M., Iizuka,H., Ikawa,M., Okabe,M., Kondoh,G., Kinoshita,T., Takeda,J., Yamanishi,K. (1998). Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 1044-1049.
- Matsushita,T., Oyamada,M., Kurata,H., Masuda,S., Takahashi,A., Emmoto,T., Shiraishi,I., Wada,Y., Oka,T., Takamatsu,T. (1999). Formation of cell junctions between grafted and host cardiomyocytes at the border zone of rat myocardial infarction. *Circulation* 100, 11262-11268.
- Mauro,T., Holleran,W.M., Grayson,S., Gao,W.N., Man,M.Q., Kriehuber,E., Behne,M., Feingold,K.R., Elias,P.M. (1998). Barrier recovery is impeded at neutral pH, independent of ionic effects: implications for extracellular lipid processing. *Arch.Dermatol.Res.* 290, 215-222.
- Maza,J., Mateescu,M., Sarma,J.D., Koval,M. (2003). Differential oligomerization of endoplasmic reticulum-retained connexin43/connexin32 chimeras. *Cell Commun.Adhes.* 10, 319-322.
- Mitchell,J.A., Lye,S.J. (2001). Regulation of connexin43 expression by c-fos and c-jun in myometrial cells. *Cell Commun.Adhes.* 8, 299-302.
- Montecino-Rodriguez,E., Leathers,H., Dorshkind,K. (2000). Expression of connexin 43 (Cx43) is critical for normal hematopoiesis. *Blood* 96, 917-924.
- Moorby,C.D., Gherardi,E. (1999). Expression of a Cx43 deletion mutant in 3T3 A31 fibroblasts prevents PDGF-induced inhibition of cell communication and suppresses cell growth. *Exp.Cell Res.* 249, 367-376.
- Moreno,A.P., Chanson,M., Elenes,S., Anumonwo,J., Scerri,I., Gu,H., Taffet,S.M., Delmar,M. (2002). Role of the carboxyl terminal of connexin43 in transjunctional fast voltage gating. *Circ.Res.* 90, 450-457.
- Morley,G.E., Taffet,S.M., Delmar,M. (1996). Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. *Biophys.J.* 70, 1294-1302.
- Morley,G.E., Vaidya,D., Samie,F.H., Lo,C., Delmar,M., Jalife,J. (1999). Characterization of conduction in the ventricles of normal and heterozygous Cx43 knockout mice using optical mapping. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* 10, 1361-1375.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A.(1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Murakami,S., Muramatsu,T., Shimono,M. (2001). Expression and localization of connexin 43 in rat incisor odontoblasts. *Anat.Embryol.(Berl)* 203, 367-374.
- Musil,L.S., Cunningham,B.A., Edelman,G.M., 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., Le,A.C., VanSlyke,J.K., Roberts,L.M. (2000). Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J.Biol.Chem.* 275, 25207-25215.
- Mystkowska, E.T., Ozdzanski, W., und Niemierko, A.(1979). Factors regulating the degree and extent of experimental chimaerism in the mouse. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 51, 217-225.

- Nagy A, Gertsenstein M, Vinterstein K, Behringer R. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
- Nakase,T., Söhl,G., Theis,M., Willecke,K., Naus,C.C. (2004). Increased apoptosis and inflammation after focal brain ischemia in mice lacking connexin43 in astrocytes. *Am.J.Pathol.* 164, 2067-2075.
- Naus,C.C., Hearn,S., Zhu,D., Nicholson,B.J., Shivers,R.R. (1993). Ultrastructural analysis of gap junctions in C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA. *Exp.Cell Res.* 206, 72-84.
- Nemes,Z., Marekov,L.N., Fesus,L., Steinert,P.M. (1999). A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 8402-8407.
- Netter F. Atlas der Anatomie des Menschen. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1993.
- Nicholson,B.J., Weber,P.A., Cao,F., Chang,H., Lampe,P., Goldberg,G. (2000). The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 33 , 369-378.
- Nicholson,B.J. (2003). Gap junctions - from cell to molecule. *J.Cell Sci.* 116, 4479-4481.
- Niessen,H., Harz,H., Bedner,P., Kramer,K., Willecke,K. (2000). Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate. *J.Cell Sci.* 113, 1365-1372.
- Odland,G.F., Holbrook,K. (1981). The lamellar granules of epidermis. *Curr.Probl.Dermatol.* 9:29-49., 29-49.
- Okuma,A., Kuraoka,A., Iida,H., Inai,T., Wasano,K., Shibata,Y. (1996). Colocalization of connexin 43 and connexin 45 but absence of connexin 40 in granulosa cell gap junctions of rat ovary. *J.Reprod.Fertil.* 107, 255-264.
- Orsino,A., Taylor,C.V., Lye,S.J. (1996). Connexin-26 and connexin-43 are differentially expressed and regulated in the rat myometrium throughout late pregnancy and with the onset of labor. *Endocrinology* 137, 1545-1553.
- Oto,A., Breithardt, G. (edt). Myocardial repolarization: from genes to bedside. Futura Publishing Co., Inc., Armonk, New York, 2001.
- Oviedo-Orta,E., Howard,E.W. (2004). Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. *Biochim.Biophys.Acta* 1662, 102-112.
- Panchin,Y., Kelmanson,I., Matz,M., Lukyanov,K., Usman,N., Lukyanov,S. (2000). A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr.Biol.* 10, R473-R474.
- Paulson,A.F., Lampe,P.D., Meyer,R.A., TenBroek,E., Atkinson,M.M., Walseth,T.F., Johnson,R.G. (2000). Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J.Cell Sci.* 113, 3037-3049.
- Paznekas,W.A., Boyadjiev,S.A., Shapiro,R.E., Daniels,O., Wollnik,B., Keegan,C.E., Innis,J.W., Dinulos,M.B., Christian,C., Hannibal,M.C., Jabs,E.W. (2003). Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am.J.Hum.Genet.* 72, 408-418.
- Pearton,D.J., Nirunsuksiri,W., Rehemtulla,A., Lewis,S.P., Presland,R.B., Dale,B.A. (2001). Proprotein convertase expression and localization in epidermis: evidence for multiple roles and substrates. *Exp.Dermatol.* 10, 193-203.
- Pearton,D.J., Dale,B.A., Presland,R.B. (2002). Functional analysis of the profilaggrin N-terminal peptide: identification of domains that regulate nuclear and cytoplasmic distribution. *J.Invest Dermatol.* 119, 661-669.

- Peifer, M., Yap, A.S. (2003). Traffic control: p120-catenin acts as a gatekeeper to control the fate of classical cadherins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 163, 437-440.
- Peracchia, C., Sotkis, A., Wang, X.G., Peracchia, L.L., Persechini, A. (2000). Calmodulin directly gates gap junction channels. *J. Biol. Chem.* 275, 26220-26224.
- Peters, N.S., Severs, N.J., Rothery, S.M., Lincoln, C., Yacoub, M.H., Green, C.R. (1994). Spatiotemporal relation between gap junctions and fascia adherens junctions during postnatal development of human ventricular myocardium. *Circulation* 90, 713-725.
- Peters, N.S. (1996). New insights into myocardial arrhythmogenesis: distribution of gap-junctional coupling in normal, ischaemic and hypertrophied human hearts. *Clin. Sci. (Lond)* 90, 447-452.
- Peters, N.S., Coromilas, J., Severs, N.J., Wit, A.L. (1997). Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation* 95, 988-996.
- Peters, N.S., Wit, A.L. (1998). Myocardial architecture and ventricular arrhythmogenesis. *Circulation* 97, 1746-1754.
- Petrich, B.G., Gong, X., Lerner, D.L., Wang, X., Brown, J.H., Saffitz, J.E., Wang, Y. (2002). c-Jun N-terminal kinase activation mediates downregulation of connexin43 in cardiomyocytes. *Circ. Res.* 91, 640-647.
- Phelan, P., Starich, T.A. (2001). Innexins get into the gap. *Bioessays* 23, 388-396.
- Plum, A., Hallas, G., Magin, T., Dombrowski, F., Hagendorff, A., Schumacher, B., Wolpert, C., Kim, J., Lamers, W.H., Evert, M., Meda, P., Traub, O., Willecke, K. (2000). Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr. Biol.* 10, 1083-1091.
- Potten, C.S., Booth, C. (2002). Keratinocyte stem cells: a commentary. *J. Invest Dermatol.* 119, 888-899.
- Potter, H., Weir, L., und Leder, P. (1984). Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 7161-7165.
- Presland, R.B., Haydock, P.V., Fleckman, P., Nirunskis, W., Dale, B.A. (1992). Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J. Biol. Chem.* 267, 23772-23781.
- Presland, R.B., Bassuk, J.A., Kimball, J.R., Dale, B.A. (1995). Characterization of two distinct calcium-binding sites in the amino-terminus of human profilaggrin. *J. Invest Dermatol.* 104, 218-223.
- Presland, R.B., Kimball, J.R., Kautsky, M.B., Lewis, S.P., Lo, C.Y., Dale, B.A. (1997). Evidence for specific proteolytic cleavage of the N-terminal domain of human profilaggrin during epidermal differentiation. *J. Invest Dermatol.* 108, 170-178.
- Presland PB, Coulombe PA, Eckert RL, Mao-Qiang M, Feingold KR, Elias PM. Barrier function in transgenic mice overexpressing K16, involucrin, and filaggrin in the suprabasal epidermis. *J. Invest Dermatol.* 2004; online pub
- Priori, S.G., Napolitano, C., Schwartz, P.J. (1991). Electrophysiologic mechanisms involved in the development of torsades de pointes. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 5, 203-212.
- Priori, S.G., Napolitano, C., Gasparini, M., Pappone, C., Della, B.P., Brignole, M., Giordano, U., Giovannini, T., Menozzi, C., Bloise, R., Crotti, L., Terreni, L., Schwartz, P.J. (2000). Clinical and genetic heterogeneity of right bundle branch block and ST-segment elevation syndrome: A prospective evaluation of 52 families. *Circulation* 102, 2509-2515.

- Pummi,K., Malminen,M., Aho,H., Karvonen,S.L., Peltonen,J., Peltonen,S. (2001). Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *J.Invest Dermatol.* 117, 1050-1058.
- Qin,H., Shao,Q., Igdoura,S.A., Alaoui-Jamali,M.A., Laird,D.W. (2003). Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of Cx43 in gap junctional intercellular communication-deficient and -competent breast tumor cells. *J.Biol.Chem.* 278, 30005-30014.
- Qiu,C., Coutinho,P., Frank,S., Franke,S., Law,L.Y., Martin,P., Green,C.R., Becker,D.L. (2003). Targeting connexin43 expression accelerates the rate of wound repair. *Curr.Biol.* 13, 1697-1703.
- Qu,Y., Dahl,G. (2002). Function of the voltage gate of gap junction channels: selective exclusion of molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 697-702.
- Rawanduzy,A., Hansen,A., Hansen,T.W., Nedergaard,M. (1997). Effective reduction of infarct volume by gap junction blockade in a rodent model of stroke. *J.Neurosurg.* 87, 916-920.
- Rawlings,A.V., Harding,C.R. (2004). Moisturization and skin barrier function. *Dermatol.Ther.* 17 *Suppl* 1:43-8., 43-48.
- Reaume,A.G., de Sousa,P.A., Kulkarni,S., Langille,B.L., Zhu,D., Davies,T.C., Juneja,S.C., Kidder,G.M., Rossant,J. (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267, 1831-1834.
- Reichelt,J., Büsow,H., Grund,C., Magin,T.M. (2001). Formation of a normal epidermis supported by increased stability of keratins 5 and 14 in keratin 10 null mice. *Mol.Biol.Cell* 12, 1557-1568.
- Reid,L.H., Gregg,R.G., Smithies,O., Koller,B.H. (1990). Regulatory elements in the introns of the human HPRT gene are necessary for its expression in embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87, 4299-4303.
- Resing,K.A., al Alawi,N., Blomquist,C., Fleckman,P., Dale,B.A. (1993). Independent regulation of two cytoplasmic processing stages of the intermediate filament-associated protein filaggrin and role of Ca²⁺ in the second stage. *J.Biol.Chem.* 268, 25139-25145.
- Reuss,B., Hellmann,P., Traub,O., Butterweck,A., Winterhager,E. (1997). Expression of connexin31 and connexin43 genes in early rat embryos. *Dev.Genet.* 21, 82-90.
- Revel,J.P., Karnovsky,M.J. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J.Cell Biol.* 33, C7-C12.
- Richard,G. (2000). Connexins: a connection with the skin. *Exp.Dermatol.* 9, 77-96.
- Risek,B., Klier,F.G., Gilula,N.B. (1994). Developmental regulation and structural organization of connexins in epidermal gap junctions. *Dev.Biol.* 164, 183-196.
- Rivolta,I., Abriel,H., Tateyama,M., Liu,H., Memmi,M., Vardas,P., Napolitano,C., Priori,S.G., Kass,R.S. (2001). Inherited Brugada and long QT-3 syndrome mutations of a single residue of the cardiac sodium channel confer distinct channel and clinical phenotypes. *J.Biol.Chem.* 276, 30623-30630.
- Roberts,R., Brugada,R. (2000). Genetic aspects of arrhythmias. *Am.J.Med.Genet.* 97, 310-318.
- Robertson,E., Bradley,A., Kuehn,M., Evans,M. (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323, 445-448.
- Rohr,S., Kucera,J.P., Fast,V.G., Kleber,A.G. (1997). Paradoxical improvement of impulse conduction in cardiac tissue by partial cellular uncoupling. *Science* 275, 841-844.
- Roscoe,W.A., Barr,K.J., Mhawi,A.A., Pomerantz,D.K., Kidder,G.M. (2001). Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol.Reprod.* 65, 829-838.

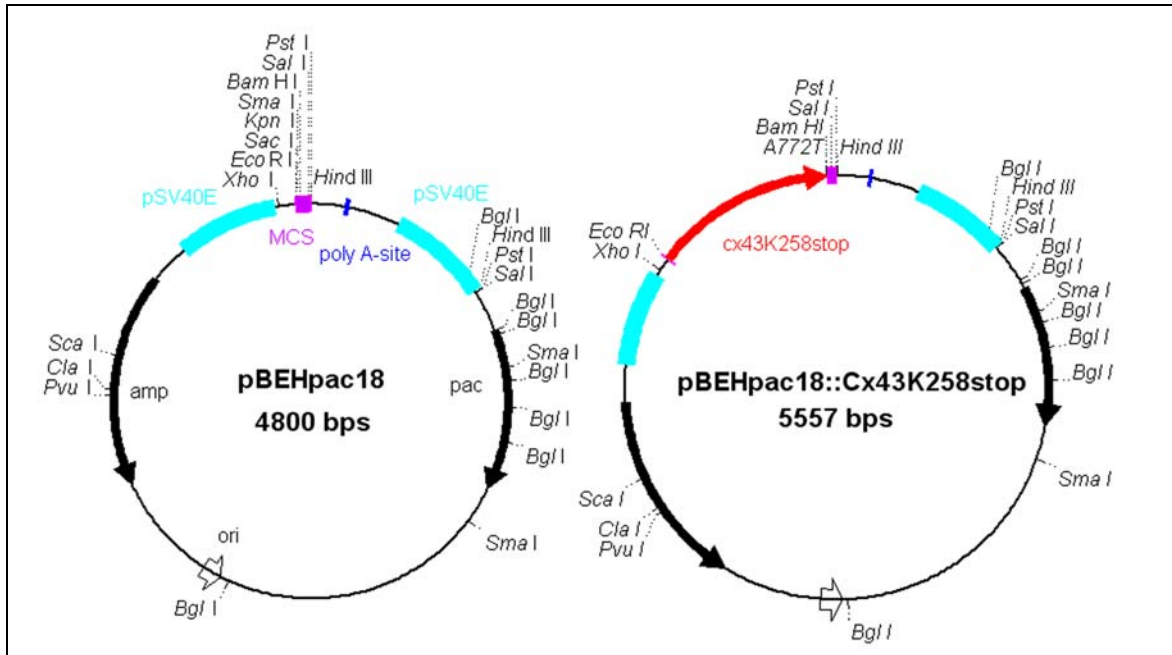
- Rothnagel, J.A., Steinert, P.M. (1990). The structure of the gene for mouse filaggrin and a comparison of the repeating units. *J.Biol.Chem.* 265, 1862-1865.
- Roy, B.C., Kuroda, T., Mori, S., Kohu, K., Akiyama, T., Senda, T. (1999). Localization of a novel GAP family protein SPAL in the rat esophagus and heart. *Med.Electron Microsc.* 32, 20-24.
- Ruangvoravat, C.P., Lo, C.W. (1992). Connexin 43 expression in the mouse embryo: localization of transcripts within developmentally significant domains. *Dev.Dyn.* 194, 261-281.
- Ruhrberg, C., Hajibagheri, M.A., Parry, D.A., Watt, F.M. (1997). Periplakin, a novel component of cornified envelopes and desmosomes that belongs to the plakin family and forms complexes with envoplakin. *J.Cell Biol.* 139, 1835-1849.
- Sadler TW. *Medizinische Embryologie*. 10. Auflage. Thieme-Verlag, Stuttgart, 2003
- Saez, J.C., Connor, J.A., Spray, D.C., Bennett, M.V. (1989). Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 2708-2712.
- Saez, J.C., Martinez, A.D., Branes, M.C., Gonzalez, H.E. (1998). Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 31, 593-600.
- Saffitz, J.E., Davis, L.M., Darrow, B.J., Kanter, H.L., Laing, J.G., Beyer, E.C. (1995). The molecular basis of anisotropy: role of gap junctions. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* 6, 498-510.
- Saffitz, J.E., Laing, J.G., Yamada, K.A. (2000). Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. *Circ.Res.* 86, 723-728.
- Sainio, K., Gilbert, S.F., Lehtonen, E., Nishi, M., Kumar, N.M., Gilula, N.B., Saxen, L. (1992). Differential expression of gap junction mRNAs and proteins in the developing murine kidney and in experimentally induced nephric mesenchymes. *Development* 115, 827-837.
- Sano, T., Takayama, N., Shimamoto, T. (1959). Directional difference of conduction velocity in the cardiac ventricular syncytium studied by microelectrodes. *Circ.Res.* 7, 262-267.
- Schliecker, C. *Reinigung der C-terminalen Domäne des Ratten Connexin43 Proteins nach Expressionsklonierung in Bakterien, Hefe und Insektenzellen*. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2000).
- Schmuth, M., Fluhr, J.W., Crumrine, D.C., Uchida, Y., Hachem, J.P., Behne, M., Moskowitz, D.G., Christiano, A.M., Feingold, K.R., Elias, P.M. (2004). Structural and functional consequences of loricrin mutations in human loricrin keratoderma (Vohwinkel syndrome with ichthyosis). *J.Invest Dermatol.* 122, 909-922.
- Schneider, J.A., Shaw, G.G., Van Reken, D.E. (1977). Congenital heart disease in oculodentodigital dysplasia. *Va.Med.* 104, 262-263.
- Schubert, A.L., Schubert, W., Spray, D.C., Lisanti, M.P. (2002). Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry* 41, 5754-5764.
- Schwartz, P.J., Stramba-Badiale, M., Segantini, A., Austoni, P., Bosi, G., Giorgetti, R., Grancini, F., Marni, E.D., Perticone, F., Rosti, D., Salice, P. (1998). Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *N.Engl.J.Med.* 338, 1709-1714.
- Schwartz, P.J., Priori, S.G., Bloise, R., Napolitano, C., Ronchetti, E., Piccinini, A., Goj, C., Breithardt, G., Schulze-Bahr, E., Wedekind, H., Nastoli, J. (2001). Molecular diagnosis in a child with sudden infant death syndrome. *Lancet* 358, 1342-1343.
- Schwarz, H.J., Chang, Y.S., Hennemann, H., Dahl, E., Lalley, P.A., Willecke, K. (1992). Chromosomal assignments of mouse connexin genes, coding for gap junctional proteins, by somatic cell hybridization. *Somat.Cell Mol.Genet.* 18, 351-359.

- Scott,I.R., Harding,C.R. (1986). Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment. *Dev.Biol.* 115, 84-92.
- Segre,J. (2003). Complex redundancy to build a simple epidermal permeability barrier. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15, 776-782.
- Segre,J.A., Bauer,C., Fuchs,E. (1999). Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat.Genet.* 22, 356-360.
- Severs,N.J., Coppens,S.R., Dupont,E., Yeh,H.I., Ko,Y.S., Matsushita,T. (2004). Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc.Res.* 62, 368-377.
- Shaw,R.M., Rudy,Y. (1997). Ionic mechanisms of propagation in cardiac tissue. Roles of the sodium and L-type calcium currents during reduced excitability and decreased gap junction coupling. *Circ.Res.* 81, 727-741.
- Shimizu,W., Antzelevitch,C. (1997). Sodium channel block with mexiletine is effective in reducing dispersion of repolarization and preventing torsade des pointes in LQT2 and LQT3 models of the long-QT syndrome. *Circulation* 96, 2038-2047.
- Silbernagel S. und Depopoulos A. Taschenatlas der Physiologie. 3. Auflage. Thieme-Verlag, Stuttgart – New York, 1988
- Simon,A.M., Goodenough,D.A., Li,E., Paul,D.L. (1997). Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385, 525-529.
- Söhl,G., Degen,J., Teubner,B., 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.
- Söhl,G., Willecke,K. (2003). An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun.Adhes.* 10, 173-180.
- Sosinsky,G. (1995). Mixing of connexins in gap junction membrane channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 9210-9214.
- Southern, E.M.(1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98, 503-517.
- Spray,D.C., Burt,J.M. (1990). Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am.J.Physiol* 258, C195-C205.
- Stacey,A., Schnieke,A., McWhir,J., Cooper,J., Colman,A., Melton,D.W. (1994). Use of double-replacement gene targeting to replace the murine alpha-lactalbumin gene with its human counterpart in embryonic stem cells and mice. *Mol.Cell Biol.* 14, 1009-1016.
- Steinert,P.M. (2000). The complexity and redundancy of epithelial barrier function. *J.Cell Biol.* 151, F5-F8.
- Steven,A.C., Steinert,P.M. (1994). Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J.Cell Sci.* 107, 693-700.
- Stevenson,B.R., Siliciano,J.D., Mooseker,M.S., Goodenough,D.A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J.Cell Biol.* 103, 755-766.
- Stout,J.T., Caskey,C.T. (1988). The Lesch-Nyhan syndrome: clinical, molecular and genetic aspects. *Trends Genet.* 4, 175-178.
- Suchyna,T.M., Nitsche,J.M., Chilton,M., Harris,A.L., Veenstra,R.D., Nicholson,B.J. (1999). Different ionic selectivities for connexins 26 and 32 produce rectifying gap junction channels. *Biophys.J.* 77, 2968-2987.

- Suga, Y., Jarnik, M., Attar, P.S., Longley, M.A., Bundman, D., Steven, A.C., Koch, P.J., Roop, D.R. (2000). Transgenic mice expressing a mutant form of loricrin reveal the molecular basis of the skin diseases, Vohwinkel syndrome and progressive symmetric erythrokeratoderma. *J.Cell Biol.* 151, 401-412.
- Te Riele, R.H., Maandag, E.R., Berns, A. (1992). Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 5128-5132.
- Temme, A., Buchmann, A., Gabriel, H.D., Nelles, E., Schwarz, M., Willecke, K. (1997). High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr.Biol.* 7, 713-716.
- TenBroek, E.M., Lampe, P.D., Solan, J.L., Reynhout, J.K., Johnson, R.G. (2001). Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP. *J.Cell Biol.* 155, 1307-1318.
- Theis, M., Magin, T.M., Plum, A., Willecke, K. (2000). General or cell type-specific deletion and replacement of connexin-coding DNA in the mouse. *Methods* 20, 205-218.
- Theis, M. Erzeugung und Charakterisierung von Mäusen mit zelltypspezifischer Deletion des Connexin43-Gens. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2001).
- Theis, M., Mas, C., Doring, B., Kruger, O., Herrera, P., Meda, P., Willecke, K. (2001). General and conditional replacement of connexin43-coding DNA by a lacZ reporter gene for cell-autonomous analysis of expression. *Cell Commun.Adhes.* 8, 383-386.
- Theis, M., Jauch, R., Zhuo, L., Speidel, D., Wallraff, A., Döring, B., Frisch, C., Söhl, G., Teubner, B., Euwens, C., Huston, J., Steinhäuser, C., Messing, A., Heinemann, U., Willecke, K. (2003). Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J.Neurosci.* 23, 766-776.
- Theis, M., Mas, C., Doring, B., Degen, J., Brink, C., Caille, D., Charollais, A., Kruger, O., Plum, A., Nepote, V., Herrera, P., Meda, P., Willecke, K. (2004). Replacement by a lacZ reporter gene assigns mouse connexin36, 45 and 43 to distinct cell types in pancreatic islets. *Exp.Cell Res.* 294, 18-29.
- Thomas, K.R., Capecchi, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.
- Thomas, M.A., Zosso, N., Scerri, I., Demaurex, N., Chanson, M., Staub, O. (2003). A tyrosine-based sorting signal is involved in connexin43 stability and gap junction turnover. *J.Cell Sci.* 116, 2213-2222.
- Thomas, S.P., Bircher-Lehmann, L., Thomas, S.A., Zhuang, J., Saffitz, J.E., Kleber, A.G. (2000). Synthetic strands of neonatal mouse cardiac myocytes: structural and electrophysiological properties. *Circ.Res.* 87, 467-473.
- Thompson, S., Clarke, A.R., Pow, A.M., Hooper, M.L., Melton, D.W. (1989). Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* 56, 313-321.
- Thoreson, M.A., Anastasiadis, P.Z., Daniel, J.M., Ireton, R.C., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hummingbird, D.K., Reynolds, A.B. (2000). Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J.Cell Biol.* 148, 189-202.
- Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., Tada, M. (1998). Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J.Biol.Chem.* 273, 12725-12731.
- Toyofuku, T., Akamatsu, Y., Zhang, H., Kuzuya, T., Tada, M., Hori, M. (2001). c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. *J.Biol.Chem.* 276, 1780-1788.
- Trump, B.F., Smuckler, E.A., Benditt, E.P. (1961). A method for staining epoxy sections for light microscopy. *Ultrastruct.Res.* 5, 343-348

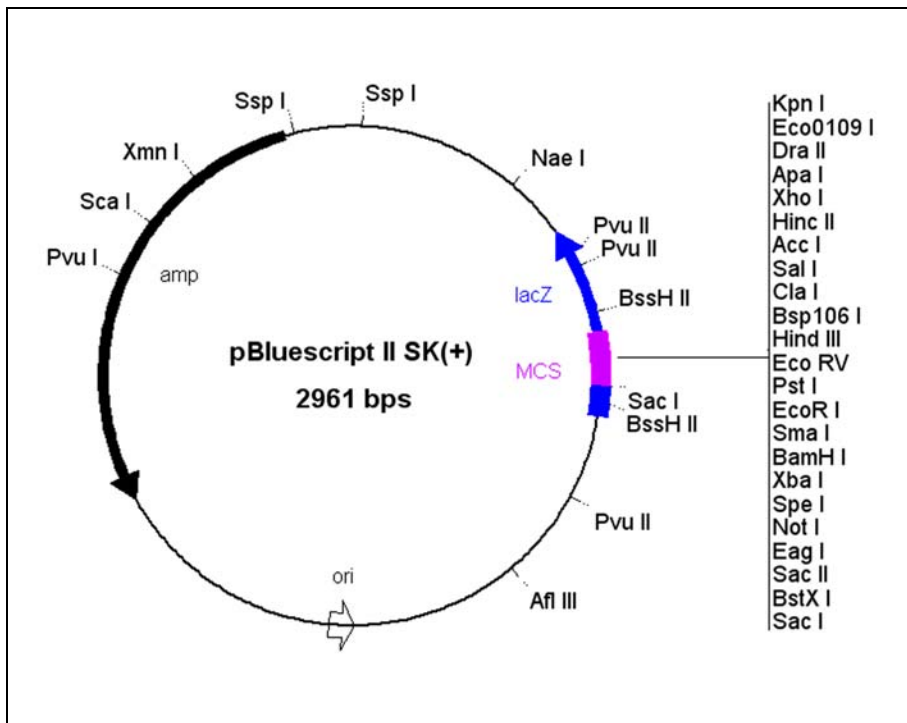
- Turksen,K., Troy,T.C. (2002). Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development* 129, 1775-1784.
- Unger,V.M., Kumar,N.M., Gilula,N.B., Yeager,M. (1999). Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283, 1176-1180.
- Vaidya,D., Tamaddon,H.S., Lo,C.W., Taffet,S.M., Delmar,M., Morley,G.E., Jalife,J. (2001). Null mutation of connexin43 causes slow propagation of ventricular activation in the late stages of mouse embryonic development. *Circ.Res.* 88, 1196-1202.
- Valiunas,V., Bukauskas,F.F., Weingart,R. (1997). Conductances and selective permeability of connexin43 gap junction channels examined in neonatal rat heart cells. *Circ.Res.* 80, 708-719.
- Valiunas,V., Beyer,E.C., Brink,P.R. (2002). Cardiac gap junction channels show quantitative differences in selectivity. *Circ.Res.* 91, 104-111.
- van Rijen,H.V., Eckardt,D., Degen,J., Theis,M., Ott,T., Willecke,K., Jongsma,H.J., Opthof,T., de Bakker,J.M. (2004). Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation* 109, 1048-1055.
- van Steensel,M.A., van Geel,M., Nahuys,M., Smitt,J.H., Steijlen,P.M. (2002). A novel connexin 26 mutation in a patient diagnosed with keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *J.Invest Dermatol.* 118, 724-727.
- van Veen,A.A., van Rijen,H.V., Opthof,T. (2001). Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc.Res.* 51, 217-229.
- VanSlyke,J.K., Musil,L.S. (2003). Degradation of connexins from the plasma membrane is regulated by inhibitors of protein synthesis. *Cell Commun.Adhes.* 10, 329-333.
- Verheijck,E.E., van Kempen,M.J., Veereschild,M., Lurvink,J., Jongsma,H.J., Bouman,L.N. (2001). Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovasc.Res.* 52, 40-50.
- Vozzi,C., Dupont,E., Coppens,S.R., Yeh,H.I., Severs,N.J. (1999). Chamber-related differences in connexin expression in the human heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* 31, 991-1003.
- Waldo,K.L., Lo,C.W., Kirby,M.L. (1999). Connexin 43 expression reflects neural crest patterns during cardiovascular development. *Dev.Biol.* 208, 307-323.
- Wallace, D.M.(1987). Precipitation of nucleic acids. *Methods Enzymol.* 152, 41-48.
- Waller, A.G. (1887). A demonstration on man of electromotive changes accompanying the heart's beat. *J. Physiol.* 8, 229-234.
- Wan,X., Chen,S., Sadeghpour,A., Wang,Q., Kirsch,G.E. (2001). Accelerated inactivation in a mutant Na(+) channel associated with idiopathic ventricular fibrillation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 280, H354-H360.
- Wang,Y.F., Daniel,E.E. (2001). Gap junctions in gastrointestinal muscle contain multiple connexins. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 281, G533-G543.
- White,T.W., Sellitto,C., Paul,D.L., Goodenough,D.A. (2001). Prenatal lens development in connexin43 and connexin50 double knockout mice. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 42, 2916-2923.
- Wilkie,A.L., Jordan,S.A., Jackson,I.J. (2002). Neural crest progenitors of the melanocyte lineage: coat colour patterns revisited. *Development* 129, 3349-3357.
- Williams,R.L., Hilton,D.J., Pease,S., Willson,T.A., Stewart,C.L., Gearing,D.P., Wagner,E.F., Metcalf,D., Nicola,N.A., Gough,N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.

- Wiszniewski,L., Limat,A., Saurat,J.H., Meda,P., Salomon,D. (2000). Differential expression of connexins during stratification of human keratinocytes. *J.Invest Dermatol.* 115, 278-285.
- Wong,C.W., Burger,F., Pelli,G., Mach,F., Kwak,B.R. (2003). Dual benefit of reduced Cx43 on atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Cell Commun.Adhes.* 10, 395-400.
- Wright,C.S., Becker,D.L., Lin,J.S., Warner,A.E., Hardy,K. (2001). Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. *Reproduction.* 121, 77-88.
- Wu,J.C., Tsai,R.Y., Chung,T.H. (2003). Role of catenins in the development of gap junctions in rat cardiomyocytes. *J.Cell Biochem.* 88, 823-835.
- Xiao,K., Allison,D.F., Buckley,K.M., Kottke,M.D., Vincent,P.A., Faundez,V., Kowalczyk,A.P. (2003). Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J.Cell Biol.* 163, 535-545.
- Xu,X., Li,W.E., Huang,G.Y., Meyer,R., Chen,T., Luo,Y., Thomas,M.P., Radice,G.L., Lo,C.W. (2001). Modulation of mouse neural crest cell motility by N-cadherin and connexin 43 gap junctions. *J.Cell Biol.* 154, 217-230.
- Ya,J., Erdtsieck-Ernste,E.B., de Boer,P.A., van Kempen,M.J., Jongsma,H., Gros,D., Moorman,A.F., Lamers,W.H. (1998). Heart defects in connexin43-deficient mice. *Circ.Res.* 82, 360-366.
- Yan,G.X., Antzelevitch,C. (1999). Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation* 100, 1660-1666.
- Yeager,M. and N.B.Gilula. 1992. Membrane topology and quaternary structure of cardiac gap junction ion channels. *J. Mol. Biol.* 223, 929-948.
- Zaniboni,M., Rossini,A., Swietach,P., Banger,N., Spitzer,K.W., Vaughan-Jones,R.D. (2003). Proton permeation through the myocardial gap junction. *Circ.Res.* 93, 726-735.
- Zhang,D., Karunaratne,S., Kessler,M., Mahony,D., Rothnagel,J.A. (2002). Characterization of mouse profilaggrin: evidence for nuclear engulfment and translocation of the profilaggrin B-domain during epidermal differentiation. *J.Invest Dermatol.* 119, 905-912.
- Zhang,J.T., 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,Y.W., Nakayama,K., Nakayama,K., Morita,I. (2003). A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). *Cancer Res.* 63, 1623-1630.
- Zhou,L., Kasperek,E.M., Nicholson,B.J. (1999). Dissection of the molecular basis of pp60(v-src) induced gating of connexin 43 gap junction channels. *J.Cell Biol.* 144, 1033-1045.
- Zoidl,G., Dermietzel,R. (2002). On the search for the electrical synapse: a glimpse at the future. *Cell Tissue Res.* 310, 137-142.



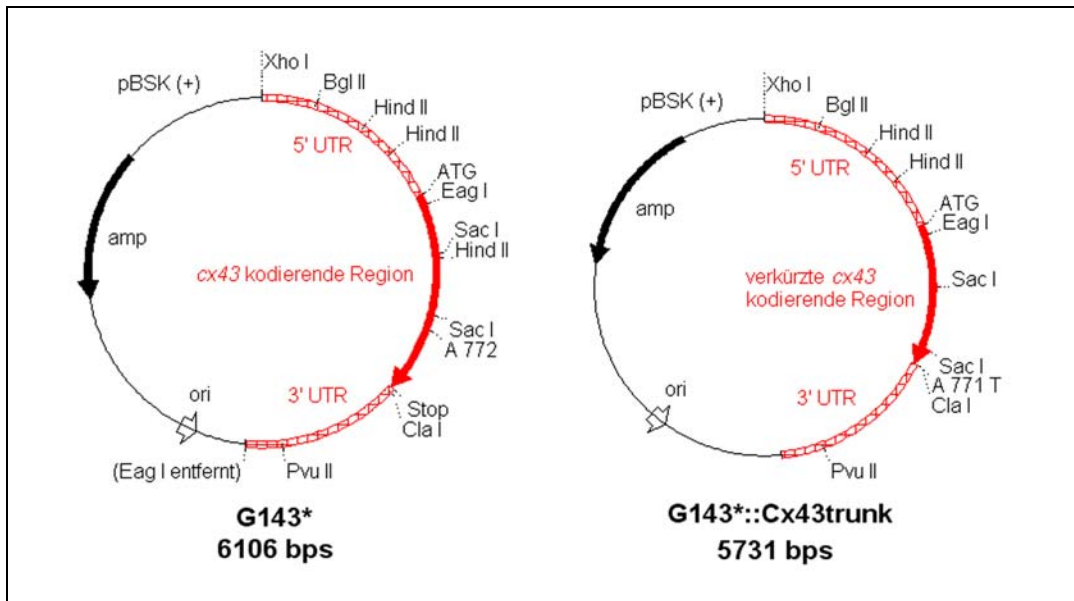
Plasmid-Karte 1: Basis-Expressionsvektor *pBEHpac18* (Horst et al., 1971) und der in der vorliegenden Arbeit hergestellte Expressionsvektor *pBEHpac18::Cx43K258stop*

MCS: Multiple Klonierungsstelle, poly A-site: eukaryotisches Polyadenylierungssignal, pSV40E: Promotor- und Verstärker-Element aus SV40 Virus für effiziente eukaryotische Transkription, pac: Paxillin-Resistenzgen für Selektion mittels Puromyzin nach Transfektion in eukaryotische Zellen, amp: Ampicillin-Resistenzgen für Selektion mittels Ampicillin nach Transformation in Bakterien, ori: bakterieller Replikationsursprung für Plasmid-Amplifikation in Bakterien



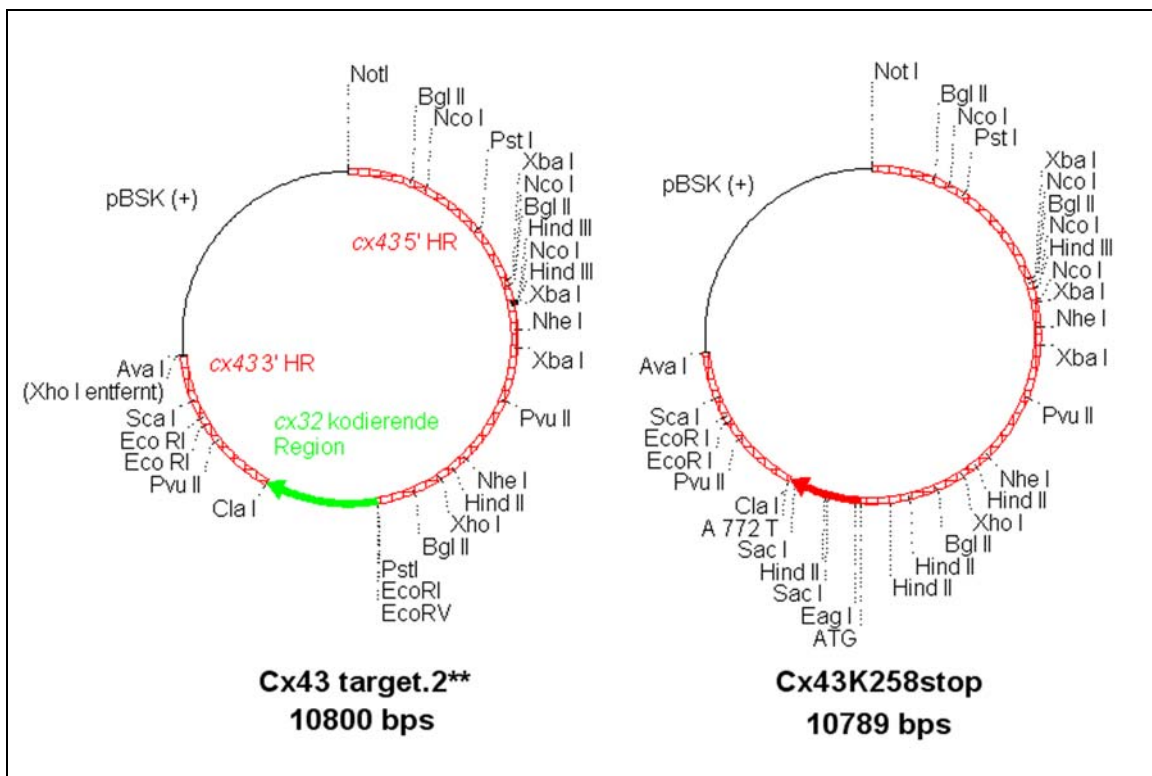
Plasmid-Karte 2: Klonierungsvektors pBluescript II SK(+) (Stratagene)

MCS: Multiple Klonierungsstelle; lacZ: LacZ Gen (beta-Galactosidase) zur alpha-Komplementation, d.h. Nachweis rekombinanter Plasmide über Blau/Weiß-Selektion; ori: Ursprung zur Replikation in E.coli; amp: Ampicillin-Resistenzgen



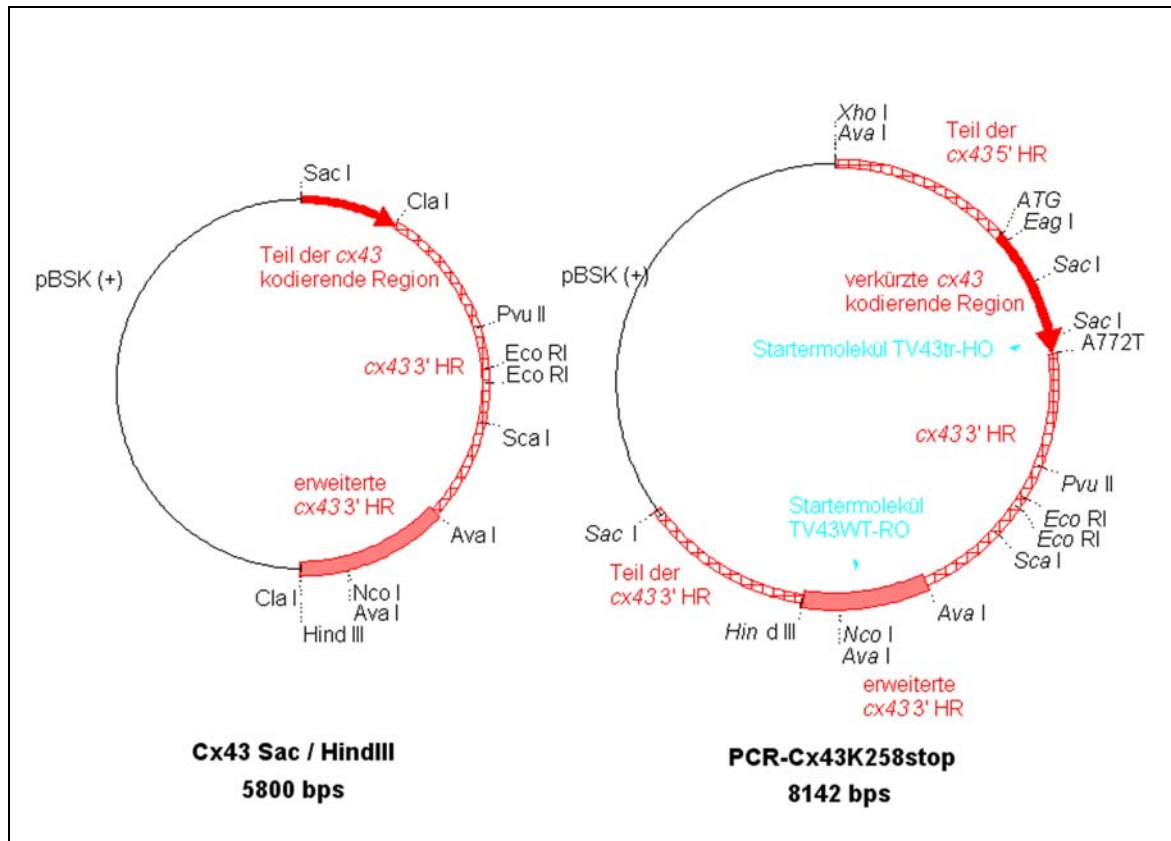
Plasmid-Karte 3: *G143 und *G143*::Cx43trunk***

*G143** besitzt gegenüber dem ursprünglichen Plasmid *G143* (G. Schwarz) keine *Eag* I Erkennungsstelle am Übergang zwischen *cx43* 3' untranslatierter Region und pBSK (+) Vektorrückgrat. Die Passagier-DNS besteht aus 3,1 kb genomischer *cx43* Sequenz. Sie beinhaltet den unveränderten Intron-Exon II Übergang, die gesamte kodierende Region des *cx43* Gens und ca 1 kb 3' untranslatierte Region des Exon II. *G143*::Cx43trunk* beinhaltet demgegenüber nur die verkürzte kodierende Region des *cx43* Gens. Kodon 258 ist durch Einbringen einer A zu T Transversion in ein Stop-Kodon umgewandelt worden. UTR: untranslatierte Region.



Plasmid-Karte 4: *Cx43 target.2* und *Cx43K258stop***

*Cx43target.2*** kann im Gegensatz zum ursprünglichen Vektor *Cx43target.2* (Plum et al., 2000) mittels *Not* I linearisiert werden. Zudem wurde die *Xho* I Erkennungsstelle am Übergang zwischen *cx43* 3' homologer Region und Vektorrückgrat entfernt. *Cx43K258stop* hat im Gegensatz zu *Cx43target.2*** den vollständigen *cx43* Intron-Exon II Übergang. Der Vektor beinhaltet neben 6,6 kb zum *cx43* Locus homologer Sequenzen zusätzlich die verkürzte *cx43* kodierende Region. HR: homologe Region



Plasmid-Karte 5: *Cx43 Sac I / Hind III* und *PCR-Cx43K258stop*

Cx43 Sac I / Hind III beinhaltet eine gegenüber der Sequenz im Zielgenvektor *Cx43K258stop* verwendeten *cx43* 3' homologen Region um ca. 800 bp erweiterte *cx43* 3' untranslatierte Region des *cx43* Exon II. Der gesamte *cx43* 3' Bereich wird in den Vektor G143*::*Cx43trunk* eingebracht. Dies ergibt den PCR-Testvektor *PCR-Cx43K258stop*. Eingezeichnet ist auch die Lage der für die PCR-Reaktion verwendeten Startermoleküle TV43tr-HO und TV43WT-RO. HR: homologe Region;

5' CATCAATTTA CAGTCTACAA TCACTGAGTT GTTTTCGTGG TTTTTGTTTT
TGTTTTTCTT AGGAGGTGCC CAGACATGGG TGACTGGAGC GCCTTGGGGA
AGCTGCTGGA CAAGGTCCAA GCCTACTCCA CGGCCGGAGG GAAGGTGTGG
CTGTCGGTGC TCTTCATTTT CAGAATCCTG CTCCTGGGGA CAGCGGTTGA
GTCAGCTTGG GGTGATGAAC AGTCTGCCTT TCGCTGTAAC ACTCAACAAC
CCGGTTGTGA AAATGTCTGC TATGACAAGT CCTTCCCAT CTCTCACGTG
CGCTTCTGGG TCCTTCAGAT CATATTCGTG TCTGTGCCCA CACTCCTGTA
CTTGGCTCAC GTGTTCTATG TGATGAGAAA GGAAGAGAAG CTGAACAAGA
AAGAAGAGGA GCTCAAAGTG GCGCAGACCG ACGGGGTCAA CGTGGAGATG
CACCTGAAGC AGATTGAAAT CAAGAAGTTC AAGTATGGGA TTGAAGAACA
CGGCAAGGTG AAGATGAGAG GTGGCCTGCT GAGAACCTAC ATCATCAGCA
TCCTCTTCAA GTCTGTCTTC GAGGTGGCCT TCCTGCTGAT CCAGTGGTAC
ATCTATGGGT TCAGCCTGAG TGCGGTCTAC ACCTGCAAGA GAGATCCCTG
CCCCCACCAG GTGGACTGCT TCCTCTCACG TCCCACGGAG AAAACCATCT
TCATCATCTT CATGCTGGTG GTGTCCTTGG TGTCTCTCGC TCTGAATATC
ATTGAGCTCT TCTATGTCTT CTTCAAGGGC GTTAAGGATC GCFTGAAGGG
AAGAAGCGAT CCTTACCACG CCACCACCGG CCCCTGAGC CCATCCTAAAT

CG

<u>Grün unterlegt:</u>	<i>cx43</i> Intronbereich
<u>Blau unterlegt:</u>	3' untranslatierte <i>cx43</i> Region von Exon II
<u>Gelb unterlegt:</u>	verkürzte kodierende Region von <i>cx43</i>
<u>Doppelt unterstrichen:</u>	Referenzbereich für Überlappung mit Sinnstrang-Sequenzierung
Nicht farbig unterlegt:	über PCR-Mutagenese eingebrachtes Stop-Codon; darin in roter Schrift die eingebrachte Basensubstitution
<u>Einfach unterstrichen:</u>	Übergang zwischen verkürzter kodierender <i>cx43</i> Sequenz und 3' untranslatierter Region über endogene / über PCR-Mutagenese eingefügte <i>Cla</i> I-Restriktionserkennungsstelle

Kommerzielle Sinnstrang-Sequenzierung des Zielgenvektors *Cx43K258stop* durch MWG

5´ **CCACCTCCAC** **GGGAACGAAA** **TGAACACCCC** **AGGTGCACGT** **TCTGCAAGCA**
CCCTTTTTTTT **TCTCCTCCAC** **AATCGATTAG** **GATGGGCTCA** **GTGGGCCGGT**
GGTGGCGTGG **TAAGGATCGC** **TTCTTCCCTT** **CACGCGATCC** **TTAACGCCCT**
TGAAGAAGAC **ATAGAAGAGC** **TCAATGATAT** **TCAGAGCGAG** **AGACACCAAG**
GACACCACCA **GCATGAAGAT** **GATGAAGATG** **GTTTTCTCCG** **TGGGACGTGA**
GAGGAAGCAG **TCCACCTGGT** **GGGGGCAGGG** **ATCTCTCTTG** **CAGGTGTAGA**
CCGCACTCAG **GCTGAACCCA** **TAGATGTACC** **ACTGGATCAG** **CAGGAAGGCC**
ACCTCGAAGA **CAGACTTGAA** **GAGGATGCTG** **ATGATGTAGG** **TTCTCAGCAG**
GCCACCTCTC **ATCTTCACCT** **TGCCGTGTTT** **TTCAATCCCA** **TACTTGAACT**
TCTTGATTTT **AATCTGCTTC** **AGGTGCATCT** **CCACGTTGAC** **CCCGTCGGTC**
TGCGCCACTT **TGAGCTCCTC** **TTCTTTCTTG** **TTCAGCTTCT** **CTTCCTTTCT**
CATCACATAG **AACACGTGAG** **CCAAGTACAG** **GAGTGTGGGC** **ACAGACACGA**
ATATGATCTG **AAGGACCCAG** **AAGCGCACGT** **GAGAGATGGG** **GAAGGACTTG**
TCATAGCAGA **CATTTTCACA** **ACCGGGTTGT** **TGAGTGTTAC** **AGCGAAAGGC**
AGACTGTTCA **TCACCCCAAG** **CTGACTCAAC** **CGCTGTCCCC**

Gelb unterlegt: verkürzte kodierende Region von *cx43*

Doppelt unterstrichen: Referenzbereich für Überlappung mit Sinnstrang-Sequenzierung

Nicht farbig unterlegt: über PCR-Mutagenese eingebrachtes Stop-Codon; darin in roter Schrift die eingebrachte Basensubstitution

Einfach unterstrichen: Übergang zwischen verkürzter kodierender *cx43* Sequenz und 3' untranslatierter Region über endogene / über PCR-Mutagenese eingefügte *Cla I*-Restriktionserkennungsstelle

Blau unterlegt: 3' untranslatierte *cx43* Region von Exon II

Kommerzielle Gegenstrang-Sequenzierung des Zielgenvektors *Cx43K258stop* durch MWG

Klonnummer	Ursprung (Nummer der Unterchargen- Selektionsplatte - Klonnummer)	Isoliert am (48-Well)	PCR am (24-Well)	Eingefroren am (T25)	Passage
4	α 2-01	23.03.00	31.03.00	15.04.00	38
13	α 3-05	23.03.00	31.03.00	08.04.00	36
14	α 4-01	23.03.00	31.03.00	15.04.00	38
17	α 4-04	23.03.00	31.03.00	15.04.00	38
21	α 6-01	23.03.00	31.03.00	15.04.00	38
24	α 6-04	23.03.00	31.03.00	15.04.00	38
25	α 6-05	23.03.00	31.03.00	11.04.00	36
29	α 8-02	23.03.00	31.03.00	08.04.00	36
31	α 8-04	23.03.00	31.03.00	08.04.00	36
41	β 2-04	23.03.00	31.03.00	08.04.00	36
49	β 6-01	23.03.00	31.03.00	15.04.00	38
51	β 7-02	23.03.00	31.03.00	08.04.00	36
60	β 10-05	23.03.00	31.03.00	15.04.00	38
63	γ 2-02	23.03.00	31.03.00	08.04.00	36
93	δ 3-04	23.03.00	31.03.00	15.04.00	38
95	δ 4-01	23.03.00	31.03.00	15.04.00	38
103	δ 5-04	23.03.00	31.03.00	15.04.00	38
108	δ 6-02	23.03.00	31.03.00	15.04.00	38
113	δ 6-07	23.03.00	31.03.00	15.04.00	38
123	δ 10-02	23.03.00	31.03.00	15.04.00	38
199	β 3-04	27.03.00	04.04.00	20.04.00	39
214	α 3-06	27.03.00	04.04.00	15.04.00	38
236	δ 3-07	27.03.00	04.04.00	20.04.00	39
241	ϵ 10-01	27.03.00	04.04.00	17.04.00	37
244	ϵ 5-02	27.03.00	04.04.00	15.04.00	37
247	ϵ 4-03	27.03.00	04.04.00	15.04.00	37
253	ϵ 9-02	27.03.00	04.04.00	15.04.00	37
255	ϵ 3-02	27.03.00	04.04.00	20.04.00	39
269	π 3-01	27.03.00	04.04.00	20.04.00	39
285	π 7-02	27.03.00	04.04.00	15.04.00	38
288	π 6-03	27.03.00	04.04.00	20.04.00	39

Tabelle der mittels 6-Thioguanin-Selektion isolierten und PCR-positiven ES-Zellklone

Grau unterlegt sind ES-Zellklone, die hinsichtlich ihres Karyotyps analysiert wurden. Als Unterchargen wurden die direkt nach der Elektroporation getrennt voneinander kultivierten ES-Zellansätze bezeichnet ($\alpha - \pi$). Teile dieser Ansätze wurden nach 6 Tagen jeweils auf 10 Selektionsplatten aufgeteilt (z.B. α 1 - α 10). Isolierte 6-Thioguanin positive ES-Zellklone wurden entsprechend nach ihrer Selektionsschale und in der Reihenfolge der Isolierung bezeichnet (Untercharge, z.B. γ 2-02) sowie insgesamt in der Reihenfolge der Isolierung (Zeitpunkt der Isolation, z.B. #63)

Curriculum vitae

Geburtsdatum: 22. April 1974
 Geburtsort: London
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig



kmaass@yahoo.com

01.01.2000 – 31.12.2003	Wissenschaftliche Angestellte der Universität Bonn; Promotion
01.07.1999 – 31.12.1999	Stipendiantin des SFB 286 Graduiertenkollegs der Universität Bonn
01.05.1998 – 30.04.1999	Diplomarbeit im Institut für Genetik, Abteilung Molekulargenetik
April 1998	Diplomprüfung in den Fächern Genetik, Zellbiologie und Biochemie (1,1)
Dezember 1995	Vordiplomprüfung in den Fächern Genetik, Zellbiologie, Zoologie und Botanik (1,1)
WS 1993/94	Studienbeginn des Diplomstudiengangs Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn
Juni 1993	Abiturprüfung (1,6) Hauptfächer: Mathematik und Biologie
August 1984 – Juni 1993	Amos-Comenius-Gymnasium, Bonn-Bad Godesberg
August 1980 – Juni 1984	Gemeinschaftsgrundschule Wachtberg-Berkum
August 1979 – Juni 1980	Besuch der Vorschulklasse (Deutsche Schule London)
Herbst 1977 – Sommer 1979	Ibstock Place School, London

Veröffentlichungen

Maass,K, Ghanem,A, Kim,J.S., Saathoff,M., Urschel,S.,Kirfel,G., Grümmer,R., Kretz,M., Lewalter,T., Tiemann;K., Winterhager,E.,Herzog,V., Willecke,K.. Defective epidermal barrier in neonatal mice lacking the C-terminal region of connexin43. Mol.Biol.Cell. **in Revision**

Gellhaus,A., Dong,X., Propson,S., Maass,K., Klein-Hitpass,L., Kibschull,M., Traub,O., Willecke,K., Perbal,B., Lye,S.J., Winterhager,E. (2004). Connexin43 interacts with NOV: A possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. J.Biol.Chem. **in Druck**

Bry,C., Maass,K., Miyoshi,K., Willecke,K., Ott,T., Robinson,G.W., Hennighausen,L. (2004). Loss of connexin 26 in mammary epithelium during early but not during late pregnancy results in unscheduled apoptosis and impaired development. Dev.Biol. 267, 418-429.

Posterpräsentationen und Vorträge

Karen Maass, Alexander Ghanem, Jung-Sun Kim, Gregor Kirfel , Markus Kretz, Peter Nielsen, Klaus Tiemann and Klaus Willecke. C-terminal truncation of the connexin43 protein leads to epidermal abnormalities and frequent postnatal lethality in mice
International Gap Junction Conference
23.-28. August 2003, Cambridge, GB

Karen Maass, Jung-Sun Kim, Markus Kretz, Peter Nielsen and Klaus Willecke. C-terminal truncation of the connexin 43 protein leads to epidermal abnormalities and frequent postnatal lethality in mice
7. jährliches Treffen des Bonner Forum Biomedizin
22.-23. März 2003; Walberberg

Maass, K.
The dominant Cx43K257stop connexin43 mutation leads to skin abnormalities and
Annual meeting of the Deutsche Gesellschaft für Zellbiologie und Entwicklungsbiologie
27. März 2003; Bonn

Maass, K.
Generation and Analysis of mice expressing C-terminally truncated Cx43
EC Consortium final meeting
13. Februar 2003, Utrecht, Niederlande

Maass, K.
Truncation of the C-terminal domain of connexin43 leads to skin abnormalities and strongly reduced viability in mice
6. jährliches Treffen des Bonner Forum Biomedizin
3. März 2002; Walberberg (Posterpreis)

Maass, K.

Truncation of the C-terminal domain of Connexin43 leads to skin abnormalities and strongly reduced viability in mice

Graduiertenkolleg des SFB 286

14. Juli 2002, Bonn

Maass, K.

The tale of the tailless Cx43

Treffen des EC Consortium

14. Februar 2002, London, GB

Maass, K.

Generation and analysis of mice with mutations in the connexin43 gene

Graduiertenkolleg des SFB 286

6. Juni 2000, Bonn

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 Dissertation eingereicht wurde.

Karen Maaß

Bonn, im Juli 2004

CD der vorliegenden Arbeit (pdf und Videodateien der Herzechokardiographien)