

Herstellung von Austauschvektoren zur Erzeugung  
von Mäusen, die die Fusionsproteine  
Connexin45-CFP oder  
Connexin45-GFP ausprägen.

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Carsten Euwens

aus

Goch

Bonn, 2006

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

Erscheinungsjahr 2007

1. Referent: Prof. Dr. Klaus Willecke
2. Referent: Prof. Dr. K.H. Scheidtmann

Tag der Promotion: 19.04.2007



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich während dieser Zeit hilfreich unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei folgenden Personen:

Herrn Prof. Dr. Klaus Willecke danke ich für die Bereitstellung dieser interessanten Fragestellung, seiner Unterstützung und der Ermöglichung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Meinen Eltern danke ich für ihre moralische und finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte an dieser Stelle Ilonka Bonrath und vielen meiner Freunde danken, die mich stets unterstützt und motiviert haben.

Ebenso möchte ich meiner Freundin Stefanie Blumenberg danken, die mich während der Fertigstellung dieser Arbeit immer unterstützt hat.

Ebenfalls möchte ich Dr. Joachim Degen und Julia von Maltzahn danken, die mir mit ihrer fachlichen Unterstützung und mit zahlreichen praktischen und theoretischen Tipps sowie praktischer Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben.

Und zuletzt möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik danken, die immer zu schneller und aufbauender Hilfe bereit waren und damit auch nicht unerheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Connexine, Connexone und Gap Junctions.....	7
1.1.1	Allgemeine Strukturen der Connexone und Gap Junctions .....	8
1.1.2	Connexine.....	10
1.1.2.1	Aufbau der Connexin Gene.....	11
1.1.2.2	Struktur und Topologie der Connexin Proteine .....	11
1.2	Funktion und Regulation von Gap Junction Kanälen.....	13
1.3	Connexin 36.....	15
1.4	Connexin 45.....	16
1.5	Fusionsproteine aus Connexinen und eGFP oder eCFP.....	18
1.6	BAC Vektoren.....	18
1.6.1	Generelle Strategie für die gezielte Modifikation von BAC Vektoren .....	19
1.7	Erzeugung transgener Tiere.....	21
1.7.1	Erzeugung gezielter Genveränderungen durch homologe Rekombination.....	22
1.7.2	Erzeugung einer Genveränderung durch Vorkerninjektion.....	22
1.7.3	Konditionale Ausschaltung von Gensequenzen mit Hilfe des flp/frt Sytems... 23	
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit.....	25
2	Material.....	26
2.1	Chemikalien.....	26
2.2	Allgemeine Lösungen.....	26
2.2.1	Lösungen für die Bakterienkultur.....	26
2.2.2	Lösungen für die Nukleinsäure-Analytik.....	28
2.2.3	Lösungen für die Zellkultur.....	30
2.2.4	Fertige Lösungen.....	33
2.3	Materialien.....	33
2.3.1	Allgemeine Labormaterialien.....	33
2.3.2	Geräte.....	34
2.3.3	Reagenziensätze (Kits).....	34
2.3.4	Plasmide.....	35
2.3.5	Größenstandards.....	36
2.3.6	Bakterienstämme.....	36
2.3.7	Eukaryotische Zell-Linien.....	36
2.3.8	Startermoleküle (Oligonukleotid-Primer).....	37
2.3.9	Antikörper.....	37
2.3.10	BAC DNS Bibliothek.....	38
2.3.11	BAC Vektoren.....	38
3	Methoden.....	39
3.1	Nukleinsäure Präparationen.....	39
3.1.1	Plasmid Präparationen aus Bakterien.....	39
3.1.1.1	Schnelle Plasmid Mini Präparation.....	39
3.1.1.2	Plasmid Midi Präparation.....	40
3.1.1.3	Endotoxinfreie Plasmid Maxi Präparation.....	40
3.1.1.4	Isolierung genomischer DNS aus embryonalen Stammzellen für PCR.....	40
3.1.1.5	Isolierung genomischer DNS aus embryonalen Stammzellen für Southern Blot.....	41

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	41
3.1.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	41
3.1.2.2 Konzentrationsabschätzung im Gel.....	42
3.2 Arbeiten zur Herstellung rekombinanter Plasmide.....	42
3.2.1 Gewinnung der gewünschten DNS-Fragmente.....	42
3.2.1.1 Partielle Spaltung von Plasmiden.....	42
3.2.1.2 Elution von DNS-Fragmenten aus dem Gel.....	43
3.2.2 Modifikationen und Ligation von DNS-Molekülen.....	43
3.2.2.1 Auffüllen adhäsiver Enden (blunten).....	43
3.2.2.2 Dephosphorylierung von Vektorrückgraten.....	43
3.2.2.3 Ligation von DNS-Fragmenten.....	44
3.2.3 Transformation.....	44
3.2.3.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien (Standard Methode).....	44
3.2.3.2 Herstellung hocheffizienter transformationskompetenter Bakterien.....	45
3.2.3.3 Transformation in XL-1 blue E. coli Bakterien.....	46
3.3 Zellkultur.....	46
3.3.1 HM1 embryonale Stammzellen der Maus.....	46
3.3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen.....	46
3.3.1.2 Stabile Transfektion zur homologen Rekombination.....	47
3.3.1.3 Selektion auf stabile Integration und homologe Rekombination.....	48
3.3.1.4 Karyotypanalyse homolog rekombinierter ES-Zellklone.....	49
3.3.2 Zellkultur von HeLa-Zellen.....	50
3.3.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen.....	50
3.3.2.2 Transiente Transfektion mit Hilfe der Calciumphosphat-Präzipitation.....	51
3.3.2.3 Stabile Transfektion mit Hilfe der Calciumphosphat-Präzipitation.....	51
3.4 Analysen transgener Zellen.....	52
3.4.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	52
3.4.2 Genotypisierung von ES-Zellen .....	52
3.4.2.1 Southern-Blot Hybridisierung.....	52
3.4.2.2 Gewinnung von Membranen mit immobilisierter DNS für radioaktiven Southern Blot .....	53
3.4.2.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden.....	53
3.4.3 Nachweise von Proteinen.....	55
3.4.3.1 Immunfluoreszenz-Analysen.....	55
3.4.3.2 Direkter Nachweis von Fusionsproteinen mit eCFP oder GFP.....	55
3.5 BAC Klonierung.....	56
3.5.1 Durchführung der homologen Rekombination in BACs.....	56
3.5.1.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien speziell für die Transformation von BAC beinhaltenden Bakterien.....	56
3.5.1.2 Herstellung der Co-Integrate und deren Identifizierung.....	56
3.5.1.3 Auflösung der korrekt entstandenen BACs.....	57
3.5.1.4 Gewinnung von Membranen mit immobilisierter DNS für Southern Blot mit DIG markierten Sonden.....	58
3.5.1.5 Überprüfung der BAC DNS Bibliothek.....	59
3.5.1.6 Hybridisierung mit DIG markierten Sonden.....	59
3.5.1.7 Nachweis der Sonde nach Hybridisierung mit DIG markierter Sonde.....	60
3.5.1.8 DNS Maxipräparation von BAC DNS.....	61
3.5.1.9 Caesium Chlorid Gradienten Zentrifugation.....	61
3.5.1.10 Puls-Feld Gel Elektrophorese zur Auftrennung großer DNS Fragmente ..	62

4 Ergebnisse.....	64
4.1 Klonierung des Vektors pCx36_CFP .....	64
4.1.1 Klonierung des Vektors pmj-cyan.....	65
4.1.2 Klonierung des Vektors pmj_cyan_Cx36Ex2.....	66
4.1.3 Klonierung pmj_cyan_Cx36Ex2_3UTR.....	67
4.1.4 Klonierung pCx36_CFP.....	68
4.2 Klonierung des Vektors pSV_45GFP für die homologe Rekombination in E.coli Bakterien .....	70
4.2.1 Klonierung des Vektors pmj_45Ex3.....	70
4.2.2 Klonierung des Vektors pmj_Cx45cyan_transbac.....	71
4.2.3 Klonierung des Vektors pmj_45_gfp_transbac.....	72
4.2.4 Klonierung des Vektors pSV_45_GFP.....	74
4.3 Klonierung des Vektors KI45_CFP für die homologe Rekombination in ES-Zellen... 76	
4.3.1 Klonierung des Vektors pmj_45_cyan_3kut.....	77
4.3.2 Klonierung des Vektors pmj_45cyan_3kut_rans2.xba.....	78
4.3.3 Klonierung des Vektors pCx45.....	79
4.3.4 Klonierung des Vektors pmj_45cyan_3kut+45_2,7.....	80
4.3.5 Klonierung des Vektors PKImCx45CFP_ohne_Neo.....	82
4.3.6 Klonierung des Vektors 45CFP_PCR_Test.....	83
4.3.7 Klonierung des Vektors KI_45CFP.....	84
4.4 Klonierung des Hela Testvektors 45cfp_helatest4 (HT4).....	86
4.4.1 Klonierung des Vektors 45cfp_helatest2.....	86
4.4.2 Klonierung des Vektors 45cfp_helatest3.....	87
4.4.3 Klonierung des Vektors 45cfp_helatest4.....	88
4.5 Homologe Rekombination von psv_45GFP und einem BAC Vektor in E.coli Bakterien .....	90
4.5.1 BAC Filter Durchmusterung („Screening“.....)	90
4.5.2 Southern Blot Hybridisierungstest mit den identifizierten Klonen.....	91
4.5.3 PCR Test der BAC Vektoren auf Position der Cx45 Sequenz innerhalb des BAC Vektors.....	92
4.5.4 BAC - Homologe Rekombination Schritt 1.....	93
4.5.5 BAC - Homologe Rekombination Schritt 2.....	94
4.5.6 Aufreinigung des BAC Vektors .....	96
4.6 Herstellung von HeLa Zellen zur stabilen Expression des Fusionsproteins aus Connexin45 und eCFP.....	97
4.6.1 HeLa Zellen mit exprimiertem Cx45-eCFP.....	97
4.6.2 Immunfluoreszenzuntersuchung der Cx45-CFP positiven HeLa Zellen.....	98
4.7 Herstellung embryonaler Stammzellen mit gezielt mutiertem Cx45-Allel durch homologe Rekombination des Austauschvektors pCx45_CFP.....	101
4.7.1 Etablierung einer Test PCR zur schnellen Überprüfung einer erfolgten homologen Rekombination.....	101
4.7.2 Erzeugung und Überprüfung der homolog rekombinierten ES-Zellen.....	102
4.7.3 Charakterisierung der ES-Zellen auf genomischer Ebene.....	102
4.7.4 Charakterisierung auf funktioneller Ebene.....	104
5 Diskussion.....	107
5.1 Klonierung des Vektors pCx36_CFP.....	109
5.2 Klonierung des Vektors BAC 45-GFP.....	109
5.3 Klonierung des Vektors KI45_CFP.....	111

---

5.4 Erzeugung stabiler HeLa Cx45-CFP Zellen.....	112
5.5 Erzeugung homolog rekombinierter Cx45-CFP ES-Zellen.....	113
5.6 Ausblick.....	114
6 Zusammenfassung.....	116
7 Literatur.....	117
8 Anhang.....	130
9 Lebenslauf.....	137



# Abkürzungen

AK	Antikörper	LB	Luria-Bertani
AS	Aminosäuren	LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
Amp	Ampizillin	Lsg.	Lösung
ATP	Adenosintriphosphat	LSM	Laser Scan Mikroskop
BAC	Bacterial Artificial Chromosome	M	Molar (mol/l)
bp	Basenpaare	µg	Mikrogramm (10 <sup>-6</sup> g)
CFP	Cyan (blau) fluoreszierendes Protein	µl	Mikroliter (10 <sup>-6</sup> l)
cm	Zentimeter	µm	Mikrometer (10 <sup>-6</sup> m)
CMV	Encephalomyokarditis Virus	mA	Milliamper
Cx	Connexin	min	Minuten
ddH <sub>2</sub> O	Zweimal destilliertes Wasser	ml	Milliliter
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium	mM	Millimolar
DMSO	Dimethylsulfoxid	mV	milliVolt
DNS	Desoxyribonukleinsäure	NaAc	Natrium Acetat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	NaOH	Natronlauge
<i>E.coli</i>	Escherichia Coli	NCS	Neugeborenen Kälberserum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	ng	Nanogramm
eGFP	Verstärkt grün leuchtendes Protein	nm	Nanometer
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen (der Maus)	PBS	Phosphat gepufferte isotonische Salzlösung
EtBr	Ethidiumbromid	PCR	Polymerase Kettenreaktion
EtOH	Ethanol	pg	Pikogramm
FCS	Fötale Kälberserum	pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
fg	Femtogramm 10 <sup>-15</sup> g	RNase	Ribonuklease
°C	Grad Celsius	RNS	Ribonukleinsäure
g	Gramm	RT	Raumtemperatur
h	Stunde	sec	Sekunde
IF	Immunfluoreszenz	SDS	Natriumdodecylsulfat; Laurylsulfat
kb	Kilobasen	SSC	Natriumzitroneisäuresalz Puffer
kDa	Kilo Dalton	tet	Tetrazyklin



l	Liter	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Enzym Aktivitätseinheit		
ÜN	Über Nacht		
Upm	Umdrehungen pro Minute		
UTR	Untranslatierte Region		
UV	Ultraviolettes Licht		
V	Volt		
WT	Wildtyp		
ZK	Zellkultur		

# 1 Einleitung

Die meisten Zellen vielzelliger Organismen sind in Zellverbänden von Geweben organisiert. Die verschiedenen Gewebearten sind wiederum zu größeren Funktionseinheiten, den Organen, verbunden. Die Aufrechterhaltung der Homeostase dieser vielzelligen Organismen setzt eine zielgerichtete intra- und interzellulär spezifische Regulation morphologisch und funktionell unterschiedlicher Gewebe voraus. Im Laufe der Evolution haben sich spezialisierte Strukturen von Zellverbindungen entwickelt, die nach ihrer Funktion eingeteilt werden. Diese Strukturen sind zum einen Haftverbindungen, (Desmosomen) zum anderen Abschlussverbindungen (Tight Junctions) sowie kommunizierende Verbindungen (Gap Junctions; „Lückenverbindungen“ nach engl. „gap“ „Lücke“ und engl. „junction“ „Verbindung“; (Revel und Karnovsky, 1967)).

## 1.1 Connexine, Connexone und Gap Junctions

Der direkte Austausch von Molekülen über Zellkanäle findet sich in großer Anzahl in vielen verschiedenen Geweben und praktisch bei allen Tierarten. Diese Kontaktzone zweier Zellen stellt spezialisierte Membranstrukturen dar, die aus kanalbildenden Proteinmolekülen bestehen. Diese Proteine verbinden die zytoplasmatischen Kompartimente der Zellen direkt miteinander. Über diese Verbindung können anorganische Ionen und Metabolite von einer Zelle in benachbarte Zellen gelangen. Auf diese Weise wird eine elektrische, metabolische wie auch eine Signalkopplung erreicht.

Die Zell-Zell-Kanäle der Vertebraten (Gap Junctions) werden aus Connexin-Proteinen gebildet, bei Invertebraten tragen die Innexine zur Zellkommunikation bei, die wahrscheinlich durch konvergente Evolution entstanden sind und deren Aufbau und Funktion den Connexinen der Vertebraten ähnlich ist (Phelan und Starich, 2001). Bei den Vertebraten existieren zusätzlich Pannexine, die den Innexinen sehr ähnlich sind (Panchin et al., 2000; Bruzzone et al., 2003). Im Folgenden werden nur die aus Connexin-Proteinen bestehenden Gap Junctions der Säugetiere behandelt.

### 1.1.1 Allgemeine Strukturen der Connexone und Gap Junctions

Die ersten Hinweise auf die Zellkopplung stammten von elektrophysiologischen Untersuchungen an spezifischen Paaren interagierender Nervenzellen im Rückenmark des Flusskrebsses. Die Messung der elektrischen Kopplung dieser benachbarten Riesenneuronen wurde zuerst von Fursphan und Potter 1959 durchgeführt (Fursphan und Potter 1959). Gap Junctions erlauben Zellen durch interzelluläre Diffusion den Austausch polarer, geladener und ungeladener Moleküle bis zu einer molekularen Masse von 1,8 kDa (Neijssen et al., 2005). Geprägt wurde der Begriff der Gap Junctions durch Revel und Karnovsky, die zuerst zeigten, dass sich im elektronenmikroskopischen Bild der Abstand zwischen zwei benachbarten Plasmamembranen im Bereich der Gap Junctions von 20-30 nm auf 2-3 nm verengt (Revel und Karnovsky, 1967), wodurch der optische Eindruck einer Lücke (engl.: gap) in der Kontinuität benachbarter Plasmamembranen entsteht (siehe Abbildung 1A). Ein solcher Spalt kann dabei aus einer Ansammlung von bis zu mehreren tausend Zell-Zell-Kanälen bestehen. Bisher wurden Gap Junctions bei Säugern in allen Geweben nachgewiesen mit Ausnahme von Spermien, Erythro- und Thrombozyten und endgültig differenzierten Skelettmuskeln (Gilula, 1987).

Bei der Ausbildung der Gap Junction Kanäle steuert eine Zelle jeweils einen Halbkanal bei, welcher als Connexon bezeichnet wird. Er hat einen Außendurchmesser von 7-8 nm, ragt 1 nm über die Membran in den Interzellularraum hinaus und beinhaltet eine hydrophile Pore von 2 nm Innendurchmesser, wodurch die Diffusion kleiner Moleküle (cAMP, IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup> etc.) erfolgen kann (Simpson et al., 1977). Ein Connexon besteht aus sechs Proteinuntereinheiten, den Connexinen (Goodenough, 1976).

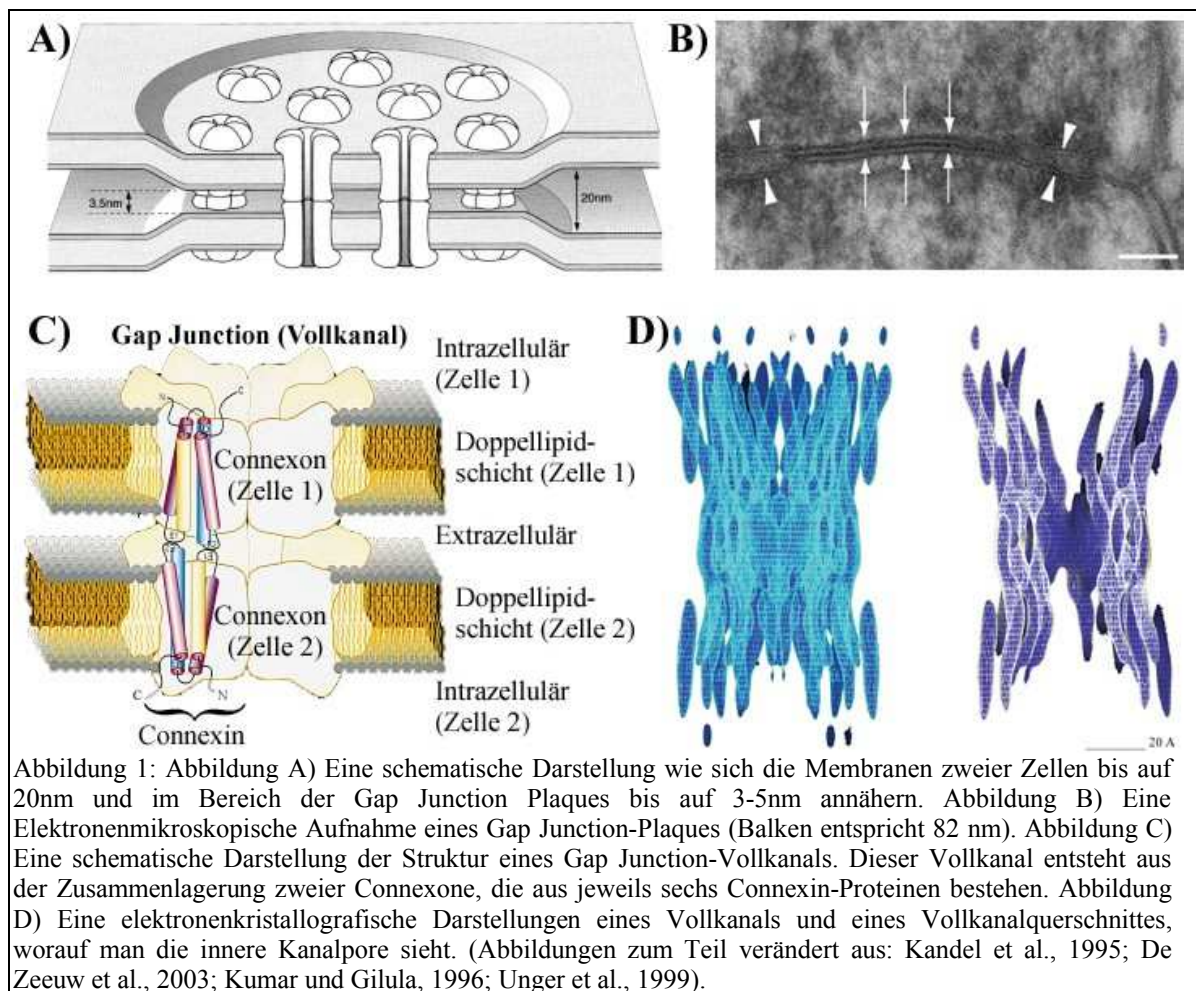
Die intrazelluläre Zusammenlagerung von sechs Connexin-Proteinen zu einem Connexon findet meist im trans-Golgi-Netzwerk statt (Musil und Goodenough, 1993; Evans und Martin 2002; Koval et al. 2006). Nach dem Transport in die Plasmamembran kommt es zu einer engen Aneinanderlagerung zweier Halbkanäle benachbarter Zellen innerhalb des interzellulären Spaltes. Die Kontaktbereiche der Connexon-Halbkanäle bilden die beiden extrazellulären Schleifen der Connexin-Proteine (Kumar und Gilula, 1996). Die konservierten lokalisierten Cysteine der Extrazellulärschleifen der Connexin-Proteine scheinen dabei essentiell für die Bildung funktioneller Kanäle zu sein. Durch Mutageneseexperimente (John und Revel, 1991; Foote et al., 1998), bei denen die

## Einleitung

Cysteinreste ausgetauscht oder versetzt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass diese Cysteinreste intramolekulare Disulfidbindungen zwischen den beiden Extrazellulärschleifen eines Connexins ausbilden, nicht aber intermolekulare Bindungen zwischen den Schleifen zweier Connexine eines Connexons.

Daraus wurde ein Modell entwickelt, nach dem durch ein zahnrad-ähnliches Ineinandergreifen der gegenüberliegenden Schleifen der Gap Junction-Vollkanal entsteht und dadurch stabilisiert wird (Yeager und Nicholson, 1996).

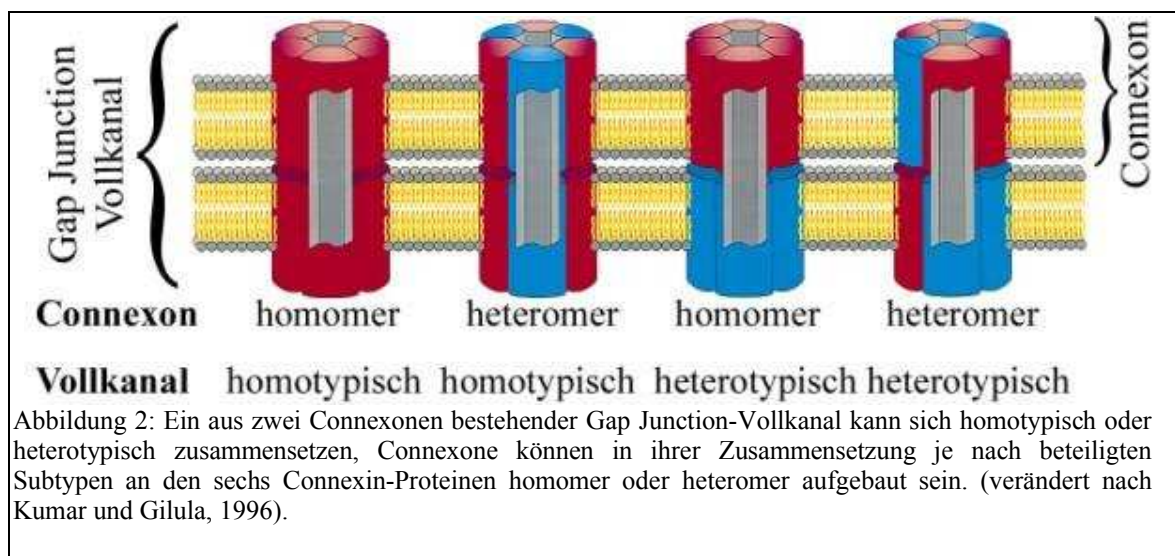
Die zwölf an der Ausbildung eines Vollkanals mit hydrophiler Kanalpore beteiligten Connexin Proteine sind radial angeordnet und in Bezug auf die Kanalachse um  $9^\circ$  bis  $14^\circ$  gekippt (Unwin und Zampighi, 1980).



Wenn ein Gap Junction Kanal aus zwei Connexonen mit unterschiedlichen Connexin Isoformen besteht, spricht man von heterotypischen Kanälen, sind sie aus gleichen Connexin Isoformen aufgebaut, spricht man von homotypischen Kanälen (Kumar und

## Einleitung

Gilula, 1996), siehe auch Abbildung 2. Wenn die einzelnen Halbkanäle wiederum aus unterschiedlichen Connexin Isoformen aufgebaut sind, werden diese als heteromer bezeichnet, sind sie hingegen aus identischen Connexin Isoformen aufgebaut, spricht man von homomeren Connexonen (Risek et al., 1994; Sosinsky 1995). Bedingt durch diese kombinatorische Vielfalt könnten theoretisch sehr viele physiologisch unterschiedliche Einzelkanäle mit jeweils charakteristischen Eigenschaften entstehen. Allerdings wird die Vielfalt begrenzt durch die unterschiedliche Expression der verschiedenen Connexin Isoformen in den unterschiedlichen Körperzellen eines Organismus (Kumar und Gilula, 1996).



### 1.1.2 Connexine

Im Genom der Maus sind derzeit 20 Connexin Gene bekannt, im Genom des Menschen 21, welche zum Großteil bereits charakterisiert wurden (Eiberger et al., 2001; Willecke et al., 2002). Da das humane und das Mausgenom nahezu vollständig sequenziert sind, kann die Identifizierung neuer Connexingene weitgehend als abgeschlossen betrachtet werden. Das mCx23 ist hierbei das kleinste, das mCx57 ist das größte Connexin Protein (Gustincich et al., 2003; Hombach et al., 2004) bezogen auf das theoretische Molekulargewicht der Proteine.

Die Mitglieder der Connexin Genfamilie werden anhand ihres theoretischen Molekulargewichts und der Abkürzung von Cx für Connexin bezeichnet. Zusätzlich dazu existiert eine Nomenklatur für die Herkunft des Connexins, z.B. m für Maus (*mouse*) oder

h für Mensch (*human*) (Beyer et al., 1988). Eine weitere diskutierte Nomenklatur anhand der Sequenzhomologien der Connexin Protein Gruppen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ ) findet hingegen selten Verwendung (Gimlich et al., 1990). In dieser Arbeit wird die Nomenklatur von Beyer et al. (1988) verwendet.

### 1.1.2.1 Aufbau der Connexin Gene

Die meisten Connexin Gene haben einen ähnlichen genomischen Aufbau, wobei es eine Reihe von Abweichungen gibt, so dass man heutzutage nicht mehr von dem ehemals für alle Connexin Gene verallgemeinerten Aufbau ausgehen kann (Willecke et al., 2002). Im Zuge der Sequenzierung des humanen und des Mausgenoms haben sich viele Unterschiede bezüglich der Connexingene herausgestellt. Einige sollen hier skizziert werden.

Die kodierenden Regionen der Connexine Cx36, Cx39 und Cx57 verteilen sich auf zwei Exone (Söhl et al., 1998; von Maltzahn et al., 2004; Hombach et al. 2004). Beim Cx29 wird die zur Translation notwendige Kozak-Konsensus-Sequenz durch einen Spleißvorgang mit dem Exon verknüpft, welches die kodierende Region enthält (Eiberger et al. 2006). Bei mCx32 existieren z.B. drei verschiedene Exon1, die alternativ gespleißt werden (Neuhaus et al., 1995; Söhl et al., 1996, 2001b). Neuere Untersuchungen haben Hinweise geliefert, dass es bei den Connexinen Cx31, Cx40, Cx45, Cx46 und Cx47 nicht nur eine Exon1 Sequenz, sondern 2-4 alternative Exon1 Sequenzen gibt, die an das Exon2 geknüpft werden. Dieses weiteren Exon1 können bis zu 18 kb stromaufwärts der kodierenden Region liegen, wie es bei Cx45 der Fall ist (Anderson und Werner, 2005).

### 1.1.2.2 Struktur und Topologie der Connexin Proteine

Die Topologie der Connexine scheint bei allen Connexinen gleich zu sein, so wie auf Abbildung 3 zu sehen ist. Die Connexin Proteine durchspannen die Plasmamembran mit vier hydrophoben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen und sind hoch konserviert. Sie besitzen zwei extrazelluläre Schleifen und drei zytoplasmatische Domänen. Allerdings weist die dritte Transmembrandomäne durch die Anwesenheit von polaren Aminosäuren, an jeder vierten Position einen deutlich amphiphileren Charakter auf als die anderen drei Transmembrandomänen.

Es wird vermutet, dass diese Domäne den inneren Bereich der hydrophilen Kanalpore

## Einleitung

auskleidet und damit die unterschiedlichen Permeabilitäts-Eigenschaften der Gap Junction-Kanäle beeinflusst (Elfgang et al., 1995), jedoch scheinen auch Abschnitte der anderen Transmembranregionen ebenfalls daran beteiligt zu sein (Skerrett et al., 2002).

Der N-Terminus ist mit ca. 20 Aminosäuren, relativ kurz, die zytoplasmatische Schleife und der C-Terminus variieren hingegen in der Länge (Kumar und Gilula, 1996). Der N-Terminus ist vermutlich an der Regulation der Spannungsabhängigkeit der Gap Junction-

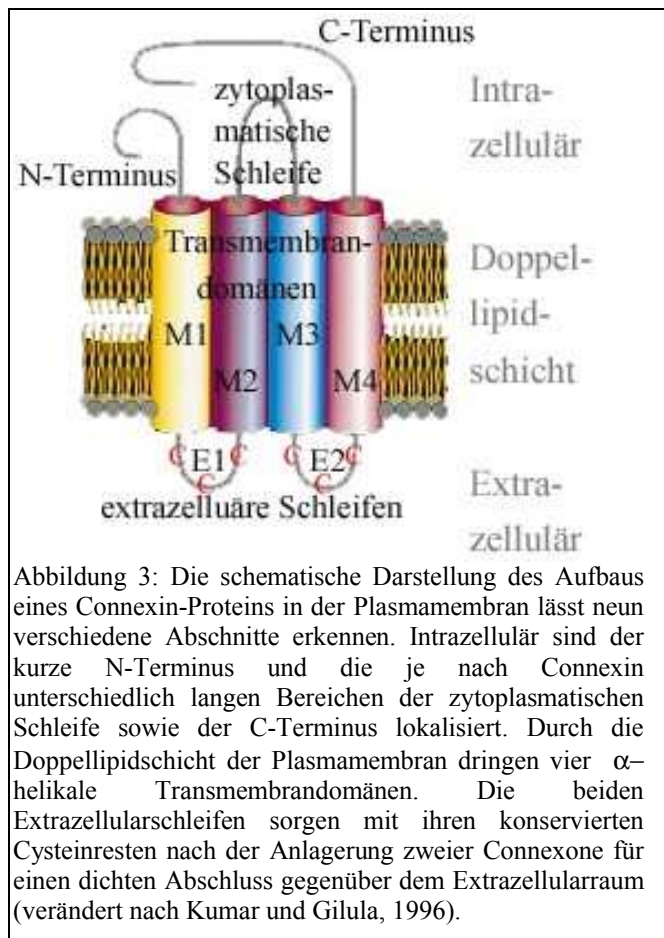


Abbildung 3: Die schematische Darstellung des Aufbaus eines Connexin-Proteins in der Plasmamembran lässt neun verschiedene Abschnitte erkennen. Intrazellulär sind der kurze N-Terminus und die je nach Connexin unterschiedlich langen Bereiche der zytoplasmatischen Schleife sowie der C-Terminus lokalisiert. Durch die Doppellipidschicht der Plasmamembran dringen vier  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen. Die beiden Extrazellulärschleifen sorgen mit ihren konservierten Cysteinresten nach der Anlagerung zweier Connexone für einen dichten Abschluss gegenüber dem Extrazellulärraum (verändert nach Kumar und Gilula, 1996).

Kanäle beteiligt (Harris, 2002). Die zytoplasmatische Schleife und der C-Terminus stellen aufgrund ihrer Heterogenität den eigentlichen Unterschied der verschiedenen Connexine dar. Charakteristisch für Connexin Proteine sind die jeweils drei konservierten Cysteinreste in den beiden extrazellulären Schleifen, die intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden (John und Revel, 1991) und sich durch die Peptidsequenz  $CX_6CX_3C$  für E1 und  $CX_4CX_5C$  für E2 auszeichnen. Dadurch scheinen die einzelnen Connexine stabilisiert zu werden und dabei die hydrophile Pore in den Gap Junction Kanälen gegen den Extrazellulärraum

abzugrenzen. (Foote et al., 1998). Ausnahmen bilden Cx23 (Gustincich et al., 2003) und Cx31 (Hennemann et al., 1992b).



## 1.2 Funktion und Regulation von Gap Junction Kanälen

Die Funktion der Gap Junction Kanäle besteht in der elektrischen, metabolischen und signalvermittelnden Kopplung von Nachbarzellen. Dazu gehört die Erregungsausbreitung im Herzen und im zentralen Nervensystem, außerdem die Kontrolle des Zellwachstums (Yamasaki et al., 1999) und der Karzinogenese (Krutovskikh et al., 2002; Schwarz et al., 2003), genauso wie die Regulation früher Entwicklungsprozesse und der Stoffaustausch in nicht vaskularisierten Geweben (Paul, 1995). Die elektrische Kopplung wurde schon sehr früh beobachtet, etwa zwischen Riesenaxonen des Flußkrebses (Furshpan und Potter, 1959) oder zwischen Zellen isolierter Purkinjefasern des Herzens (Weidmann, 1952). Erreicht wird die elektrische Kopplung über Gap Junctions durch ihre Permeabilität für Ionen. Dadurch können die Aktionspotentiale erregbarer Gewebe übertragen werden, wodurch eine Synchronisation ermöglicht wird. Beim Herzen z.B. wird die synchrone Kontraktion durch die Ausbildung eines funktionellen Synzytiums ermöglicht (Gros und Jongma, 1996), wodurch letztlich der Herzschlag veranlasst wird. Die metabolische Kopplung, der Austausch von Stoffwechselprodukten entlang eines Konzentrationsgefälles, findet man nachweislich in solchen Geweben, die nicht direkt von Blutgefäßen versorgt werden. Bei diesen Stoffwechselprodukten handelt es sich meist um Zucker, Aminosäuren, Vitamine und Nukleinsäurevorstufen (Bennett und Verselis, 1992). Neuere Untersuchungen zeigten auch, daß zum Zweck der Antigenpräsentation nicht nur einzelne Aminosäuren, sondern auch kurze Peptidsequenzen (bis zu 10 Aminosäuren lang) zwischen Immunzellen ausgetauscht werden (Neijssen et al., 2005). Außerdem können auch kurze siRNA Moleküle ausgetauscht werden (Valiunas et al., 2005).

Die Durchlässigkeit der Gap Junctions für Signalmoleküle wie cAMP,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen,  $\text{IP}_3$  (Inositol-1,4,5-trisphosphat) (Sáez et al., 1989, 2003; Niessen et al., 2000) oder  $\text{NAD}^+$  (Nikotinamidadenindinukleotid) (Bruzzone et al., 2001) ermöglicht eine synchrone und koordinierte Antwort eines Zellverbandes auf eine extrazelluläre Stimulation einer Zelle. Beobachtbar sind auch Kalziumwellen, die zum einen auf der direkten Ausbreitung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beruhen, zum anderen auf der indirekten Ausbreitung durch Öffnung intrazellulärer Kalziumspeicher durch  $\text{IP}_3$  (Saéz et al., 1998).

## Einleitung

Bei der Embryogenese von Vertebraten sind ebenfalls Gap Junctions beschrieben worden, wie z.B. schon während des 8-Zell Stadiums bei der embryonalen Entwicklung der Maus (Valdimarsson und Kidder, 1995). Da im Laufe der Entwicklung die Gap Junctions auf bestimmte Zellgruppen begrenzt werden, kann so eine Kompartimentierung der Kopplung stattfinden (Levin, 2002). Wie Trosko und Ruch 1998 zeigten, kann eine gestörte Kopplung auch zu unkontrolliertem Wachstum führen und die Tumorentstehung begünstigen.

Die Regulation der Kopplungseigenschaften von Gap Junctions kann über die Verfügbarkeit der Kanäle und über deren Öffnungszustand erfolgen. Da nicht alle homomeren Halbkanäle funktionelle Vollkanäle bilden können (Elfgang et al., 1995), kann auf diese Weise eine Kompartimentierung der Kopplung innerhalb von Zellverbänden stattfinden. Genauso kann der Stoffaustausch asymmetrisch sein, so dass bestimmte Stoffe nur in eine bestimmte Richtung fließen (Brink et al., 1997) und somit als Gleichrichter funktionieren. Da auch Halbkanäle funktionell für einen Austausch mit dem Extrazellularraum sorgen können (Goodenough und Paul, 2003; Sáez et al., 2003), ergeben sich zusammengenommen komplexe Regulationsmöglichkeiten für die interzelluläre Kommunikation.

Die Anzahl der Gap Junction hat ebenfalls Einfluß auf die Regulation der Kopplungseigenschaften einer Zelle, wobei die Verfügbarkeit über Transkription, Stabilität des Transkriptes, Verteilung des Proteins in der Zelle (Atkinson et al., 1995) und die Lebensdauer des Proteins gesteuert wird. Die Halbwertszeit der Connexin Proteine beträgt durchschnittlich zwei-fünf Stunden, der Abbau erfolgt in der Regel ubiquitinabhängig in Lysosomen und Proteasomen (Laird, 1996; Evans und Martin, 2002). Die Kopplung wird weiterhin durch die Zusammensetzung der Gap Junctions durch unterschiedliche Connexine reguliert. Durch Farbstoff-Kopplungsanalysen an transfizierten Säugerzellen (Elfgang et al., 1995) und durch elektrophysiologische Messungen an *Xenopus*-Oozyten (Bennett und Verselis, 1992) wurde gezeigt, dass sowohl eine Größen- als auch Ladungspräferenz für passierende Moleküle und Ionen besteht, die durch die Zusammensetzung der Connexone bewirkt wird.

Der Öffnungszustand der Kanäle wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Ein Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle, verursacht z.B. durch eine Verletzung, führt zum Schließen der Kanäle (Rose und Loewenstein, 1975). Durch die Änderung des pH-

Wertes im Zytoplasma oder im interzellulären Raum (Morley et al., 1997) oder durch Spannung über die Membran (Spray et al., 1991; Brink, 2000) kann sich der Öffnungszustand der Gap Junctions beeinflusst werden. Ebenfalls kann die Phosphorylierung von Connexin Proteinen durch Proteinkinasen (die durch Signalkaskaden reguliert werden) auf die Zusammensetzung zu funktionsfähigen Kanälen oder den Öffnungszustand der Kanäle (Bennett et al., 1991; Sáez et al., 1993, 1998; Yeager und Nicholson, 1996, Cooper und Lampe, 2002) oder auf die Halbwertszeit (Lampe und Lau, 2000) positiv wie negativ auswirken.

### 1.3 Connexin 36

Das Cx36 Gen ist auf dem Chromosom 2 der Maus lokalisiert (Al-Ubaidi et al., 2000) und auf dem Chromosom 15 des Menschen (Belluardo et al., 1999). Das komplette Leseraster von mCx36 (963 bp) ist auf zwei Exone verteilt und wird von einem Intron (1.138 bp) unterbrochen.

Mit Hilfe von Starterverlängerungsexperimenten wurde die Bestimmung des Transkriptions-Startpunktes ermöglicht (Position -520 Söhl, Doktorarbeit 1999; Position -479 Cicirata et al., 2000), wonach das Exon1 aus 520 bp 5'-UTR und 71 bp kodierender Region besteht. Aufgrund der Lage des Terminationssignales der Transkription enthält Exon2 892 bp kodierende Region und 1.427 bp 3'-UTR; die Transkriptlänge der Cx36-mRNS beträgt 2,9 kb (Söhl et al., 1998).

Durch die ungewöhnlich lange zytoplasmatische Schleife (100 AS) und einen relativ kurzen C-Terminus (50 AS) unterscheidet sich das Cx36 von anderen beschriebenen Connexinen. Das Cx36 zeigt außerdem auch funktionelle Abweichungen von anderen Connexinen, wie z.B. die Kopplungseigenschaften der Cx36 Kanäle, welche an hippocampalen Neuronen und transfizierten Kulturzellen untersucht wurden (Srinivas et al., 1999; Teubner et al., 2000). Hierbei wurde beobachtet, daß Cx36 Kanäle eine geringe Spannungsabhängigkeit und eine vergleichbar niedrige Einzelkanal Leitfähigkeit besitzen. Im HeLa Zellkultursystem wurden im Gegensatz zu anderen Connexinen bisher keine funktionellen heterotypischen Kanäle gefunden (Teubner et al., 2000). Expressionsorte des Cx36 wurden bislang ausschließlich in elektrisch erregbaren Zellen wie den Neuronen des ZNS, in  $\beta$ -Zellen des Pankreas und chromaffinen Zellen der Nebenniere beobachtet.

Dass Cx36 vor allem neuronal ausgeprägt wird, zeigten *in situ* Hybridisierungen an Gehirn und Retinaschnitten der Ratte (Condorelli et al., 1998). Weitere Hinweise darauf lieferten Northern-Blot Hybridisierungen mit RNS aus verschiedenen Geweben der Maus (Söhl et al., 1998). Cx36 wird perinatal sehr stark reguliert (Söhl et al., 1998; Belluardo et al., 2000, Gulisano et al., 2000), wobei die Expression ab der dritten Lebenswoche stark abnimmt. Wie elektronenmikroskopische Gefrierbruchanalysen an Gehirn- und Rückenmarkschnitten zeigen konnten, kommt Cx36 in neuronalen Gap Junctions vor (Rash et al., 2000, 2001a, 2001b). Dort sorgen sie wahrscheinlich für eine elektrochemische Kopplung (Bruzzone und Ressot, 1997). Die Cx36-mRNS und das Cx36-Protein wurden unter anderem in Retina, Hippocampus, Rückenmark, Großhirn (Cerebrum), Hypothalamus und Kleinhirn (Cerebellum) sowie in der inferior Olive und dem Riechkolben (Bulbus olfactorius) nachgewiesen. Connexin36 ist an der Ausbildung von Kanälen zwischen Zapfen sowie Zapfen und Stäbchen in der Maus Retina beteiligt (Feigenspan et al., 2004). Homotypische Connexin36 Gap Junction Kanäle befinden sich zwischen den Zapfen OFF Bipolarzellen im Bereich der OPL (Outer Plexiform Layer) (Feigenspan et al., 2004), sowie zwischen AII Amakrinzellen. Heterotypische Kanäle findet man zwischen AII Amakrinzellen und Zapfen ON Bipolarzellen in der IPL (Inner Plexiform Layer) (Feigenspan et al., Mills et al., 2001). Desweiteren wird von Connexin36 die Kopplung zwischen  $\alpha$ -Ganglienzellen vermittelt (Hidaka et al., 2004, Schubert et al., 2005).

## 1.4 Connexin 45

Das Cx45 Gen der Maus auf Chromosom 11 lokalisiert (Schwarz et al., 1992) und besteht aus fünf verschiedenen Exonen (Anderson et al., 2005). Dabei gibt es anscheinend drei alternative Exon1 Sequenzen, von denen das Exon 1b und 1a etwa 17 kb und 18 kb stromaufwärts der kodierenden Region liegen. Das Exon 1c liegt hingegen nur 3,5 kb und das Exon2 1,5 kb stromaufwärts der kodierenden Region. Das Exon3 enthält dabei die komplette kodierende Region des Cx45. Das Cx45 Protein ist 396 Aminosäurereste lang. Cx45 transfizierte HeLa Zellen zeigen nur eine relativ schwache Kopplung nach Injektion eines Farbstoffes, verglichen mit Cx43 transfizierten HeLa Zellen (Elfgang et al., 1994). Cx45/Cx43 doppelt transfizierte Zellen zeigen deutlich veränderte Kanaleigenschaften (Martinez et al., 2002). Die heterotypische Kopplung zwischen Cx45 und Cx43-eGFP

Halbkanälen zeigt eine Asymmetrie hinsichtlich der Farbstoffausbreitung (Bukauskas et al., 2002). Diese Asymmetrie begünstigt einen Farbstofftransfer in die Richtung der Zelle mit dem Cx43 Halbkanal aus der Zelle mit dem Cx45 Halbkanal (Desplantez et al., 2004). Bei der Untersuchung der Hemikanaleigenschaften von Cx45 (Valiunas, 2002) wurde gefunden, dass im  $\text{Ca}^{2+}$  freien Medium Farbstoff abgegeben und aufgenommen wird. Bei der Verwendung von verkürzten C-Termini von Cx45 in HeLa Transfektanten zeigte sich, daß der C-Terminus für die Membranlokalisierung essentiell ist, die Phosphorylierung der Serin-Reste im C-Terminus jedoch darauf keinen Einfluß hat. Allerdings wirkt sich die Phosphorylierung modulierend auf die Kopplungseigenschaften aus (A. Butterweck, Doktorarbeit 1995).

Die Expression des Cx45 wurde mit unterschiedlichen Methoden in vielen Geweben nachgewiesen. In den folgenden Geweben gelang der Nachweis des Cx45 Proteins mit Hilfe von Antikörpern gegen Cx45, auch wenn die Untersuchungen mit Antikörpern aufgrund zum Teil unsensitiver und unspezifischer Antikörper schwierig ist. Expression findet man dabei im Sinusknoten, AV-Knoten und im His-Bündel des reizleitenden System des adulten Herzens (Coppen et al., 1998). Die Expression des Cx45 findet man auch schon am Tag 8,5 der Embryonalentwicklung im primitiven Herzschlauch (Alcolea et al., 1999). Ebenfalls konnte die Expression in der Inneren (IPL) und Äußeren (OPL) plexiformen Schicht der Retina nachgewiesen werden (Güldenagel et al., 2000; Petrasch-Parrwez et al., 2004), in der INL (innere Körnerschicht) und GCL (Ganglienzellschicht) der Retina durch Cx45lacZ Reporterermäuse, sowie in embryonaler Haut und der Niere (Butterweck et al., 1995). Außerdem wird Cx45 in glatten Muskelzellen der Aorta (Ko et al., 2001) und in der glatten Gefäßmuskulatur cerebraler Arterien exprimiert (Li et al., 2001). Die Expression von Cx45 wurde weiterhin während des Prozesses der Follikelreifung in Granulosazellen gefunden (Okuma et al., 1996), im deep muscular plexus des Dünndarms (Nakamura et al., 1996) und in der zirkulären Muskulatur des Dünndarms (Wang et al., 2001). Ebenfalls wird eine funktionelle Bedeutung des Cx45 bei der Knochenentwicklung nach Untersuchungen an Osteoblasten Zelllinien postuliert (Steinberg et al., 1994; Minkoff et al., 1999).

Nach der Erzeugung von Cx45lacZ Reporterermäusen (A. Plum, Doktorarbeit 2000; O. Krüger, Doktorarbeit 2001) wurden keine homzygote Cx45 defizienten Tiere geboren. Bei diesen Mäusen wurde die kodierende Region des Exon3 gegen das LacZ Reportergen ausgetauscht. Cx45 defiziente Tiere sind embryonal letal. Bereits ab Tag neun der

Embryonalentwicklung setzen apoptotische Prozesse ein, die bis zum Tag 10,5 der Embryonalentwicklung zum Tod der Embryonen führen. Diese Embryonen weisen zwar eine primitive vaskuläre Struktur auf, aber die Angiogenese ist anscheinend nicht möglich. Dass ein Herzdefekt die Ursache des frühen embryonalen Versterbens sein könnte, zeigte eine weitere Cx45LacZ Maus (Kumai et al., 2000). Im ZNS wird Cx45 heutigen Vorstellungen nach nur neuronal ausgeprägt, diese Ausprägung ist zurückzuführen auf die Untersuchung der Cx45lacZ Reporterermäuse (Maxeiner et al., 2003).

## 1.5 Fusionsproteine aus Connexinen und eGFP oder eCFP

Die Klonierung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* hat für einen signifikanten Fortschritt bei der Beobachtung von lebenden Zellen mit Hilfe optischer Mikroskope gesorgt (Chalfie et al., 1994). Durch fortgesetzte Mutagenese wurden GFP Varianten, wie z.B. eCFP (Cyan fluoreszierend) oder YFP (Gelb fluoreszierend) erzeugt, die besser für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet waren als das Wildtyp GFP (Tsien 1998). Die grüne verstärkte Variante eGFP wurde z.B. in vielen Arbeiten als *in vivo* Reporter genutzt. GFP bzw. eCFP wurde als Fusionsprotein mit verschiedenen Connexinen (Cx43, Cx26 und Cx32) genutzt um z.B. Bewegungs und Lokalisationsuntersuchungen an transfizierten HeLa Zellen durchzuführen (Martin et al., 2001; Falk und Lauf, 2001). Ebenfalls wurde eine transgene Maus erzeugt, welche ein Fusionskonstrukt aus Cx36 und eGFP (Feigenspan et al., 2004) unter der Kontrolle des Cx36 Promotors exprimiert.



## 1.6 BAC Vektoren

Funktionelle Analyse von Genen *in vivo* beinhaltet normalerweise die Einführung von modifizierter genomischer DNS in die Keimbahn, um transgene Tiere herstellen zu können (Jaenisch et al. 1988, Palmiter et al. 1985). Die Größe der Sequenzen ist eine kritische

Größe bei diesen Experimenten, da Versuche bei *Drosophila* und Mäusen gezeigt haben, dass die höchstmögliche Gewebespezifität und die vom Integrationsort unabhängige Expression der Transgene abhängen kann von Verstärker und anderen Kontrollregionen, die sehr weit von der kodieren Region entfernt sind, bis hin zu 50 kb (Dillon et al., 1993, Kennison et al. 1993). Konventionelle Studien nutzen Vektoren in der Größe von ca. 20 kb und kleiner und zeigen dadurch verstärkt Positions- und andere Effekte (Wilson et al., 1990).

Um diese Effekte zu minimieren kann man große Vektoren nutzen, die diese gesamten regulativen Sequenzen beinhalten wie z.B. BACs (bacterial artificial chromosome).

BACs sind Vektoren, die bis zu 300 kb genomischer DNS beinhalten können (Shizuya et al., 1992, Ioannou et al. 1994, Zimmer et al. 1997). Sie basieren auf dem *E.Coli* Fertilitätsplasmid (F-Faktor) (Shizuya et al. 1992, Hosoda et al. 1990) und PACs (P-1 derived artificial chromosome) aus dem Bakteriophagen P-1 (Ioannou et al. 1994).

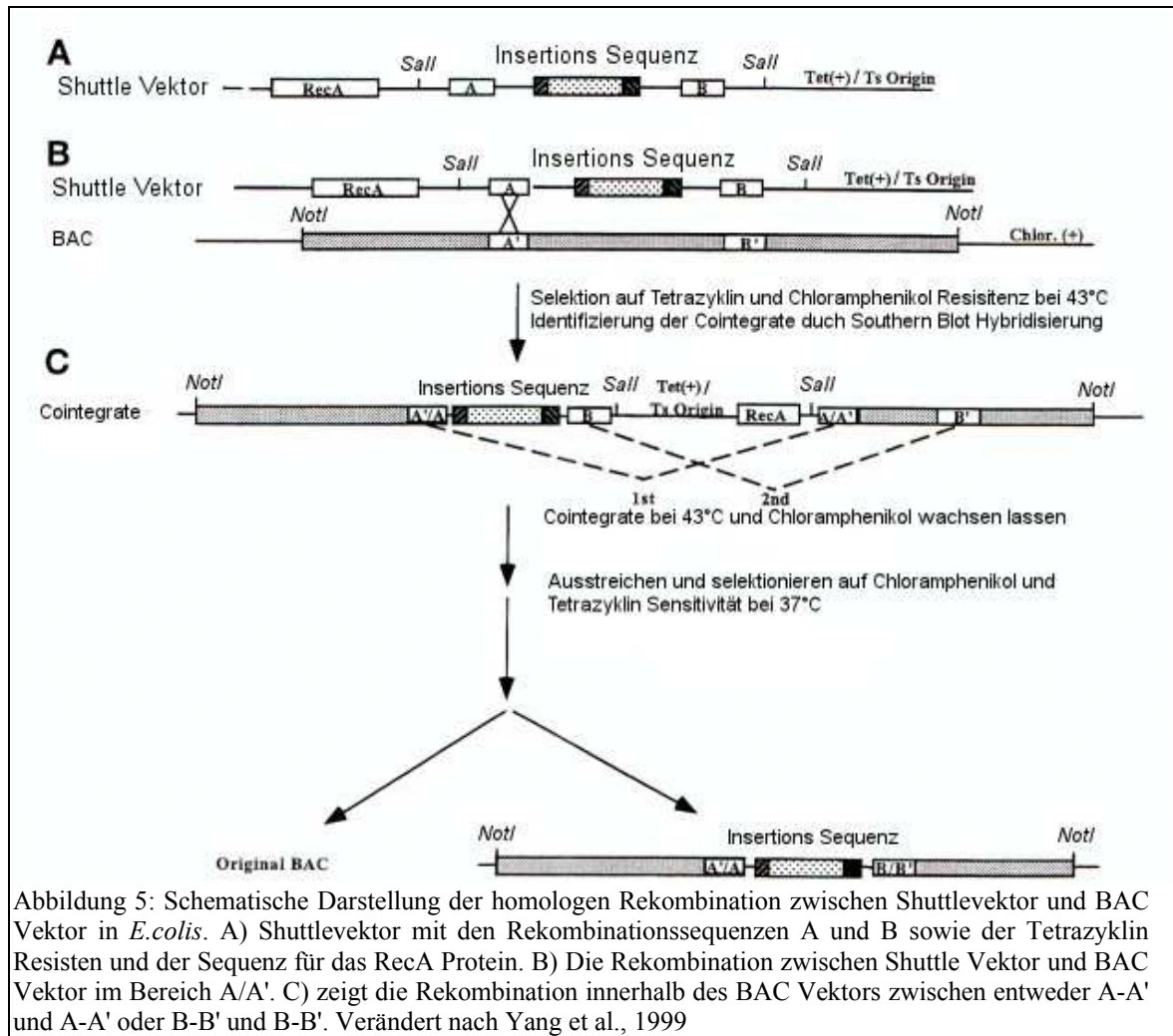
Die meisten BAC Vektoren beinhalten allerdings nur eine Insert Größe von ca. 130-150 kb. Aufgrund dieser Größe können sie die gesamten regulatorischen Sequenzen und Elemente eines Gens beinhalten, so dass eine zelltypspezifische Expression in transgenen Mäusen erreicht werden kann (Yang et al., 1997). BAC Vektoren haben zudem eine Reihe weiterer Vorteile: BAC Bibliotheken können aufgrund einer hohen Klonierungseffizienz recht einfach konstruiert werden (Woo et al., 1994). Desweiteren haben BAC Vektoren eine hohe Stabilität und die Isolierung der DNS ist relativ einfach, da diese als circuläre „Supercoil“ DNS in den Bakterienzellen vorliegen, und zusätzlich können diese Vektoren auch direkt sequenziert werden (Kim et al., 1996; Wang et al., 1994; Wooster et al. 1995).

### 1.6.1 Generelle Strategie für die gezielte Modifikation von BAC Vektoren

Um BACs zu modifizieren wird ein System zur homologen Rekombination in *E.colis* genutzt, dass auf einem „Shuttle“ Vektor mit einem temperatursensitiven ORI (Origin of Replication) basiert (O'Connor et al., 1989; Hamilton et al., 1989). Dieser Vektor wird nur in Bakterien repliziert, die bei 30°C wachsen und geht verloren in Bakterienzellen, die bei der so genannten „Restriktionstemperatur“ von 42-44°C wachsen weil der Vektor aufgrund des temperatursensitiven ORI bei dieser Temperatur nicht repliziert wird (Hashimoto-Gotoh et al., 1977). Um die Rekombinationsdefizienz der Bakterienzellen zu überwinden,

## Einleitung

die den BAC Vektor beinhalten, befindet sich in dem Shuttlevektor das *E.coli* RecA Gen (Rekombinationsprotein A). Wenn nun BAC beinhaltenende Bakterienzellen mit diesem Vektor transfiziert werden, der zudem auch noch die Rekombinationskassette enthält, können diese Bakterien eine homologe Rekombination durchführen.



Diese Rekombinationskassette wird hergestellt aus der zu inserierenden DNS Sequenz und aus zwei kleinen flankierenden DNS Sequenzstücken (A und B, jeweils ca. 500 Basenpaare) der Zielsequenz, die in der richtigen Orientierung und Reihenfolge in einen Erstellungsvektor kloniert werden (Abbildung 5). Die Kassette wird dann in den Shuttlevektor kloniert. Der Umweg über den Erstellungsvektor wird durchgeführt, weil der Shuttlevektor aufgrund seiner Größe und der sehr geringen Kopienzahl schwierig zu klonieren ist (Hashimoto-Gotoh et al., 1977).

Transformierte Bakterien werden nun durch Chloramphenicol und Tetrazyklin bei 30°C



selektiert, aufgrund des mittransformierten RecA Gens finden nun auch Rekombinationsereignisse zwischen dem Shuttlevektor und dem BAC Vektor (entweder an A oder an B) statt (siehe Abbildung 5 B). Die so entstandenen rekombinanten DNS Vektoren werden als Cointegrate bezeichnet (siehe Abbildung 5 C). Die Cointegrate werden nun mitselektiert durch eine Erhöhung der Temperatur auf 43°C. Bei weiterer Inkubation bei 43°C finden weitere Rekombinationsereignisse statt, auch hier wieder an den Sequenzstücken A und B bzw. an den homologen Bereichen. Durch diese Rekombination verlieren die gewünschten BAC-Vektoren die Sequenz für die Tetrazyklin Resistenz und das RecA Gen (siehe Abbildung 5 C), selektiert wird hier mit Hilfe von Fusaric Acid auf die Abwesenheit der Tetrazyklin Resistenz. Als Ergebnis dieses Schrittes sind sowohl die Rekombination zu dem ursprünglichen BAC Vektor als auch die Rekombination zu dem gewünschten Vektor mit der Insertions Sequenz möglich. Die Klone mit dem gewünschten Vektor werden durch Southern Blot Hybridisierungs Experimente identifiziert. Nach der homologen Rekombination verlieren die Bakterien auch automatisch das RecA Gen und damit die Fähigkeit Rekombinationsereignisse durchzuführen. Die fertigen BAC Vektoren sind dadurch auch stabil. Dieses System wurde erstmalig von Yang et al., 1999 beschrieben.

Eingesetzt wurde es zum Beispiel zur Herstellung einer Cx36-eGFP transgenen Maus, die ein Fusionsprotein aus Cx36-eGFP exprimiert (Feigenspan et al., 2004).

## 1.7 Erzeugung transgener Tiere

Um die funktionelle Bedeutung von Genen und deren Produkten *in vivo* untersuchen zu können, ist die Erzeugung von Mausmutanten, in denen gezielte Gendefekte oder fremde Gensequenzen in das Genom eingebracht werden, (Bradley et al., 1998) sinnvoll. Die resultierenden Tiere werden dabei als „transgen“ bezeichnet. Eine Möglichkeit zur Erzeugung transgener Mäuse ist die gezielte Veränderung endogener Sequenzen des Genoms in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus. Eine andere Möglichkeit stellt die Vorkerninjektion von DNS in befruchtete Eizellen dar. Beide Möglichkeiten werden in den folgenden Kapiteln kurz vorgestellt.

### 1.7.1 Erzeugung gezielter Genveränderungen durch homologe Rekombination

Die gezielte Veränderung endogener Sequenzen des Genoms in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus wird durch homologe Rekombination des jeweiligen Wildtyp Lokus mit einer mutierten Sequenz erreicht (Nagy et al., 2003). Durch die Techniken der Morula-Aggregation oder der Blastozysten-Injektion (Nagy A. et al., 2003) lassen sich mit Hilfe dieser totipotenten Es-Zellen chimäre Mäuse erzeugen, die den veränderten Lokus an ihre Nachkommen weitergeben können. ES-Zellen können als permanente Zelllinien kultiviert werden, ohne ihre Totipotenz zu verlieren (Nagy A. et al., 2003). Daher kann man sie benutzen, um die gezielte Genveränderung endogener Gensequenzen vorzunehmen, da sie *in vitro* kultiviert und selektioniert werden können. Da sie ihre Totipotenz behalten, sind sie zur Erzeugung transgener Mäuse mit der gewünschten genetischen Veränderung geeignet. Um die ES-Zellen genetisch zu verändern werden häufig so genannte Austauschvektoren mit homologen Bereichen verwendet. Diese homologen Sequenzen flankieren dabei die manipulierte nicht homologe Sequenz. Durch ein „Crossing over“ (doppeltes Überkreuzen) der flankierenden Bereiche mit dem endogenen Homologiebereich kann die Zielsequenz durch die manipulierte Sequenz ersetzt werden. Die Frequenz dieses Ereignisses ist allerdings sehr niedrig ( $10^{-6}$  bis  $10^{-7}$ ). Um positive Klone finden zu können, wird eine Anreicherung mit Hilfe einer Selektion durchgeführt. Selektioniert wird dabei auf ein zusätzlich in der manipulierten Sequenz eingebrachtes Resistenzgen, welches den transfizierten Zellen ein Wachstum in Anwesenheit eines Antibiotikums erlaubt, wie z.B. das Neomyzinderivat G418 (Nagy et al., 2003).

### 1.7.2 Erzeugung einer Genveränderung durch Vorkerninjektion

Bei dieser Möglichkeit der Herstellung transgener Mäuse, der Vorkerninjektion, wird die manipulierte DNS in befruchtete Eizellen injiziert. Die Methode führt zu einer zufälligen Integration der injizierten DNS in das Zielgenom und resultiert daher auch in variabler Expression des Transgens. Die Variabilität begründet sich auf dem Integrationsort und der Anzahl der inserierten Kopien des Transgens (Nagy et al., 2003). Auf diese Art erzeugte Mäuse sollten immer hemizygot gezüchtet werden (heterozygot bezüglich des Integrationsortes), damit mögliche Phänotypen durch die Zerstörung eines endogenen Gens

auf beiden Chromosomen vermieden werden. Die verwendete DNS kann sowohl ein Insertionsvektor sein, wie auch ein BAC Konstrukt; mit letzterem ermöglicht man eine weitgehende normale Expression aufgrund der mit integrierten Regulationssequenzen und weiterer möglicher Exone, wie bei Connexin45 die Exone 1a und 1b (Anderson et al., 2005).

### 1.7.3 Konditionale Ausschaltung von Gensequenzen mit Hilfe des flp/frt Systems

Die klassische Methode zur Ausschaltung von Genen verwendet Selektionskassetten und auch Reportergene, um die Zielsequenz zu ersetzen (Nagy et al., 2003). Resultierende transgene Mäuse können das Zielgenprodukt aus dem mutierten Genlokus nicht mehr exprimieren, sie werden im homozygoten Zustand als „Knock-out-Mäuse“ (KO) bezeichnet (Nagy et al., 2003). Mit Hilfe diese KO-Mäuse können Erkenntnisse über die Funktion des untersuchten Genproduktes *in vivo* gewonnen werden.

Die Alternative dieses Systems ist die konditionalen Ausschaltung von Gensequenzen, unter anderem durch das Flp/frt System (Lewandoski, 2001). Die Inaktivierung der Gene wird dabei in ES-Zellen oder transgenen Tieren entwicklungs- und /oder zelltypspezifisch durch ortsspezifische Rekombinasen durchgeführt. Die Zielsequenz wird dadurch genomisch deletiert.

Letalität und pleiotrope Effekte der Inaktivierung in allen Körperzellen kann somit umgangen werden. Außerdem können so Analysen erst ermöglicht werden, welche die Ausschaltung in bestimmten Zelltypen erforderlich machen. Das System beruht auf einer Rekombinase, welche eine 34 bp lange DNS Sequenz (frt-Sequenz) erkennt und daran bindet, dadurch wird die ortsspezifische Rekombination ermöglicht und durch die Rekombinase durchgeführt. Die Flp-Rekombinase ist ein Dimer, benötigt keine Hilfsproteine und stammt aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und wurde auf ein Temperaturoptimum von 37°C mutiert (Buchholz et al., 1998).

Die Erkennungssequenz frt (Flp-Rekombinase Rekombinations-Ziel) besteht aus zwei 13 bp langen invertierten Sequenzwiederholungen, die jeweils eine 8 bp lange Kernsequenz umgeben. Die invertierten Sequenzwiederholungen sind die Bindungsstellen der Rekombinase-Dimere, die Kernsequenz hingegen bestimmt die Orientierung der Erkennungssequenz und ist der Ort der Rekombination.

## Einleitung

Für eine durch Flp-Rekombinase vermittelte Rekombination muss die Zielgenesequenz von zwei *frt*-Sequenzen flankiert sein. Wenn beide Erkennungssequenzen eine unterschiedliche Orientierung aufweisen, kommt es zu einer Inversion der dazwischenliegenden Zielgenesequenz durch die Aktivität der Rekombinase. Sind die beiden Erkennungssequenzen in gleicher Orientierung positioniert, kann die Zielgenesequenz durch die Aktivität der jeweiligen Rekombinase genomisch deletiert werden. Der durch die Erkennungssequenzen flankierte Bereich wird dabei als zirkuläre DNS-Sequenz aus dem genomischen DNS-Strang ausgeschnitten. Auf dem verbleibenden DNS-Strang bleibt eine rekombinante Erkennungssequenz zurück. Die zirkuläre DNS-Sequenz wird in der Zelle enzymatisch abgebaut. Auch in (doppelt-)transgenen Mäusen sind diese Rekombinationen möglich (Lewandoski, 2001).

Für die zelltyp- oder gewebespezifische Ausschaltung eines Gens in (doppelt-)transgenen Mäusen muss die Expression der Flp-Rekombinase unter der Kontrolle entsprechender genregulatorischer Elemente stehen (Porter, 1998). Eine Deletion in allen Zellen kann mit Hilfe eines ubiquitär ausgeprägten Rekombinase-Transgens wie dem deleter-Flp-Transgen (Rodríguez et al., 2000) erfolgen. Das Resultat kann dem konventionellen „Knock-out“ entsprechen.

### 1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Gap Junction Protein Connexin36 (Cx36) dient insbesondere im zentralen Nervensystem der elektrischen Kopplung benachbarter Neurone. Für die weitere Charakterisierung der Expression und Funktion des Cx36 Proteins sollte ein Vektor hergestellt werden, der das Cx36 mit der Sequenz für eCFP beinhaltet und als Austauschvektor für die spätere Herstellung einer transgenen Maus dienen sollte. Die Maus sollte dann das Cx36 und das eCFP als Fusionsprotein exprimieren. Das Fusionsprotein sollte dann in (lebendem) Gewebe mit Hilfe eines Laserscan Mikroskops nachgewiesen werden, um Untersuchungen zur Lokalisation des Proteins innerhalb der Zellen während des Lebenszyklus des Proteins zu ermöglichen. Ebenfalls sollten damit nachfolgende Kolokalisations Experimente mit anderen neuronal exprimierten Proteinen, die ebenfalls als Fusionsproteine mit GFP Varianten in transgenen Mauslinien vorliegen, durchgeführt werden.

Das Gap Junction Protein Connexin45 (Cx45) wird während der embryonalen Entwicklung der Maus exprimiert, ebenso wie im reizleitenden Herzgewebe, glatten Muskelzellen und in Neuronen des ZNS. Im Rahmen dieser Arbeit sollten dann zum einen ein traditioneller Austauschvektor mit der Sequenz für Cx45 und eCFP hergestellt werden. Auch dieser Vektor sollte als Austauschvektor für die spätere Erzeugung einer transgenen Maus dienen. Diese Maus sollte das Cx45 und das eCFP als Fusionsprotein exprimieren. Ebenfalls sollten mit Hilfe dieser Maus die Lokalisation des Cx45 während des Lebenszyklus des Proteins untersucht werden.

Zusätzlich sollte ein BAC Vektor erzeugt werden, der für Connexin45 und das Protein eGFP kodiert.

Dieser Vektor sollte nach erfolgreicher homologen Rekombination mit einem Übertragungsvektor in *E. Coli* Bakterien für die Vorkerninjektion benutzt werden, um später ebenfalls eine transgene Mauslinie erzeugen zu können. Diese beiden transgenen Mauslinien würden unter anderem Kreuzungsexperimente ermöglichen, bei denen die Expression der transgenen Proteine verglichen werden könnten.

Mit beiden Mäusen könnten Kolokalisationsexperimente mit anderen Fusionsproteinen mit GFP Varianten durchgeführt werden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien in Analyse-Qualität (p.A.) verwendet. Enzyme und Nukleotide wurden von den Firmen Roche, New England BioLabs, Promega oder Amersham Pharmacia Biotech bezogen. Radioaktiv markierte Chemikalien stammten von der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Sequenzierungen von Plasmiden erfolgten durch die Firma Agowa.

### 2.2 Allgemeine Lösungen

PBS <sup>-</sup>	137 mM	8,0 g	NaCl (Merck #1.06404)
	2,7 mM	0,2 g	KCl (Merck #1.04936)
	8,1 mM	1,4 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O (Merck #1.06576)
	1,5 mM	0,2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck #1.04873)
	ad 1 l mit ddH <sub>2</sub> O, pH 7,2		

#### 2.2.1 Lösungen für die Bakterienkultur

LB-Medium	1 %	10 g	NaCl (Merck #1.06404)
	1 %	10 g	Trypton (Difco #0123-17-3)
	0,5 %	5 g	Hefe-Extrakt (Difco #0127-17-9)
	ad 1 l, mit ~2 ml 1 N NaOH auf pH ~7,4, 20 min autoklavieren		

LB-Agar		1 l	LB-Medium
	0,75%	7, g	Dunkel-Agar (Difco #0138-17-6)
	20 min autoklavieren; ggf. Zugabe von Antibiotika bei 55°C		

Ampizillin-Stammlsg.	5 %	2,5 g	Ampizillin (Roche #835269)
	ad 50 ml, sterilfiltrierte Aliquots bei -20°C lagern; Endkonzentration in Selektionsmedien: 50 µg/ml		

Tetrazyklin-Stammlsg.		100 mg	Tetrazyklin (Sigma #T-3258)
	ad 10 ml mit Ethanol; Aliquots bei -20°C lagern; Endkonzentration in Selektionsmedien 12,5 µg/ml		

## Material

Chloramphenikol-Stammlsg.	125 mg	Chloramphenikol (Roth # 3886.1)
		Ad 10 ml 50% Ethanol Aliquots bei $-20^{\circ}\text{C}$ lagern; Endkonzentration 12,5 mg/ml
Fusaric Acid-Stammlsg.	20 mg	Fusaric Acid (Fluca # 48205)
		Ad 10 ml 50% Ethanolbideist; sterilfiltrieren; Aliquots bei $-20^{\circ}\text{C}$ lagern; Endkonzentration 12,5 mg/ml
TB Medium 11	10mM 55mM 15 mM 250m M	Pipes (Sigma #P3768) $\text{MgCl}_2$ (Merck #5833) $\text{CaCl}_2$ (Merck #1.02382) KCl (Merck #4936)
		Ph Wert von 6,7 einstellen, 20 Minuten Autoklavieren, lagern bei $4^{\circ}\text{C}$
TFB	10 mM 10mM 100mM 45mM 3mM	K-Mes (Sigma #M0895-25G) $\text{CaCl}_2$ (Merck #1.02382) RbCl (Sigma #R-2252) $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck #A248127) Hexamin $\text{Co(III)Cl}_3$ (Sigma #H-7891)
		Aliquots a 30ml in Falcon Röhren und mit Alu umwickeln, da der Puffer lichtempfindlich ist
SOB	5 g 1,25 g 0,146 g 0,0466 g ad 500 ml 2,5 ml 2,5 ml	Bacto Trypton (BD #8x01231) Hefe Extrakt (BD #8x01271) NaCl (Merck #1.06404) Kcl (Merck #1.04936) mit $\text{ddH}_2\text{O}$ , pH 7,2 1M $\text{MgCl}_2$ (Merck #5833) 1M $\text{MgSO}_4$ (Merck #5886)
SOC	500 ml 2,5 ml	SOB 2M Glucoselösung (Merck #1.08337)

## Material

DnD	1,53 g	Dithiothreitol (Sigma #D-0632)
	9 ml	DMSO (Merck #102931)
	100 µl	1M Kaliumacetat; pH 7,5 (Merck #1.04820)
		Sterilfiltrieren und in 0,5ml Aliquouts bei -20°C lagern
K-Mes	19,52 g	Mes
		In 80 ml H <sub>2</sub> O lösen PH mit 5M KOH auf 6,3 einstellen ad 100 ml; sterilfiltrieren
TFBI	30 mM	K-Acetat pH 5,8 (Merck #1.04820)
	10 mM	CaCl <sub>2</sub> (Merck #1.02382)
	50 mM	MnCl <sub>2</sub> (Merck #1.02382)
	100 mM	RbCl (Sigma #R-2252)
	15%	Glycerin (Sigma #G-7757)
		Bei 4°C lagern
TFBII	10 mM	Na-MOPS pH 7,0 (Serva #29836)
	75 mM	CaCl <sub>2</sub> (Merck #1.02382)
	10 mM	RbCl (Sigma #R-2252)
	15%	Glycerin (Sigma #G-7757)
		Bei 4°C lagern

### 2.2.2 Lösungen für die Nukleinsäure-Analytik

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und bei RT gelagert.

TE-Puffer	10 mM	121 mg	Tris (ICN #819623)
	1 mM	37,2 mg	EDTA (Sigma #E-5134)
			ad 100 ml, pH 8,0, 1 h autoklavieren
Partialverdau- Stop-Lsg.	10 mM	37,2 mg	EDTA (Sigma #E-5134)
			ad 10 ml, pH 8,0



## Material

TBE (10x)	900 mM	109 g	Tris (ICN #819623)
	900 mM	55,6 g	Borsäure (Merck #1.00165)
	25 mM	0,93 g	EDTA (Sigma #E-5134)
			ad 1 l, pH 8,3
DNS- Ladepuffer (6x)	0,25 %	125 mg	Bromphenolblau (Serva #15375)
	0,25 %	125 mg	Xylenzylanol (Sigma #X-2751)
	30 %	15 ml	Glyzerin (Sigma #G-7757)
			ad 50 ml
Natriumacetat	3 M	24,6 g	Natriumacetat (Merck #1.06268)
			ad 100 ml, pH 4,8, 1 h autoklavieren
RNase 2000	0,2 %	20 mg	RNase A (Roche #109142)
	2000 U/ml	20.000 U	RNase T1 (Roche #109193)
			ad 10 ml mit ddH <sub>2</sub> O; Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern
Alkali-Lsg. 1	50 mM	4,5 g	D(+)-Glucose (Merck #1.08337)
	25 mM	1,51 g	Tris (ICN #819623)
	10 mM	1,86 g	EDTA (Sigma #E-5134)
			ad 500 ml; vor Gebrauch Zugabe von 1 µl/ml RNase 2000
Alkali-Lsg. 2	0,2 M	4 g	NaOH (J.T. Baker #0402)
	1 %	50 ml	SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
			ad 500 ml
Alkali-Lsg. 3	3 M	147,3 g	Kaliumacetat (Merck #1.04820)
	5 M	57,5 ml	Essigsäure (Merck #1.00062)
			ad 500 ml
Proteinase K- Lösung	20 mg/ml	1 g	Proteinase K (Roche #1092766)
			ad 50 ml; Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern
ES-Lysis-Puffer	50 mM	0,3 g	NaCl (Merck #1.06404)
	20 mM	0,24 g	Tris (ICN #819623)
	100 mM	3,72 g	EDTA (Sigma #E-5134)
	0,5 %	500 µl	SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
	2 mM	29 mg	CaCl <sub>2</sub> (Merck #1.02382)
			ad 100 ml, pH 8,0, sterilfiltrieren; vor Gebrauch Zugabe von 50 µl Proteinase K-Lösung und 100 µl

## Material

			RNase 2000 pro ml
Lysis-Puffer	0,2 M	2,42 g	Tris (ICN #819623)
	0,1 M	3,72 g	EDTA (Sigma #E-5134)
	1 %	10 ml	SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
			ad 100 ml, pH 8,0; vor Gebrauch je ml Zugabe von 10 µl Proteinase K-Lösung
NaCl-Lösung	3 M	17,5 g	NaCl (Merck #1.06404)
			ad 100 ml
Depurinierungs-Lsg.	0,25 M	29 ml	Salzsäure, 32 % (Merck #1.00319)
			ad 1 l
Denaturierungs-Lsg.	1,5 M	175,3 g	NaCl (Merck #1.06404)
	0,5 M	40 g	NaOH (J.T. Baker #0402)
			ad 2 l
20x SSC	3 M	175,3 g	NaCl (Merck #1.06404)
	0,3 M	107,1g	Trinatriumcitrat *5,5H <sub>2</sub> O (Merck #1.06431)
			ad 1 l, pH 7,0
Sephadex G50			zu 30 g Sephadex G50 (Pharmacia #17-0573-02) werden 300 ml TE-Puffer gegeben, ÜN bei RT quellen gelassen und schließlich der überschüssige TE-Puffer durch frischen ersetzt (1:1); 1 h autoklavieren

### 2.2.3 Lösungen für die Zellkultur

1% Gelatine-Stock	5 g		Gelatine (Sigma #G-6144)
			Zugabe von 500 ml ZK-Wasser (Sigma #W3500), 1 h autoklavieren, die Lösung mischen und nochmals 1 h autoklavieren; Lösung ist bei 4°C ca. ein Jahr lagerbar. Zur Herstellung der
			0,1 %igen Arbeitslösung wird eine Verdünnung in ZK-Wasser (Sigma #W3500) hergestellt.
ES-EDTA-Lösung	5 mM	0,925 g	EDTA (Sigma #E-5134)
			zu 500 ml ES-PBS <sup>-</sup> (Sigma #D8537), pH 7-8 durch Zugabe von 200 µl 10 N NaOH, 1 h autoklavieren

## Material

ES-Trypsin  
 400 ml ES-PBS<sup>-</sup> (Sigma #D8537)  
 1 mM 100 ml ES-EDTA-Lösung  
 1 % 5 ml Chicken Serum (Gibco BRL #16110-003)  
 0,025 5 ml Trypsin, 2,5 % (Gibco BRL #25090-028)  
 %  
 Aliquots à 50 ml bei -20°C lagern

ES-WT-Medium  
 500 ml Glasgow-MEM (Biochrom AG #F 0525)  
 5 % 28 ml FCS, ES-Zellkultur-getestet (Sigma #F-  
 5 % 28 ml 2442)  
 1 mM 5,4 ml NCS, ES-Zellkultur-getestet (Sigma #N-  
 1 x 5,4 ml 4637)  
 2 mM 5,4 ml Na-Pyruvat, 100 mM (Sigma #S8636)  
 1 x 5,4 ml Pen/Strep, 100x (Sigma #P0781)  
 0,1 % 550 µl Glutamin, 200 mM (Sigma #G7513)  
 0,007 % 550 µl Aminosäuren, 100x (Sigma #M7145)  
 LIF  
 β-ME-Stock  
 Aliquotierte Zutaten unter einer Sterilbank zugeben;  
 Lagerung bei 4°C ca. 4 Wochen; vor Gebrauch  
 erwärmen

HBS-Puffer  
 100 ml ES-PBS<sup>-</sup> (Sigma #D8537)  
 20 mM 2 ml HEPES, 1 M (Gibco BRL #15630-056)  
 2,5 M 240 µl Glucose, 100x (Gibco BRL #19004-019)  
 Aliquots à 10 ml bei -20°C lagerbar

ES-  
 Einfriermedium  
 17,5 ml ES-WT-Medium  
 20 % 2,5 ml FCS, ES-Zellkultur-getestet (Sigma #F-  
 20 % 5 ml 2442)  
 Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck  
 #1.16743)  
 Aliquot bei -20°C ca. 1 Jahr lagerbar

G418-Stock  
 50 mg/ml aktiv G418 Sulfat (PAA #P27-011)  
 100 mM PIPES (Sigma #P-3768)  
 lösen von 10 g G418 und ausgerechneter Menge  
 PIPES, so daß eine Lösung entsteht mit 100 mM  
 PIPES und *aktivem* G418 von 50 mg/ml, steril-  
 filtrieren; Aliquots à 10 ml bei -20°C lagern

ES-  
 Selektionsmediu  
 m  
 350 µg/ml  
 579 ml ES-WT-Medium  
 4 ml G418-Stock

## Material

			Lagerung bei 4°C ca. 4 Wochen; vor Gebrauch erwärmen
isotonische KCl-Lsg.	0,56 %	0,56 g Kaliumchlorid (Merck #1.04936)	ad 100 ml mit ZK-Wasser, Lagerung bei 4°C
Puromyzin-Stock	0,05 %	100 mg Puromyzin (Sigma #P-8833)	lösen in 200 ml ZK-Wasser, sterilfiltrieren; Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern
HeLa-D10-Medium	10 % 1 x	500 ml DMEM (Sigma #D6046) 55 ml HeLa-FCS (Biochrom #S0115) 5 ml Pen/Strep, 100x (Sigma #P0781)	Zutaten unter einer Sterilbank zugeben; Lagerung bei 4°C ca. 4 Wochen; vor Gebrauch erwärmen
Puck'sches Salin	137 mM 5,4 mM 5,5 mM 4,2 mM	8 g NaCl (Merck #1.06404) 0,4 g KCl (Merck #1.04936) 1 g D(+)-Glucose (Merck #1.08337) 0,35 g NaHCO <sub>3</sub> (Merck #1.06329)	ad 1 l, sterilfiltrieren; bei -20°C lagern
HeLa-Trypsin	0,04 % 0,5 mM	20 mg Trypsin (Sigma #T-4799) 10 mg EDTA-Natriumsalz (Serva #11280)	ad 50 ml mit Puck'scher Saline, pH 7,5, sterilfiltrieren; Langzeitlagerung bei -20°C, sonst bei 4°C
2-fach BBS	50 mM 280 mM 1,5 mM	533 mg BES (Sigma #B-6266) 800 mg NaCl (Merck #1.06404) 28 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 12 H <sub>2</sub> O (Merck #1.06576)	ad 50 ml, pH 6,95, sterilfiltrieren; Aliquots à 1 ml bei -20°C etwa 3 Monate haltbar
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	250 mM	1,84 g CaCl <sub>2</sub> (Merck #1.02382)	ad 50 ml, sterilfiltrieren; Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern

### 2.2.4 Fertige Lösungen

- Demecolcine Solution (Colchizin) für ES-Zell Karyotypanalyse (Sigma #D-1925)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck #1.02950)
- ES-PBS<sup>-</sup> (Dulbecco's Phosphate buffered saline) für ES-Zellkultur (Sigma #D8537)
- Eisessig (Merck #1.00063)
- Entellan (Merck #1.07961)
- Ethanol (Serva #11093)
- Ethidiumbromid, 1 % (Merck #1.11608)
- Giemsa Färbelösung (Sigma #GS-500)
- Isopropanol (Merck #1.09634)
- Methanol (Riedel-de-Haën #32213)
- Mineral Oil als PCR-Öl (Sigma #M-5904)
- QuickHyb (Stratagene #201220)
- Roti-Phenol/Chloroform (Roth #A156.2)

## 2.3 Materialien

### 2.3.1 Allgemeine Labormaterialien

Sterile Zellkulturartikel wurden von den Firmen Falcon, Sarstedt, Nunc und Becton Dickinson bezogen. Pipettenspitzen und Reagenzgefäße stammten von der Firma Sarstedt.

- Agarose (Gibco BRL #15510-027)
- Faltenfilter (Schleicher & Schuell)
- Glaswolle, silikonisiert [durch Schwenken in Silikonisierer (Roth #6287.1) 1:60 in ddH<sub>2</sub>O, 1 Woche abdampfen lassen und 10 min bei 120°C backen]
- Hybond-ECL Nitrozellulose Membran (Amersham #RPN2020D)
- Hybond-N- sowie Hybond-N<sup>+</sup>-Membran (Amersham #RPN203N sowie #RPN203B)
- Objektträger Superior (Marienfeld #1000200) sowie SuperFrost Plus Objektträger (Menzel-Gläser #041300)
- Röntgenfilme X-OMAT AR (Sigma #Z35,849-5), BIOMAX AR und BIOMAX MR (Kodak)
- Sterilfilter 0,4 µm und 0,2 µm (Schleicher & Schuell)

- Whatman 3mm-Papier GB 002 (Schleicher & Schuell #426693)
- Nylon membranes positively charged (Roche #1417240)

### 2.3.2 Geräte

- Axiophot; Mikroskop mit Epifluoreszenz und angeschlossener AxioCam color HR (Zeiss)
- Elektrophoresekammern Pharmacia GNA-100 und -200 [Nukleinsäuren] (Pharmacia)
- ImageMaster VDS [UV-Apparatur zur Dokumentation von EtBr-Agarosegelen] (Pharmacia Biotech)
- Inkubatoren für die eukaryotische Zellkultur mit CO<sub>2</sub>-Regelung (Heraeus)
- Laser Scan Mikroskop LSM 510 Meta (Zeiss)
- PCR Maschine PTC-100 und PTC 200 Programmable Thermal Controller (BioZym)
- Primus 96 plus Thermocycler (MWG Biotech AG)
- Szintillationszähler LS 1801 (Beckman)
- UV Stratalinker 2400 (STRATAGENE)
- Zentrifugen: Biofuge A (Heraeus); Kühlzentrifugen 2-MK und ZK15 (Sigma); Kühlzentrifuge Minifuge RF [15/50 ml Röhrchen] (Heraeus)
- Pulsfeld Gel Elektrophorese Gerät CHEF-DR II (BIO-RAD)

### 2.3.3 Reagenziensätze (Kits)

- Jetstar 2.0 Plasmid MIDI Kit (Genomed #210050)
- Multiprime-DNA labelling system (Amersham #RPN 1601Z)
- Perfectpret Gel Cleanup Kit (Eppendorf #0032007.759)
- Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen #12362)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen #28706)
- DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche #1585614)

## 2.3.4 Plasmide

Von allen hier aufgeführten Plasmiden sowie allen Zwischenklonierungsvektoren befinden sich im Anhang Abbildungen der Vektorkarten.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz/Firma
pBluescript II SK(+) (pBSK)	Klonierungsvektor	Stratagene (#212205) Short et al., 1988
pmCx36	Ausgangsvektor mit 9,8 kb des Maus Cx36-Lokus des Mausstammes 129Sv/Ola	Goran Söhl, Doktorarbeit, 1999
pEGFP-N1	Verstärkt grün fluoreszierendes Protein (eGFP) enthaltender eukaryotischer Expressionsvektor	Clontech (#6085-1)
pMJ-Green	Eukaryotischer Expressionsvektor; verbesserte Kombination aus den beiden Vektoren pBEHpac18 und pEGFP-N1	Joachim Degen, Doktorarbeit, 2003
pECFP-N1	Verstärkt Cyan fluoreszierendes Protein (eCFP) enthaltender eukaryotischer Expressionsvektor	Clontech (#6900-1)
PBAce3.6	Klonierungsvektor für die BAC Sequenzen	Frengen et al., 1999
pCx45-3000	Ausgangsvektor mit 3kb des Maus Cx45 Lokus	Diplom Arbeit Hendrick Brune, 1999
pCx45-5000	Ausgangsvektor mit 5kb des Maus Cx45 Lokus	Diplom Arbeit Hendrick Brune, 1999
pSV-RecA	Shuttlevektor für die BAC Klonierung	Yang et al. 1997

### 2.3.5 Größenstandards

Bezeichnung	Fragmentgrößen
DNS 100 bp-Leiter (Gibco BRL #15628-019)	100, 200, 300, 400, 500, <b>600</b> , 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, <b>2.072</b> bp
DNS 1 kb-Leiter (Gibco BRL #15615-024)	134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1.018, <b>1.639</b> , 2.036, 3.054, 4.072, 5.090, 6.108, 7.126, 8.144, 9.162, 10.180, 11.198, 12.216 bp
Low Range PFG Marker (NEB #N0350S)	2,03; 2,32; 4,36; 6,55; 9,42; 23,1; 48,5; 97,0; 145,5; 194,0 kb

### 2.3.6 Bakterienstämme

Bezeichnung	Eigenschaften und Verwendung	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-blue MRF	Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, $\Delta$ (mcr)A183, $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, supE44, relA1, lac[F'proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> 12,5 $\mu$ g/ml)]; Vermehrung von Plasmiden	Bullock et al., 1987
<i>E. coli</i> TOP10/DH10B	Genotyp:F'mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74 recA1 deoR araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>r</sup> ) endA1 nupG	Invitrogen

### 2.3.7 Eukaryotische Zell-Linien

Bezeichnung	Eigenschaften und Verwendung	Referenz
HeLa (ATCC CCL 2)	Aneuploide, epitheloide Cervixkarzinom Linie aus menschlichem Gewebe als untransfizierte Wildtyp-Zellen (HeLa-WT)	Jones et al., 1971
HM1	Embryonale Stammzellen der Maus, gewonnen aus dem Mausstamm Sv129P2/OlaHsd	Magin et al.,1992



### 2.3.8 Startermoleküle (Oligonukleotid-Primer)

Startermoleküle wurden bei MWG und Sigma-Genosys bestellt, mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 pmol/μl verdünnt, aliquotiert á 20-50 μl und bei -20°C gelagert.

<b>Startermoleküle zur Anreicherung von DNS-Fragmenten, die zur Klonierung benötigt wurden:</b>	
Cx36_intron Cx36_go_BamHI	5' TGC ATT TGC CAG AGT AAA GGT GCG 3' 5' CGG AAG GGG AAG GCG GAT CCC GCA CAT AGG CAG AGT CAC TGG 3'
Cx36_3UTR_xba Cx36_xba_3UTR	5' ATA ATC TAG AAG GCA GAA ATA TCC 3' 5' GCT CTA GAG AAG GGC AGG TTT GGG GAA GGC C 3'
xba_go_end end_go_xba	5' TGT GAC CTC GAG CGA TCT AGA CCC ACT GAA 3' 5' TGC GTC CTA GGA TCC AAT CCA GAC GGA 3'
go_end_utr_neu go_utr_xho_neu	5' GAC TGA GCG GCC GCT GGT TGG GCT TAA AAC 3' 5' CAG GCG GCC GCC TCG AGT CGA AGA CTG GTG TTT CT 3'
BamHI_go_cfp_p_eco81I _new endcfp_go_bamhi_neu	5' CGC GGA TCC AGC CTG AGG ACC ATG GTG AGC AAG GGC 3' 5' ATC TAG AGT CGC GGC CGC TTT ACT TGT ACA 3'
nach45neuhin nach45neurueck	5' GAT GCT AAT GTC TCC TCC CAG GTT CT 3' 5' TCT CAG CTT ACT GCA GCC TTG ACC TCC 3'
30kbvor45hin 30kbvor45rueck	5' GAT TGG CAG AGA GAT GTC AG 3' 5' GTC CAT CAC TCA CCA GAG AT 3'
firt_go_3 3_go_frt	5' TCT AGA AAG TAT AGG AAC TTC GTC GA 3' 5' GTG TAC AGG TAT TCT GCC TAC ATG TG 3'

### 2.3.9 Antikörper

anti-Cx45 (Monoklonal)	[IF (1:500)]	Chemikon (#MAB-3101)
anti-eGFP Living Colors	IF (1:400)	Clontech (#8367-2)
anti-Kaninchen-Alexa 594 (rot)	IF (1:1.000)	MoBiTec (#A-11037)

### 2.3.10 BAC DNS Bibliothek

Die BAC DNS Bibliothek wurde bei RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung) bestellt. Die Bibliothek hat die Nummer 731, Bezeichnung: Library Mouse BAC (RPCI-23).

### 2.3.11 BAC Vektoren

Es wurden die folgenden Klone beim RZPD bestellt und verwendet.

- RPCIB731A20166Q2
- RPCIB731D0428Q2
- RPCIB731G10176Q2
- RPCIB731H10176Q2
- RPCIB731H15192Q2
- RPCIB731I12176Q2

## 3 Methoden

Wenn nicht anders erwähnt, wurden molekularbiologische Standardmethoden wie DNS-Spaltungen mit Restriktionsenzymen, Fällungen und Denaturieren von Nukleinsäuren, verschiedene Formen der Agarosegelelektrophorese, Fällung und Konzentrationsbestimmung von DNS nach den gängigen Laborhandbüchern durchgeführt (Sambrook und Russell, 2001; Ausubel et al., 1989-2001). Enzyme und Reagenziensätze wurden den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

### 3.1 Nukleinsäure Präparationen

#### 3.1.1 Plasmid Präparationen aus Bakterien

##### 3.1.1.1 Schnelle Plasmid Mini Präparation

Mit dieser Methode ermöglicht man eine schnelle Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien. Eine Einzelkolonie wird über Nacht im Schüttelinkubator bei 250 Upm in 2 ml antibiotikahaltigem LB-Medium inkubiert. Von der Bakteriensuspension werden 1,5 ml in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und die Bakterien durch Zentrifugation (7.000 Upm, 1 min) sedimentiert.

Der Überstand wird abgenommen und das Bakterienpellet in 100 µl Alkali-Lsg. 1 mit Hilfe eines Strudelmischers resuspendiert. Anschließend werden zu dem Ansatz 200 µl Alkali-Lsg. 2 zugegeben und durch Invertieren (8-10x) gemischt. Danach werden zu dem Ansatz 150 µl Alkali-Lsg. 3 zugegeben und ebenfalls durch Invertieren gemischt.

Durch die anschließende Zentrifugation (13.000 Upm, 6 min) werden die Bakterienzelltrümmer mit anheftender genomischer DNS sedimentiert, so dass der Überstand nur noch die Plasmid-DNS enthält. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach werden 1000 µl absolutem EtOH zugegeben. Nach Mischen des Ansatzes und der Zentrifugation (13.000 Upm, 6 min) ist die Plasmid-DNS sedimentiert. Nach einem Waschschriff mit 500 µl 70% EtOH und erneuter Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min) kann nach Abnahme des Überstandes und kurzem Trocknen des Plasmidsediments die DNS in 100 µl TE-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O aufgenommen werden.

Die isolierte DNS ist rein genug, um mit ihr analytische Restriktionsspaltungen, Klonierungen und Retransformationen durchführen zu können.

### 3.1.1.2 Plasmid Midi Präparation

Diese Methode ermöglicht ebenfalls eine schnelle Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien, allerdings wird eine größere Menge DNS isoliert (50-200 µg).

Dazu werden 50 ml Bakteriensuspension verwendet. Die Aufreinigung erfolgt entweder wie unter 3.1.1.1 beschrieben unter Berücksichtigung und Anpassung der Zentrifugationsgeschwindigkeiten an größere Zentrifugen (<8.500 Upm) und der Lösungsvolumina (Alkali-Lsg. 1 1,5 ml; Alkali-Lsg. 2 3 ml; Alkali-Lsg. 3 2 ml; absolutes EtOH 7,5 ml) oder aber mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie durch Einsatz des Jetstar 2.0 Plasmid MIDI Kit der Firma Genomed laut Herstellerangaben.

### 3.1.1.3 Endotoxinfreie Plasmid Maxi Präparation

Um große Mengen an Plasmid-DNS (bis zu 500 µg) mit höchstem Reinheitsgrad ohne Verunreinigungen durch bakterielle Proteine zu präparieren wird der EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet.

Die Isolierung der zur stabilen Transfektion embryonaler Stammzellen benötigten Plasmide erfolgt nach Herstellerangaben unter Verwendung von Einmal-Plastikpipetten. Die isolierte und sedimentierte Plasmid-DNS wird unter sterilen Bedingungen in endotoxinfreiem TE-Puffer aufgenommen und weiterverwendet.

### 3.1.1.4 Isolierung genomischer DNS aus embryonalen Stammzellen für PCR

Um eine schnelle Analyse auf homologe Rekombination in ES-Zellen mit Hilfe der PCR durchführen zu können, wird von einer mit HM1-Zellen konfluent gewachsenen 48-Loch Kulturschalenvertiefung nach dem Trypsinieren, die Hälfte der Zellsuspension in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt.

Die Zellen werden durch Zentrifugation sedimentiert (13.000 Upm, 5 min). Nach Absaugen des Überstandes werden die Zellen durch Zugabe von 100 µl H<sub>2</sub>O mit ein µl Proteinase K-Lösung und einer Inkubation von 30 Minuten bei 55°C lysiert. Dieses Lysat

wird vor dem Einsatz zur PCR (siehe 3.4.1) kurz auf dem Strudelmischer gemischt.

### 3.1.1.5 Isolierung genomischer DNS aus embryonalen Stammzellen für Southern Blot

Für eine DNS-Aufreinigung zur Durchführung einer Southern-Blot Hybridisierungs-Analyse (siehe 3.4.2.1) wird ein mit ES-Zellen konfluent bewachsener T25-Kolben eingesetzt. Nach zwei Waschschritten mit PBS<sup>-</sup> mit 1,5 ml ES-Lysis-Puffer wird 1 h auf dem Schüttler inkubiert.

Anschließend wird das Lysat in ein 13 ml Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt und 2 Tage bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Zugabe von 2 ml Roti Phenol/Chloroform wird der Ansatz kurz gemischt und anschließend zentrifugiert (8.000 Upm, 15 min). Die obere wässrige Phase wird anschließend in ein neues Röhrchen überführt.

Die DNS-Fällung erfolgt durch Zugabe von 1 ml Isopropanol. Anschließend wird der Ansatz gemischt, bis eine DNS-Flocke sichtbar wird, die mit einer sterilen 200 µl Pipettenspitze entnommen wird. Die DNS-Flocke wird durch zweimalige Zugabe von 5 ml 70 % EtOH und anschließender kurzer Zentrifugation (6.000 Upm, 5 min) und Abdekantieren des Überstandes zweimal gewaschen. Nun wird die DNS Flocke 15 min bei RT getrocknet und schließlich in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Zum vollständigen Lösen wird der Ansatz 1 h bei 55°C im Wasserbad inkubiert, bevor etwa 10 µl zur Restriktionsspaltung und anschließender Southern-Blot Hybridisierung eingesetzt werden.

## 3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

### 3.1.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren können anhand der Absorption von UV-Licht bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum der heterozyklischen Nukleotidbasen liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm (A<sub>260</sub>) und das der aromatischen Aminosäurereste bei einer Wellenlänge von 280 nm (A<sub>280</sub>).

Die Absorptionsraten von Nukleinsäurelösungen werden in Quarzküvetten bei 260 nm und 280 nm gegen TE-Puffer als Referenz gemessen. Eine Absorptionseinheit entspricht bei einem Strahlengang von 1 cm Länge einer Konzentration von 50 µg/ml (DNS). Der

Quotient A260/A280 gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der Lösung. Er sollte für DNS zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung durch UV-absorbierende Stoffe (Proteine, Phenole) hin.

### 3.1.2.2 Konzentrationsabschätzung im Gel

Neben der Konzentrationsabschätzung der Nukleinsäuren anhand des Bandenmusters ist es auch möglich, eine Kontrolle der Qualität durchzuführen, ein Vorteil dieser Methode. Auch können im Gel Nukleinsäurekonzentrationen dargestellt werden, welche für eine photometrische Bestimmung zu gering sind.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über einen Bandenintensitätsvergleich der Probe unbekannter Konzentration mit einer Probe bekannter Nukleinsäurekonzentration (1 µg DNS 1 kb-Leiter; siehe 2.3.5). Hierbei wird die zur Konzentration proportionale Leuchtintensität einer Bande in einem EtBr-Agarosegel mit derjenigen des Referenzstandards verglichen.

## 3.2 Arbeiten zur Herstellung rekombinanter Plasmide

### 3.2.1 Gewinnung der gewünschten DNS-Fragmente

#### 3.2.1.1 Partielle Spaltung von Plasmiden

Eine partielle Spaltung, um das benötigte Fragment zu erhalten, ist dann notwendig wenn Plasmid-DNS mit einem Enzym gespalten werden soll, dessen Erkennungssequenz mehrfach in dem Vektor vorhanden ist.

Dazu werden etwa 20 µg Plasmid-DNS mit 10 U Restriktionsenzym in einem 20 µl Ansatz versetzt und bei der jeweils optimalen Temperatur inkubiert. Erfolgt die Restriktionsreaktion zu schnell, kann auch eine suboptimale Temperatur gewählt werden.

Nach 10 sec, 20 sec, 30 sec, 45 sec, 1 min, 90 sec, 2 min, 3 min, 5 min und 10 min werden jeweils 2 µl des Ansatzes abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. In diesem Reaktionsgefäß sind 5 µl Partialverdau-Stop-Lsg. und 3 µl DNS-Ladepuffer vorgelegt. Das Reaktionsgefäß wird anschließend sofort auf Trockeneis gestellt. Die Analyse der

Partialsplaltungen erfolgt über eine Agarosegelelektrophorese. Beachtet werden muß hier die Agarosekonzentration in Bezug auf die erwarteten DNS-Fragmentlängen, je größer die aufzureinigenden Fragmente sind, desto weniger Prozent Agarose sollte das Gel haben.

### 3.2.1.2 Elution von DNS-Fragmenten aus dem Gel

Nach einer Agarosegelelektrophorese können DNS-Fragmente unterschiedlicher Länge aus den Agarosegelen isoliert werden. Das gewünschte DNS-Fragment wird mit einem Skalpell unter Verwendung einer Handlampe mit langwelligem UV-Licht (365 nm) aus dem ethidiumbromidhaltigen Gel ausgeschnitten.

Zur Präparation dieser DNS-Fragmenten aus dem Gel werden die Reagenziensätze QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) oder Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendorf) nach Herstellerangaben verwendet und die DNS in 30 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

## 3.2.2 Modifikationen und Ligation von DNS-Molekülen

### 3.2.2.1 Auffüllen adhäsiver Enden (blunten)

Bei Klonierungen ist es mitunter erforderlich, durch Restriktionsendonukleasen erzeugte, nicht kompatible, überhängende Enden zu glätten, um eine Ligation über glatte Enden zu ermöglichen. Dies erfolgt durch dNTP-Moleküle in 5'-3'-Richtung, welche mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNS-Polymerase I aus *E. coli* aufgefüllt werden.

Dazu wird der Restriktionsansatz gegebenenfalls in Puffer H oder B (Roche) umgepuffert und mit 1 µl Klenow-Polymerase (1 U/µl, Roche #1008404) sowie 1 µl dNTP-Mix (Hybaid-AGS #DNTP-MIX-M [2 mM/µl]) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wird der Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und das gewünschte Fragment aus dem Gel eluiert (siehe 3.2.1.2).

### 3.2.2.2 Dephosphorylierung von Vektorrückgraten

Die aus einer Restriktionsspaltung oder einer Auffüllreaktion erhaltenen DNS-Moleküle besitzen an ihrem 5'-Ende Phosphatgruppen. Dadurch können durch einfachen Ringschluß ohne Integration des einzuklonierenden Fragmentes (Insertions-DNS) vermehrungsfähige Plasmide durch die Ligation entstehen. Um eine Religation zu minimieren und den Anteil der Plasmide zu erhöhen, die das einzuklonierende Fragment auch beinhalten, werden die

freien 5'-Phosphatgruppen durch Dephosphorylierung mit einer alkalischen Phosphatase aus Krabben (SAP = shrimp alkaline phosphatase) entfernt.

Dazu werden zu 30 µl geleluertem DNS-Fragment 3 µl SAP-Puffer und 1 µl (1 U) SAP (Roche #1758250) gegeben und der Ansatz 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird nochmals 1 µl SAP zugefügt und der Ansatz nochmals inkubiert (15 min, 37°C). Durch eine Inkubation von 20 min bei 65°C wird die Phosphatase hitzeinaktiviert. Die so dephosphorylierte DNS kann bei -20°C gelagert werden.

### 3.2.2.3 Ligation von DNS-Fragmenten

Intra- bzw. intermolekulare Verknüpfungen freier DNS-Enden lassen sich mit Hilfe der T4-Ligase durchführen, wodurch rekombinante Plasmide aus Vektor- und Insertions-DNS entstehen können. Die Ligation kann zwischen glatten oder kohäsiven DNS-Enden stattfinden.

Es werden äquimolare Mengen Vektor- (etwa 25 ng) und Insert-DNS (etwa 75 ng), 1 µl 10x Ligationspuffer ad 9 µl mit ddH<sub>2</sub>O und 1 µl (1 U) T4-DNA-Ligase (Roche #481220) in ein Mikroreaktionsgefäß auf Eis pipettiert und der Ansatz ÜN oder eine Stunde bei 16°C oder 4°C inkubiert. Der inkubierte Ansatz kann anschließend zur Transformation eingesetzt werden.

## 3.2.3 Transformation

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme freier DNS von prokaryotischen Zellen. Dieser Vorgang wird im Labor mit Hilfe speziell hergestellter kompetenter Bakterien durchgeführt. Die Zellwand dieser Bakterien wurde durch Schwermetalle porös gemacht, dadurch können sie leichter freie DNS aufnehmen.

### 3.2.3.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien (Standard Methode)

Mit einer Einzelkolonie des erwünschten Bakterienstammes werden 2 ml LB-Medium ÜN bei 37°C und 250 Upm kultiviert. Am nächsten Tag werden 100 µl der stationären Kultur in 10 ml LB-Medium überführt und 2-3 h bei 37°C und 250 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 in eine exponentielle Wachstumsphase gebracht.



Von dieser Vorkultur werden 5 ml zu 100 ml vorgewärmtem LB-Medium gegeben und solange bei 37°C und 250 Upm kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 erreicht ist. Die Kultur wird anschließend in zwei 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und etwa 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend werden die Bakterien durch Zentrifugation (5 min, 5.000 Upm, 4°C) sedimentiert und der Überstand abgenommen.

Die Zellen werden vorsichtig auf Eis in je 10 ml eiskaltem Transformationspuffer TFB I resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) und Verwerfen des Überstandes werden die Zellen in je 2 ml sterilem, eiskaltem Transformationspuffer TFB II resuspendiert und in Aliquots zu jeweils 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so hergestellten kompetenten Bakterien können bei -70°C etwa ein Jahr gelagert werden.

### 3.2.3.2 Herstellung hocheffizienter transformationskompetenter Bakterien

Mit einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstammes werden 2-3 ml LB Medium bei 37°C über Nacht und 250 Upm kultiviert. Am nächsten Tag wird diese Kultur zwischen 1/10 und 1/20 verdünnt und weiter kultiviert. Die weitere Kultivierung findet mit SOB Medium statt. Für jeden Transformationsansatz werden dabei 1,2 ml verwendet, für 10 Ansätze also 12 ml plus 2-3 ml für die Messung der optischen Dichte (OD) der Bakteriensuspension.

Die Kultur soll nun bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 wachsen. Je nach Kulturvolumen dauert das 1-3 Stunden. Beim Erreichen der gewünschten OD wird die Gesamtkultur in ein 50 ml Plastikgefäß von Falcon überführt. Der Ansatz wird 10-15 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wird für 5 Minuten bei 6000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 1/3 des Ausgangsvolumens TFB resuspendiert und wieder für 10-15 Minuten auf Eis inkubiert. Es schließt sich wieder eine Zentrifugation von 5 Minuten bei 6000 Upm und 4°C an.

Der Überstand wird wieder verworfen und das Pellet in 1/12 des Ausgangsvolumens TFB aufgenommen. Nun wird DND zugegeben bis zu einer Konzentration von 3,5% und anschließend wieder 10-15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wird die gleiche Menge DND zugegeben bis zu einer Endkonzentration von 7%. Die Transformation kann nun sofort mit 200 µl Bakterien Suspension erfolgen.

### 3.2.3.3 Transformation in Xl-1 blue *E. coli* Bakterien

Ein Aliquot kompetenter Bakterien wird auf Eis aufgetaut. Dieser Ansatz wird anschließend auf den Ligationsansatz gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz 1 Minute bei 42°C oder 2 Minuten bei 37°C inkubiert und sofort 5 Minuten auf Eis abgekühlt.

Zu dem Ansatz werden 300 µl LB-Medium pipettiert und 5 Minuten – 1 Stunde inkubiert (37°C, 250 Upm). Dies ermöglicht die Ausprägung des auf dem Plasmid kodierten Resistenzgens. Anschließend werden 100 µl und 200 µl der Bakteriensuspension auf zwei antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausplattiert und umgedreht ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach können die Platten bei 4°C etwa 2 Monate gelagert werden.

## 3.3 Zellkultur

### 3.3.1 HM1 embryonale Stammzellen der Maus

HM1 embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden aus agoutifarbenen, männlichen Blastozysten des Mausstammes Sv129P2/OlaHsd isoliert (Magin et al., 1992). Sie wachsen auf gelatinisierten Kulturschalen in Gegenwart von löslichem LIF in Abwesenheit von Fibroblasten („feeder“-Zellen). Die Kultivierung von embryonalen Stammzellen erfolgt in Heraeus-Inkubatoren in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt. Angaben über Kultur, Transfektion und Analyseverfahren finden sich auch in Theis et al., 2000.

#### 3.3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

HM1 Zellen werden in ES-WT-Medium gehalten. Das Medium muß nur bei geringer Zelldichte nach der Isolierung von Einzelklonen alle 2-3 Tage, sonst jedoch täglich gewechselt werden. Gesplittet werden HM1 Zellen bei einer Konfluenz von etwa 90% durch eine Trypsinierung und anschließender Ausplattierung mit einer Verdünnung von 1:2 bis 1:3.

Bei einer Kulturgröße von 48-Loch- und 24-Loch-Kulturschalenvertiefungen werden die Zellen ohne eine Zentrifugation gesplittet. Ab einer Kulturgröße von 6-Loch-

Kulturschalenvertiefungen werden sie nach dem Trypsinieren abzentrifugiert.

Für die Trypsinierung wird das alte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit ES-PBS<sup>-</sup> und einmal mit ES-Trypsin gewaschen. Anschließend wird etwa 1/10 des Kulturvolumens an ES-Trypsin zugegeben. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 37°C wird das Trypsin durch Zugabe von ES-WT-Medium abgestoppt, die Zellen durch Agitation gründlich vereinzelt und die sich in Suspension befindlichen Zellen in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation (5 Minuten, 800 Upm, RT) wird nach dem Absaugen des Überstandes das Zellpellet in entsprechender Menge ES-WT-Medium oder ES-Selektionsmedium aufgenommen und in der Verdünnung auf gelatinisierte (durch Inkubation von 5 Minuten mit 0,1%-iger Gelatine-Arbeitslösung) Kulturschalen ausplattiert. Die neuen Kulturschalen werden anschließend mit frischem ES-Medium auf das entsprechende Kulturvolumen aufgefüllt. Die Passagenzahl erhöht sich pro Trypsinierung um eine Anzahl, die auf den Kulturgefäßen notiert werden muss.

Zum Einfrieren von Kulturzellen werden die Zellen eines T25 Kolbens nach dem Trypsinieren in 10 ml ES-WT-Medium aufgenommen und in 15 ml Röhrchen überführt. Diese Suspension wird zentrifugiert (5 Minuten, 800 Upm, RT), anschließend werden die sedimentierten Zellen in 1,5 ml ES-WT-Medium aufgenommen und mit einer 5 ml Pipette resuspendiert. Je 500 µl dieser Suspension werden zu in drei beschrifteten Einfrierampullen vorgelegten 500 µl ES-Einfriermedium pipettiert und nach Verschließen der Ampulle kurz gemischt. Die Ampulle wird durch Inkubationen von 2 h bei -20°C und ÜN bei -70°C langsam eingefroren, bevor sie zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt wird.

Zum Auftauen wird eine Ampulle durch zügiges Überführen aus der Flüssigstickstoffphase in ein 37°C Wasserbad aufgetaut und der Inhalt in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, in dem 9 ml ES-WT-Medium vorgelegt sind. Nach einer Zentrifugation (5 Minuten, 800 Upm, RT) wird das Zellsediment in 5 ml ES-WT-Medium vorsichtig resuspendiert und auf einer gelatinisierten 6-Loch Schale rekultiviert.

### 3.3.1.2 Stabile Transfektion zur homologen Rekombination

Als Transfektion bezeichnet man die Aufnahme freier DNS von eukaryotischen Zellen. Bei der stabilen Transfektion selektioniert man mit Hilfe eines Selektionsmediums auf das Ereignis der stabilen Integration der transfizierten DNS in die genomische DNS der

Ausgangszellen. Die stabile Transfektion von HM1 ES-Zellen erfolgt mit Hilfe der Elektroporation von linearisiertem Plasmid.

Dafür werden bis zu 350 µg des mit Hilfe des Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit aufgereinigten Austauschvektors eingesetzt (siehe 3.1.1.3). Dieser Vektor wurde durch eine Restriktionsspaltung linearisiert, gefällt, zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und in 100 µl endotoxinfreiem TE-Puffer aufgenommen. ES-Zellen mit einer möglichst niedrigen Passagenzahl werden unter den Standardbedingungen kultiviert und bis zur 95-100%igen Konfluenz eines T75-Kolbens herangezogen. Die ES-Zellen werden wie zur Passage trypsiniert und die Zellkonzentration der Einzelzellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Nach der Zentrifugation werden die Zellen in soviel HBS-Puffer aufgenommen, dass in 800 µl  $3 \times 10^7$  Zellen enthalten sind. 800 µl Zellsuspension werden mit den 100 µl linearisiertem Austauschvektor vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation erfolgt durch Anlegen eines Stromimpulses des Biorad-Gene Pulser (Biorad, München) von 0,8 Kilovolt mit einer Kapazität von 3 Mikروفarad. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei RT werden die Zellen vorsichtig in 10 ml ES-WT-Medium resuspendiert und auf mehrere 10 cm-Schalen mit 10 ml ES-WT-Medium unterschiedlicher Verdünnung ausplattiert. Platten mit der Aussaat von 0,5 ml =  $1,5 \times 10^6$  Zellen bringen nach der Selektion meist die besten Resultate in Form von nicht zu dicht gewachsenen einzelnen ES-Zellklonen.

### 3.3.1.3 Selektion auf stabile Integration und homologe Rekombination

Die Selektion auf Anwesenheit des in dem Austauschvektor integrierten Selektionsmarkergens Neomycin startet 24 Stunden nach der Elektroporation durch Wechsel des ES-WT-Mediums zu ES-Selektionsmedium. Zunächst zweimal nach zwei, anschließend alle 3 Tage wird das G418-haltige Medium mit den abgestorbenen Zellen gewechselt. Resistente Klone lassen sich nach etwa 5 Tagen mikroskopisch erkennen, erreichen allerdings erst nach etwa 10 Tagen Selektion eine Größe, welche die Isolierung der einzelnen Zellklone ermöglicht.

Dazu werden die Klone jeweils mit Hilfe einer 200 µl Kolbenhubpipette und gelben Spitzen unter dem Mikroskop von der Kulturschale abgeschabt, in 180 µl Kulturmedium

aufgesaugt und in eine Vertiefung einer gelatinisierten 48-Loch-Kulturschale transferiert. Der Zellklumpen wird durch mehrmaliges (ca. 8x) Auf- und Abpipettieren möglichst stark vereinzelt. Abschließend erfolgt die Zugabe von ES-WT-Medium, das alle 2-3 Tage gewechselt wird, bis der Zellklon eine ausreichende Konfluenz zum Trypsinieren besitzt. Nach dem ersten Trypsinierungsschritt von einer 48-Loch- auf eine 24-Loch Kulturschalenvertiefung wird die Hälfte der Zellsuspension abgenommen, die genomische DNS aus embryonalen Stammzellen isoliert (siehe 3.1.1.4) und zur Genotypisierungs-PCR eingesetzt (siehe 3.4.1). Die Expansion der in der PCR als erfolgreich homolog rekombiniert identifizierten Klone erfolgt schrittweise über eine 12-Loch-, eine 6-Loch-Kulturschale und schließlich zwei konfluente T25 Kolben. Die Zellen des einen Kolbens werden zur später gegebenenfalls erfolgenden Blastozysten-Injektion eingefroren (siehe 3.3.1.1), die Zellen des anderen Kolbens werden erneut auf zwei T25-Kolben gesplittet. Ein Kolben wird zur genomischen DNS-Gewinnung aus embryonalen Stammzellen (siehe 3.1.1.4) und anschließender Southern-Blot Hybridisierung (siehe 3.4.2.1) eingesetzt, der andere Kolben für die Karyotypanalyse.

### 3.3.1.4 Karyotypanalyse homolog rekombinierter ES-Zellklone

Für die Gewinnung von keimbahngängigen Chimären nach der Blastozysten-Injektion (BCI) ist es unabdinglich, dass die ES-Zellen ihren normalen Karyotyp von 40 akrozentrischen Chromosomen während der Kulturphase beibehalten haben. Daher werden alle potentiell für die BCI einzusetzenden ES-Zellklone zuvor einer Karyotypanalyse unterzogen.

Dazu werden die Zellen eines konfluenten T25-Kolbens durch eine Inkubation von 50 min (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) mit 0,1 µg/ml Demecolcine (2 ml ES-WT-Medium + 40 µl Demecolcine) in der Metaphase der Mitose arretiert.

Die Zellen werden anschließend gewaschen und trypsiniert, danach in einem 50 ml Röhrchen pelletiert und durch Klopfen in 1 ml isotonischer KCl-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 3 ml isotonischer KCl-Lösung und vorsichtigem Mischen schwellen die Zellen für 10 min bei RT osmotisch an. Anschließend werden die Zellen wieder sedimentiert (5 min, 700 Upm), der Überstand abgesaugt und das Pellet durch tropfenweise Zugabe von eiskaltem, frisch angesetztem Methanol:Eisessig (3:1) durch Klopfen resuspendiert. Durch eine Inkubation von 5 Minuten bei RT findet eine erste

Fixierung statt. Diese wird nach einer erneuten Sedimentation (5 Minuten, 1.200 Upm) zweimal wiederholt.

Nach der letzten Sedimentation werden die Zellen in 1 ml Methanol:Eisessig-Gemisch aufgenommen und mit einer Pasteurpipette aus 20-30 cm Höhe auf saubere Objektträger aufgetropft. Die Chromosomen werden durch eine Inkubation von 1 Minuten in Giemsa Färbelösung angefärbt und die Färbung durch zweimaliges Waschen mit Leitungswasser differenziert. Die Objektträger werden nach dem Trocknen an der Luft mit Entellan und Deckgläsern eingedeckelt. Mindestens 20 auswertbare Chromosomensätze einzelner mitotisch arretierten Zellen werden pro ES-Zellklon an einem Zeiss-Axiophot mit Phasenkontrastoptik ausgezählt.

### 3.3.2 Zellkultur von HeLa-Zellen

Die Kultivierung von HeLa-Zellen erfolgt in Heraeus-Inkubatoren in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub>-Gehalt. HeLa-Zellen werden auf unbeschichteten Kulturschalen kultiviert.

#### 3.3.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

HeLa-Wildtyp Zellen werden in HeLa-D10-Medium kultiviert, welches alle 2-4 Tage gewechselt wird, wobei meist nach dieser Zeit auch ein Splitten der Zellen durchgeführt wird. Gesplittet werden HeLa-Zellen bei einer Konfluenz von etwa 90 % durch eine Trypsinierung und anschließender Ausplattierung mit einer Verdünnung von 1:3 bis 1:10. Gesplittet werden kann auch schon bei einer geringeren Konfluenz, da die HeLa-Wildtyp Zellen relativ unempfindlich sind.

Zum Splitten wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend etwa 1/10 des Kulturvolumens an HeLa-Trypsin zugegeben. Nach einer Inkubation von 2-4 Minuten bei 37°C wird das Trypsin durch Zugabe von HeLa-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 (10ml) aufgefüllt.

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 Minuten, 800 Upm, RT) und die sedimentierten Zellen in 900 µl frischem D10-Medium aufgenommen und resuspendiert. Eine Einfrierampulle wird beschriftet und es werden 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) vorgelegt. Die Zellsuspension wird dazu pipettiert und nach Verschließen der Ampulle kurz gemischt. Mit der Ampulle wird genauso verfahren, wie oben für ES-Zellen schon beschrieben (siehe 3.3.1.1). Auch das Auftauen erfolgt wie oben beschrieben, nur dass die für HeLa-Zellkultur spezifischen Medien verwendet werden.

### 3.3.2.2 Transiente Transfektion mit Hilfe der Calciumphosphat-Präzipitation

Bei der hier angewendeten Calciumphosphat-Präzipitation wird die DNS mit Hilfe von sich bildenden Kristallen in die Zellen eingebracht. Die Effizienz der transfizierten Zellen hängt erheblich von dem pH-Wert der eingesetzten Lösung ab.

Zur Transfektion werden HeLa-Zellen mit 60 % Konfluenz verwendet, die 12 Stunden zuvor in 6 cm Kulturschalen ausplattiert wurden. Zur Transfektion werden 10 µg Plasmid-DNS, linearisiert mit einem geeignetem Restriktionsenzym, pro 6 cm Kulturschale eingesetzt. Die DNS wird in 250 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung gelöst und dieses Gemisch tropfenweise unter ständigem Schütteln in 250 µl 2-fach BBS pipettiert (15 ml Röhrchen). Das Gemisch wird 10 Minuten bei RT inkubiert und schließlich vorsichtig tropfenweise in das Medium (5 ml) der zu transfizierenden Zellen pipettiert.

Die so behandelten Zellen werden 12 Stunden inkubiert (3-5 % CO<sub>2</sub>, 37°C) und anschließend nach zweimaligem Waschen mit PBS<sup>-</sup> weitere 24-48 h in D10-Medium kultiviert (10 % CO<sub>2</sub>, 37°C). Während dieser Zeit sollten alle transfizierten Zellen das vom jeweiligen Plasmid kodierte Protein exprimieren. Dies kann mit verschiedenen Methoden (Immunfluoreszenz-Analyse (siehe 3.4.3.1) oder Fluoreszenzmikroskopie unfixierter Zellen durch Anregung mit UV-Licht bei Verwendung von Fusionsproteinen mit GFP oder eCFP) nachgewiesen werden.

### 3.3.2.3 Stabile Transfektion mit Hilfe der Calciumphosphat-Präzipitation

Bei der stabilen Transfektion wird wie bei der transienten Transfektion (siehe 3.3.2.2) vorgegangen. Nach 24-48 Stunden Kultivierung der Zellen in D10-Medium (10 % CO<sub>2</sub>,

37°C) wird allerdings wieder zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Anschließend wird die Selektion auf die Integration des Vektors mit dem Selektionsmarkergen gestartet, durch die Kultivierung der Zellen, in mit Puromycin (oder einem anderen Antibiotikum) versetzten D10-Medium (10 % CO<sub>2</sub>, 37°C). Alle 2-3 Tage wird das Medium mit den abgestorbenen Zellen gewechselt. Nach ca. 10 Tagen können die unter einem Mikroskop sichtbaren Klone nun vereinzelt werden. Dabei werden die Klone unter einem Mikroskop mit einer 200 µl Kolbenhubpipette abgekratzt und in eine 48-Loch-Kulturplattenvertiefung pipettiert und weiter mit dem Selektionsmedium inkubiert. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 90% erreicht haben, werden diese trypsiniert und auf zwei 24-Loch Kulturschalenvertiefungen pipettiert. Mit der einen Kulturschale kann entweder eine Immunfluoreszenz Analyse gemacht werden, oder die lebenden Zellen können direkt durch Fluoreszenzmikroskopie beurteilt werden. Positive Klone werden weiter kultiviert.

## 3.4 Analysen transgener Zellen

### 3.4.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (Mullis und Faloona, 1987) ist ein *in vitro*-Verfahren zur exponentiellen und selektiven Vervielfältigung von DNS-Fragmenten. Aus einem bekannten DNS-Bereich werden zwei Startermoleküle (Primer) abgeleitet, die an einer denaturierten, einzelsträngigen Matrizen-DNS in entgegengesetzter Orientierung an die beiden DNS-Stränge binden. Eine hitzestabile DNS-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) verlängert die 3'-Enden der Startermoleküle, so dass zwei komplementäre DNS-Einzelstränge synthetisiert werden. Diese dienen nach einer erneuten Denaturierung und Starteranlagerung ebenfalls als Matrize. Durch 35- bis 40-fache Wiederholung der Zyklen Denaturierung, Starteranlagerung und DNS-Synthese erfolgt die selektive Vervielfältigung des durch die Startermoleküle flankierten Bereiches. Eine Analyse der amplifizierten DNS-Sequenzbereiche erfolgt über eine Agarosegelelektrophorese.



## 3.4.2 Genotypisierung von ES-Zellen

### 3.4.2.1 Southern-Blot Hybridisierung

Der Transfer von Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran und ihre damit verbundene Immobilisierung ermöglicht den Nachweis spezifischer Nukleinsäuremoleküle nach Anlagerung einer radioaktiv oder DIG markierten DNS-Sonde.

### 3.4.2.2 Gewinnung von Membranen mit immobilisierter DNS für radioaktiven Southern Blot

Nach einer Aufreinigung genomischer DNS (siehe 3.1.1.4 und 3.1.1.5) werden 20 µg mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten und elektrophoretisch in einem Agarosegel geeigneter Konzentration aufgetrennt (ÜN, 2-3 V/cm<sup>2</sup>).

Anschließend wird das Gel mit einem Fluoreszenzlineal als Größenmaßstab unter dem UV-Transilluminator dokumentiert. Zur Depurinierung der DNS wird das Gel 10 min in Depurinierungs-Lsg. auf einer Wippe bei RT inkubiert. Das Gel wird kurz mit Wasser gespült und 30 min bei RT auf der Wippe in Denaturierungs-Lsg. inkubiert. Zum Aufbau des Blots wird eine Glasplatte quer auf eine mit Denaturierungs-Lsg. gefüllte Melaninschale gelegt. Auf dieser Glasplatte liegen zwei mit Denaturierungs-Lsg. angefeuchtete 3mm-Papiere (Brücke), die an beiden Enden in den Puffer reichen. Auf das 3mm-Papier wird mit den Taschenöffnungen nach unten das Gel gelegt, das von der in Denaturierungs-Lsg. äquilibrierten Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>) vollständig bedeckt wird. Auf die Membran werden zwei in Puffer getränkte 3mm-Papiere in Gelgröße gelegt. Luftblasen müssen beim Blot-Aufbau vermieden bzw. entfernt werden. Die freie Glasplatte und die Brücke werden mit Parafilm abgedeckt, so dass der Kapillarsog nur durch das Gel und die Membran stattfindet. Der Blot-Aufbau wird mit zwei 15 cm hohen Stapeln Handtuchpapier (Tork) abgeschlossen sowie mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert. Der Transfer findet ÜN oder über das Wochenende statt. Anschließend wird bei dem Abbau mit einem Bleistift die Position der Geltaschen auf der Nylonmembran markiert. Die Nylonmembran wird kurz in 2x SSC gewaschen, um Gelreste zu entfernen und Salzkristallbildung zu vermeiden. Nachdem die Membran 1 Stunde bei RT getrocknet ist, wird die DNS UV-vernetzt (UV Stratalinker 2400). Die Vollständigkeit des DNS-Transfers wird durch Betrachten des Gels auf dem UV-Transilluminator überprüft.

### 3.4.2.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

Zur radioaktiven DNS-Markierung wird der Reagenziensatz Multiprime-DNA labelling system (Amersham) verwendet. Das Verfahren beruht darauf, dass hexamere Startermoleküle zufälliger Sequenz mit der als Sonde einzusetzenden DNS hybridisieren und vom Klenow-Fragment der DNS-Polymerase in Anwesenheit von [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP verlängert werden. Die Sonde wird durch Restriktionsspaltung aus der entsprechenden Plasmid-DNS ausgeschnitten, über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe 3.2.1.2) und die Konzentration des Eluats bestimmt (siehe 3.1.2.1). 50 ng DNS werden mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 31  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und 5  $\mu\text{l}$  hexamere Startermoleküle zugegeben. Der Ansatz wird 5 Minuten gekocht, 5 Minuten auf Eis abgekühlt und mit 10  $\mu\text{l}$  Markierungspuffer versetzt, der nicht radioaktives dATP, dGTP und dTTP enthält. Zusätzlich werden 2  $\mu\text{l}$  [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) und 2  $\mu\text{l}$  Klenow-Polymerase (1 U/ $\mu\text{l}$ ) zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Abtrennung freier, radioaktiver Nukleotide und kurzer Oligonukleotide wird eine Sephadex G50 Säule verwendet. Bei der Herstellung der Säule wird eine 1 ml Spritze mit autoklavierter, silikonisierter Glaswolle abgedichtet, in ein 13 ml Röhrchen (Sarstedt) gestellt und mit Sephadex G50 gefüllt. Die Säule wird durch Zentrifugation (1 Minuten, 1.000 Upm, RT) verdichtet, der Durchfluß verworfen und ein offenes 1,5 ml Schraubdeckelreaktionsgefäß unter die Säule in das Röhrchen gestellt. Der die radioaktiv markierte Sonden-DNS enthaltende Ansatz wird mit 150  $\mu\text{l}$  TE-Puffer verdünnt, auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (5 Minuten, 1.000 Upm, RT). 1  $\mu\text{l}$  der Sonde wird entnommen und im Szintillationszähler vermessen.

Die Hybridisierung immobilisierter Nukleinsäuren wird mit QuickHyb bei 68°C durchgeführt. Die Hybridisierungslösung ermöglicht eine schnelle, sensitive und stringente Hybridisierung.

Zur Vorhybridisierung wird die mit ddH<sub>2</sub>O angefeuchtete Membran luftblasenfrei in die Hybridisierungsröhren überführt und zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen eine Vorinkubation von 30 Minuten mit 10 ml (100 ml Röhre) der QuickHyb Lösung bei 68°C durchgeführt. Nach der Vorhybridisierung wird die durch fünfminütiges Aufkochen hitzedenaturierte, radioaktiv markierte DNS-Sonde zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken mit der Hand gleichmäßig in der Vorhybridisierungslösung verteilt.

Die Hybridisierung findet eine Stunde lang bei 68°C im Rollinkubator statt. Durch das Waschen der mit der Sonde inkubierten Membran wird die unspezifisch gebundene Sonde

entfernt. Dazu werden die Membranen jeweils zweimal 10 min bei 65°C in 0,1 % SDS-haltigen Lösungen einer absteigende Salzkonzentration (2x SSC bis 0,1x SSC) geschwenkt und die radioaktiven Lösungen ordnungsgemäß entsorgt. Die Abnahme der Radioaktivität an den Membranen wird zwischen den Waschschrritten überprüft. Die Membran wird nach dem letzten Waschschrritt feucht in Haushaltsfolie eingeschweißt. In der Dunkelkammer wird die Membran in eine Röntgenfilmkassette eingelegt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionszeit des Films liegt zwischen 1 Tag bis zu 3 Wochen bei -70°C. Die Entwicklung des Röntgenfilms wird in einer Entwicklermaschine durchgeführt (Agfa Curix 60).

### 3.4.3 Nachweise von Proteinen

#### 3.4.3.1 Immunfluoreszenz-Analysen

Die Immunfluoreszenz-Analyse ermöglicht einen Nachweis eines Proteins mit Hilfe von Antikörpern an fixierten Zellen und Geweben. Dadurch ist nicht nur eine Aussage über die Expression des Proteins, sondern auch über seine Lokalisation in der Zelle möglich.

Zu untersuchende HeLa-Zellen nach transienter oder stabiler Transfektion (siehe 3.3.2.2) werden für mindestens 2 Tage in einer Kulturschale kultiviert, in der sich ein steriles Deckglas befindet. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, 10 min mit Methanol fixiert und ebenfalls 30 min bei RT in IF-Blockpuffer inkubiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation von 1 Stunde bei RT mit in IF-Blockpuffer verdünnter Primärantikörperlösung (siehe 2.3.9).

Nach dem Entfernen von überschüssigen Antikörpern durch dreimaliges Waschen von jeweils 5 min in PBS<sup>-</sup> werden die Präparate mit geeigneter Verdünnung von ebenfalls in IF-Blockpuffer verdünnten Sekundärantikörpern (siehe 2.3.9) 45 min bei RT inkubiert. Überschüssige Sekundärantikörper werden durch erneutes, dreimaliges Waschen von jeweils 5 min in PBS<sup>-</sup> entfernt.

Zur unspezifischen Zellkernmarkierung werden die Präparate 15 min in einer 1:2.000 Verdünnung in PBS<sup>-</sup> der Hoechst-Lösung (Axiophot) oder in einer 1:5.000 Verdünnung mit 2 µl/ml RNase 2000 in PBS<sup>-</sup> der Propidiumjodid-Lsg. (LSM) inkubiert und abschließend noch einmal in PBS<sup>-</sup> gewaschen. Schließlich werden die Präparate in Dako Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt und bis zur mikroskopischen Analyse bei 4°C lichtgeschützt maximal 1 Woche aufbewahrt.

### 3.4.3.2 Direkter Nachweis von Fusionsproteinen mit eCFP oder GFP

Die zu untersuchenden HeLa-Zellen werden wie unter 3.4.3.1 beschrieben fixiert und anschließend direkt unter einem Fluoreszenzmikroskop mit einem Tauchobjektiv beobachtet. Alternativ können auch Zellkulturschalen (6 oder 10 cm Durchmesser) mit noch lebenden Zellen direkt analysiert werden.

## 3.5 BAC Klonierung

BAC ist die Abkürzung von Bacterial Artificial Chromosome. BACs sind DNS Vektoren mit einer Größe von 100-300 kb. Der hier verwendete BAC ist entstanden durch Einklonieren eines rund 250 kb großen Fragmentes mit der codierenden Region von Cx45 in das Vektorrückgrat des pBACe3.6 (Frensen et al., 1999) Vektors. Der Vektor stammt aus einer BAC Bibliothek (#731) des RZPD. Mit Hilfe der homologen Rekombination in Bakterien können diese großen Vektoren verändert werden.

### 3.5.1 Durchführung der homologen Rekombination in BACs

#### 3.5.1.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien speziell für die Transformation von BAC beinhaltenden Bakterien

Aus dem BAC beinhaltenden Stock DH10B Bakterien werden mit einer Metallschleife einige Bakterien entnommen und in 3 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml) angeimpft. Die Kultur wird über Nacht bei 37°C in einem Schüttler bei 200 U/min kultiviert. 0,5 ml der Übernacht Kultur werden in 50 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml) bei 37°C auf einem Schüttler weiter kultiviert bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6.

Der Kulturbedeälter wird 10 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wird die Kultur in ein 50ml Falcon Behälter überführt. Es schließt sich eine 10 minütige Zentrifugation mit 3.000 U/min bei 4°C an. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in eiskaltem TB Medium resuspendiert. Nun wird noch einmal für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird noch einmal für 10 Minuten mit 3.000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird nun vorsichtig in 4 ml TB-Medium resuspendiert und versetzt mit 7% DMSO. Nun wird noch einmal für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nun können jeweils 0,5 ml Aliquots in Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und in flüssigem Stickstoff direkt

eingefroren werden.

Die transformationskompetenten Bakterien können nun bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 3.5.1.2 Herstellung der Co-Integrate und deren Identifizierung

Die kompetenten Bakterien aus 3.5.1.1 werden mit einem zuvor hergestellten Shuttlevektor transformiert. Der Shuttlevektor enthält die zu inserierende Sequenz mit jeweils auf jeder Seite flankierenden 500 Basenpaaren der Zielsequenz der Homologie. Der Shuttlevektor beinhaltet sowohl das Gen für die Tetrazyklinresistenz als auch die Sequenz für das RecA Protein, um das Rekombinationsereignis zwischen Shuttlevektor und BAC Vektor zu ermöglichen. Dazu werden 10  $\mu\text{l}$  aus einer Alkalipräparation (3.1.1.1) des Shuttlevektors und 200  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension benutzt. Die Transformation erfolgt wie unter 3.2.3.3 beschrieben mit  $37^{\circ}\text{C}$  als Transformationstemperatur.

1/10 der transformierten Bakterien werden auf LB Platten mit Tetrazyklin (10  $\mu\text{g/ml}$ ) und Chloramphenicol (12,5  $\mu\text{g/ml}$ ) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei  $30^{\circ}\text{C}$  bebrütet.

Um nun die Co-Integrate zu erzielen, werden bis zu 6 Einzelkolonien gepickt und jeweils in 1 ml LB Medium verdünnt. Die Behältnisse werden auf einem Strudelmischer durchgemischt, anschließend werden je 100  $\mu\text{l}$  der Suspension auf je 2 LB Platten mit Tetrazyklin (10  $\mu\text{g/ml}$ ) und Chloramphenicol (12,5  $\mu\text{g/ml}$ ) ausgestrichen, insgesamt 12 Platten. Jeweils eine wird nun über Nacht bei  $43^{\circ}\text{C}$ , die andere bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Auf den  $30^{\circ}\text{C}$  Platten ist am nächsten Morgen ein dicker Bakterienrasen zu sehen. Auf den Platten, die bei  $43^{\circ}\text{C}$  inkubiert wurden, sind ungefähr ein Dutzend Kolonien zu sehen, die auf einem viel dünnerem Bakterienrasen wachsen. Von diesen Bakterien werden ungefähr 20 gepickt und in 2 ml LB Medium mit Tetrazyklin (10  $\mu\text{g/ml}$ ) und Chloramphenicol (12,5  $\mu\text{g/ml}$ ) über Nacht bei  $43^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Mit diesen Kulturen wird am nächsten Morgen eine DNS Minipräparation (3.1.1.1) durchgeführt. Die so gewonnene DNS wird mit dem jeweils geeigneten Enzym verdaut und auf ein Gel aufgetragen. Die Analyse erfolgt durch einen Southern Blot (3.5.1.4, 3.5.1.6, 3.5.1.7).

### 3.5.1.3 Auflösung der korrekt entstandenen BACs

Um die Co-Integrate korrekt aufzulösen, wird eine der positiven Kolonien aus 3.5.1.2 verwendet. Diese Kolonie wird auf einer LB Platte mit Chloramphenicol (12,5  $\mu\text{g/ml}$ )

ausgestrichen, um Einzelkolonien zu bekommen. Die Platte wird bei 43°C über Nacht inkubiert. Dadurch verlieren einige Bakterien den Shuttlevektor und somit auch die Resistenz gegen Tetrazyklin und die Sensitivität gegenüber Temperaturen oberhalb von 40°C (2.3.11).

Um auf die Abwesenheit der Resistenz zu selektionieren werden 8-16 Einzelkolonien gepickt, in LB Medium verdünnt und auf TB Platten mit Fusaric Acid (12,5 µg/ml) und Chloramphenicol (12,5 µg/ml) ausgestrichen. Hierbei können 2-8 Kolonien pro Platte benutzt werden. Diese Platten werden bei 37°C für 2-3 Tage inkubiert. Diese lange Inkubationszeit ist notwendig, da aufgrund des Fusaric Acids die Kolonien nur sehr langsam wachsen. Kolonien, deren Bakterien noch die Tetrazyklin Resistenz beinhalten, sollten auch nach so langer Inkubationszeit nicht wachsen.

10-20 dieser Kolonien werden nun gepickt und für eine DNS Minipräparation (3.1.1.1) über Nacht in 2ml LB Medium mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml) inkubiert. Die Analyse erfolgt durch einen Southern Blot (3.5.1.4, 3.5.1.6, 3.5.1.7, 3.5.1.6). Diese Kolonie wird für eine BAC DNS Maxipräparation verwendet.

### 3.5.1.4 Gewinnung von Membranen mit immobilisierter DNS für Southern Blot mit DIG markierten Sonden

Nach einer Aufreinigung genomischer DNS (siehe 3.1.1.4 und 3.1.1.5) werden 20 µg mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten und elektrophoretisch in einem Agarosegel geeigneter Konzentration aufgetrennt (ÜN, 2-5 V/cm<sup>2</sup>).

Anschließend wird das Gel mit einem Fluoreszenzlineal als Größenmaßstab unter dem UV-Transilluminator dokumentiert. Zur Depurinierung der DNS wird das Gel 10 min in Depurinierungs-Lsg. auf einer Wippe bei RT inkubiert. Das Gel wird kurz mit Wasser gespült und 30 min bei RT auf der Wippe in Denaturierungs-Lsg. inkubiert. Zum Aufbau des Blots wird eine Glasplatte quer auf eine mit 20xSSC-Lsg. gefüllte Melaninschale gelegt. Auf dieser Glasplatte liegen zwei mit Denaturierungs-Lsg. angefeuchtete 3mm-Papiere (Brücke), die an beiden Enden in den Puffer reichen. Auf das 3mm-Papier wird mit den Taschenöffnungen nach unten das Gel gelegt, das von der in Denaturierungs-Lsg. äquilibrierten Nylonmembran (Nylonmebrane positively charged) vollständig bedeckt wird. Auf die Membran werden zwei in Puffer getränkte 3mm-Papiere in Gelgröße gelegt. Luftblasen müssen beim Blot-Aufbau vermieden bzw. entfernt werden. Die freie Glasplatte

und die Brücke werden mit Parafilm abgedeckt, so dass der Kapillarsog nur durch das Gel und die Membran stattfindet. Der Blot-Aufbau wird mit zwei 15 cm hohen Stapeln Handtuchpapier (Tork) abgeschlossen sowie mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert. Der Transfer findet ÜN oder über das Wochenende statt. Anschließend wird bei dem Abbau mit einem Bleistift die Position der Geltaschen auf der Nylonmembran markiert. Die Nylonmembran wird kurz in 2x SSC gewaschen, um Gelreste zu entfernen und Salzkristallbildung zu vermeiden. Nachdem die Membran 1 h bei RT getrocknet ist, wird die DNS bei der Auto Einstellung UV-vernetzt (UV Stratalinker 2400). Die Vollständigkeit des DNS-Transfers wird durch Betrachten des Gels auf dem UV-Transilluminator überprüft und dokumentiert.

### 3.5.1.5 Überprüfung der BAC DNS Bibliothek

Um die Filter der BAC DNS Bibliothek (#731) auf positive Klone zu überprüfen, welche mit einer gegebenen Sonde hybridisieren, wird wie unter 3.4.2.3 vorgegangen. Die Auswertung der Klone erfolgt wie in der dazugehörigen Bedienungsanleitung beschrieben. Jeder Filter enthält dabei 27.648 Klone, wobei jeweils 48x48 Boxen aus 24 Klonen bestehen. Für die Bestimmung eines positiven Klones werden zuerst die x-y Koordinaten von jedem Block mit einem positiven Signal anhand der beiliegenden Schablone bestimmt. Als zweites wird die Position innerhalb dieses Blocks ebenfalls mit Hilfe der Schablone bestimmt, danach die Position innerhalb des 5x5 Blockes berechnet.

Die Berechnung erfolgt nach dem folgenden Schema:

1.  $x=5(X-1)+x'$
2.  $y=5(Y-1)+y'$

Wobei 5 dem 5x5 Array entspricht. X,Y entsprechen den Koordinaten des Blocks auf dem Filter. x',y' bezeichnen den Koordinaten jedes Klons innerhalb eines Arrays. x und y entsprechen dann den finalen Koordinaten jedes Klons anhand derer die Klonnummer bestimmt wird.

### 3.5.1.6 Hybridisierung mit DIG markierten Sonden

Die Herstellung der DIG (Digoxigenin-dUTP) markierten Sonde wird mit dem Reagenzienkit (#1585614) der Firma Roche durchgeführt. Dabei wird 1 µg der Sonden

## Methoden

DNS mit doppel destilliertem Wasser zu einem Endvolumen von 16 µl aufgefüllt. Die DNS wird in einem kochendem Wasserbad für 10 Minuten denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nun werden 4 µl aus Gefäß 1 (Hersteller Mischung mit DIG markierten Oligonucleotiden und Polymerasen) zu der denaturierten DNS gegeben und für eine Stunde oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen der Probe auf 65°C gestoppt.

Für die Hybridisierung werden diese 20 µl für fünf Minuten auf 100°C erhitzt und anschließend schnell auf Eis abgekühlt. Die Nylonmembran wird in eine Hybridisierungsröhre überführt und bei einer Temperatur zwischen 37°C und 42°C für 30 Minuten mit 10 ml Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Die genaue Hybridisierungstemperatur ( $T_{opt.}$ ) ergibt sich aus der folgenden Formel anhand der Sondensequenz:

$$1. T_m = 49,82 + 0,41 (\% G + C) - (600/l) [l = \text{Länge der Sonde in bp}]$$

$$2. T_{opt.} = T_m - 20-25^\circ\text{C}$$

Die denaturierte DNS wird nun zu der Vorhybridisierungslösung in der Hybridisierungsröhre gegeben. Die Hybridisierungsröhre wird jetzt für 4 Stunden oder über Nacht bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wird die Membran aus der Hybridisierungsröhre herausgenommen und 2 mal 5 Minuten mit 2xSSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wird die Membran bei ca. 65-68°C mit 2xSSC, 0,1%SDS 15 Minuten gewaschen. Die Membran ist nun bereit für die sich anschließende Detektion der Sonde.

### 3.5.1.7 Nachweis der Sonde nach Hybridisierung mit DIG markierter Sonde

Der Nachweis der Sonde wird ebenfalls mit dem Reagenzienkit (#1585614) der Firma Roche durchgeführt, aufgeführte Lösungen stammen aus dem Kit. Die aus 3.5.1.6 vorbereitete Membran wird 1-5 Minuten in Waschpuffer äquilibriert. Nach dem Waschen wird die Membran für 30 Minuten in Blockierungslösung inkubiert. Danach wird für 30 Minuten in der Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wird 2 mal 15 Minuten mit dem Waschpuffer gewaschen und danach für 1-5 Minuten im Detektionspuffer äquilibriert. Die Membran wird mit der DNS Seite nach oben auf eine Entwicklungsfolie gelegt und mit ca.



1ml CSPD Lösung überfüttert. Die Folie wird geschlossen und die Lösung auf der Membran luftblasenfrei verteilt. Nach 5 Minuten wird das überschüssige CSPD aus der Folie mit grünen Tüchern herausgestrichen. Nun wird die Membrane in der Folie eingeschweißt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Detektion der chemiluminiszenten Lichtreaktion mit Hilfe eines Röntgenfilms.

### 3.5.1.8 DNS Maxipräparation von BAC DNS

Zur Aufreinigung großer Mengen von BAC DNS werden 500 ml Bakterienkultur verwendet. Dafür werden aus einer Gefrierkultur des aufzureinigenden Bakterien Klones ca. 10 µl entnommen und über Nacht in 2 ml LB Medium mit Chloramphenicol (12,5µg/ml) bei 37°C inkubiert. Diese Vorkultur wird am nächsten Tag verwendet, um 500 ml LB Medium mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml) anzuimpfen. Diese Kultur wird 24 Stunden inkubiert.

Der erste Schritt der Präparation erfolgt wie unter 3.1.1.2 beschrieben. Für die Entfernung der RNS, wird die resultierende DNS Lösung mit 1 Volumen 3 M Natrium Acetat Lösung und 2 Volumen Ethanol abs. versetzt und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wird mit mehr als 10.000 g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und für einige Minuten gewartet, damit das Ethanol verdampfen kann.

Das Pellet wird nun in 1ml TE (ph 8,0), versetzt mit RNase A ( $\geq 100\mu\text{g/ml}$ ) aufgenommen. Danach werden 3 ml 4 M Lithium Chlorid Lösung dazu gegeben. Die Lösung wird nun für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Daran schließt sich eine Zentrifugation von 15 Minuten bei 4°C an bei 12.000 g. Der Überstand wird nun in ein frisches 50 ml Falcon Gefäß übernommen, und 6 ml Isopropanol werden hinzugefügt. Nun wird wieder zentrifugiert, 15 Minuten bei 4°C und mit 12.000g. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und es werden 5-10 ml 70% Ethanol hinzugefügt. Das Gefäß wird kurz geschüttelt und wieder zentrifugiert wie oben. Danach wird der Überstand vorsichtig verworfen und das Pellet einige Minuten trocknen gelassen. Das Pellet wird dann in TE Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

Zur weiteren Aufreinigung der DNS wird eine Caesium Chlorid Gradienten Zentrifugation (3.5.1.9) durchgeführt. Die daraus gewonnene DNS kann für Analyse durch Puls Gel Elektrophorese (3.5.1.10) oder für die Oozyten Injektion verwendet werden.

### 3.5.1.9 Caesium Chlorid Gradienten Zentrifugation

Die aus 3.5.1.8 gewonnene DNS wird in 3 ml TE Puffer aufgenommen und in eine Quickseal Säule pipettiert. Dazu werden 500 µl 1%ige Ethidiumbromid Lösung gegeben. Dazu werden 6,9 ml Caesium Chlorid Lösung (gesättigt in TE Puffer) pipettiert. Die Säule wird nun mit TE Puffer aufgefüllt, bis keine Luft mehr in der Säule ist. Danach wird die Säule verschweißt. Es wird mit 60.000 rpm bei 20°C 15-16 Stunden zentrifugiert.

Die Säule wird nach der Zentrifugation oben vorsichtig aufgeschnitten und unter UV Licht werden die beiden oberen Banden mit 5 ml Pipetten einzeln in 15 ml Falcon Gefäße überführt.

Das Ethidiumbromid wird nun durch Phasentrennung entfernt. Dafür werden jeweils im Volumenverhältnis 1:1 die Falcon Gefäße mit Isopropanol, gesättigt mit Caesium Chlorid, aufgefüllt. Die obere Phase wird nach einigen Minuten (5-10) entfernt. Das wird so lange wiederholt, bis die obere Phase komplett klar ist.

Die restliche Lösung mit der DNA wird in Dialyse Membranen pipettiert (Biomol #1362), wobei die beiden Öffnungen der Schläuche mit Klammern verschlossen werden. Diese Schläuche werden 2 Stunden in 2l 1x TE Puffer auf einem Rührer inkubiert. Danach wird das TE gegen frisches ausgetauscht. Anschließend wird über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Ende ist das Caesium Chlorid aus der DNS Lösung entfernt.

Die resultierende DNS Lösung kann für weitere Analysen verwendet werden.

### 3.5.1.10 Puls-Feld Gel Elektrophorese zur Auftrennung großer DNS Fragmente

Die aus 3.5.1.9 gewonnene DNS kann mit Hilfe der Puls-Feld Gel Elektrophorese analysiert werden. Dafür werden 50 µl dieser DNS Lösung eingesetzt. Es wird die CHEF-DR II Anlage von Bio-Rad verwendet. Dafür wird ein 1%iges Agarose Gel mit 0,5x TBE in der zur Anlage gehörenden Form gegossen. Nach dem Aushärten wird die Elektrophorese in der Anlage mit 0,5x TBE durchgeführt. Dafür wird die Elektrophorese Kammer mit ca. 2 Liter 0,5x TBE gefüllt. Das Gel wird aus der Form gelöst und vorsichtig in die dafür vorgesehene Halterung in der Kammer überführt. Die Proben können mit Standard Blaumarker versetzt und in die Taschen pipettiert werden. Von dem Größenstandard (wird bei -20°C in einer 1 ml Spritze gelagert) wird eine ca. 1 mm dicke

## Methoden

Scheibe mit einer scharfen Klinge abgeschnitten und in die erste Tasche gefüllt. Danach wird die Kammer aus Sicherheitsgründen mit dem Deckel verschlossen, da hier sehr hohe Stromstärken verwendet werden. Nun werden die Geräte eingeschaltet. Die Spannung der Stromquelle (Modell 200/2.0 von Bio-Rad) wird auf 200 V gesetzt für 12-16 Stunden. Der Pulsgenerator wird folgendermaßen eingestellt:

Der Pulsparameter wird auf 4-5 Sekunden eingestellt und die Dauer auf 12-16 Stunden. Die Zeiteinstellungen von Stromquelle und Pulsgenerator müssen übereinstimmen. Die Kühlung wird auf 14°C eingestellt. Die Pumpe muß mit 70-80% Geschwindigkeit laufen, eine geringere Geschwindigkeit führt zum Einfrieren der Kühlung. Dadurch erhitzt sich der Puffer und der Gellauf schlägt fehl. Weitere technische Details zur Anlage können der Gerätebeschreibung (Modell 200/2.0 von Bio-Rad) entnommen werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klonierung des Vektors pCx36\_CFP

Für die Herstellung einer Maus, die ein Fusionsprotein aus Cx36 und eCFP exprimiert, sollte ein Vektor hergestellt werden, der die Sequenz für Cx36 und eCFP im Leseraster beinhaltet. Dazu sollte aus den verfügbaren DNS Fragmenten des Connexin36 und verschiedener anderer Vektoren der Vektor pCx36\_CFP hergestellt werden. In diesem Vektor sollte sich die kodierende Region des Connexin36 im Leseraster mit der kodierenden Region des Fluoreszenz Proteins eCFP befinden. ECFP ist das durch Mutationen veränderte Cyan Blau fluoreszierende Protein (eCFP) der Qualle *Aequoria victoria*.

Als Ausgangvektor diente der Vektor pCX36 [Söhl Doktorarbeit, 1999]. Dieser Vektor beinhaltet beide Exons des Cx36-Gens auf einem ca. 10 kb großen *NotI*-Fragment. Auf diesem Fragment befanden sich zusätzlich etwa 100 bp Promotor-Bereiche stromaufwärts des 5' untranslatierten Bereiches (5'-UTR) von Exon1. An den ca. 4 kb großen transkribierten Bereich, bestehend aus Exon1 (591 bp), Intron (1138 bp) und Exon2 (2319 bp), schließen sich etwa 6 kb 3'-genomische Sequenzen an.

Alle hier genannten Vektoren wurden bei allen Zwischenschritten durch geeignete Restriktionsspaltungen überprüft. Vor entscheidenden Schritten und zum Abschluß wurden diese Vektoren in den Bereichen mit kodierenden Sequenz sequenziert.

### 4.1.1 Klonierung des Vektors pmj-cyan

Um einen Vektor zu erhalten, der die Puromycin und die Ampizillin Resistenz Gene besitzt und außerdem die kodierende Region des eCFP, wurde der Vektor pmj-cyan kloniert. Zur Klonierung des Vektors pmj-cyan wurde die kodierende Region für eCFP aus dem Vektor peCFP-N1 von Clontech in den Vektor pmj-Red (Joachim Degen, Doktorarbeit 2004) kloniert. Das Klonierungsschema ist auf der Abbildung 7 zu sehen. Hier wurde der Vektor peCFP-N1 mit den Enzymen *Bam*HI und *Not*I geschnitten. Das resultierende ca. 750 Basenpaare große Fragment wurde in das ebenfalls *Bam*HI und *Not*I geschnittene 5 Kilobasenpaar große Vektorrückgrat des Vektors pmj-Red inseriert. Der resultierende Vektor wurde pmj-cyan benannt.

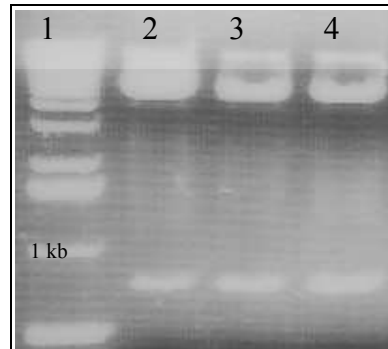


Abbildung 6: Gelfoto nach Spaltung des Vektors pmj\_cyan mit *Bam*HI und *Not*I.

Spalte 1: 1kb Leiter, Spalte 2-4 positive Klone.

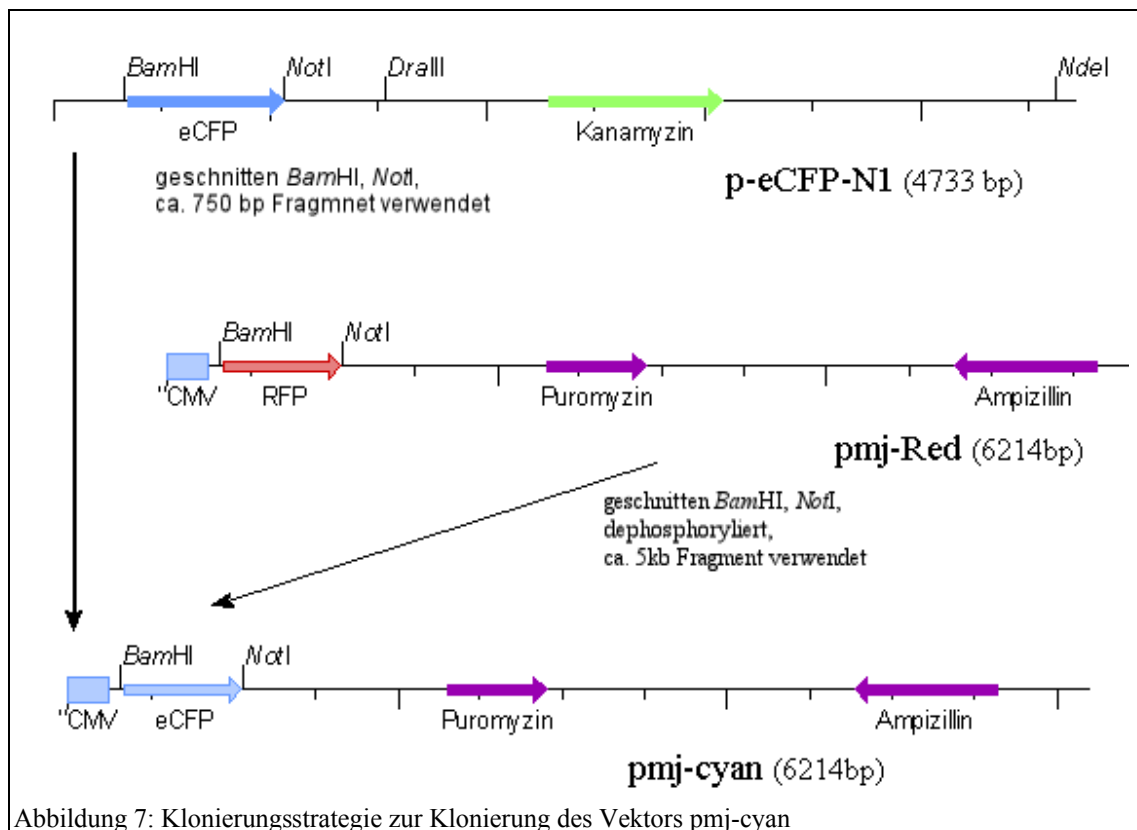


Abbildung 7: Klonierungsstrategie zur Klonierung des Vektors pmj-cyan

Dieser Vektor hat eine Größe von 6214 Basenpaaren. Die Testspaltung mit *Eco*RI und *Not*I zeigte die erwartete Bande bei ca. 780 Basenpaare, wie auf der Abbildung 6 zu sehen ist.

## Ergebnisse

Die Funktionsfähigkeit des eCFP wurde durch eine transiente Transfektion in HeLa Zellen überprüft, die Daten sind hier nicht gezeigt.

### 4.1.2 Klonierung des Vektors pmj\_cyan\_Cx36Ex2

Zur Klonierung des Vektors pmj\_cyan\_Cx36Ex2 wurde ein Teil der kodierenden Region

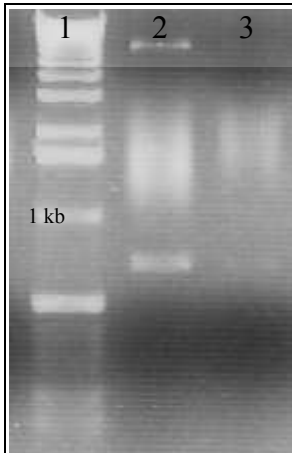
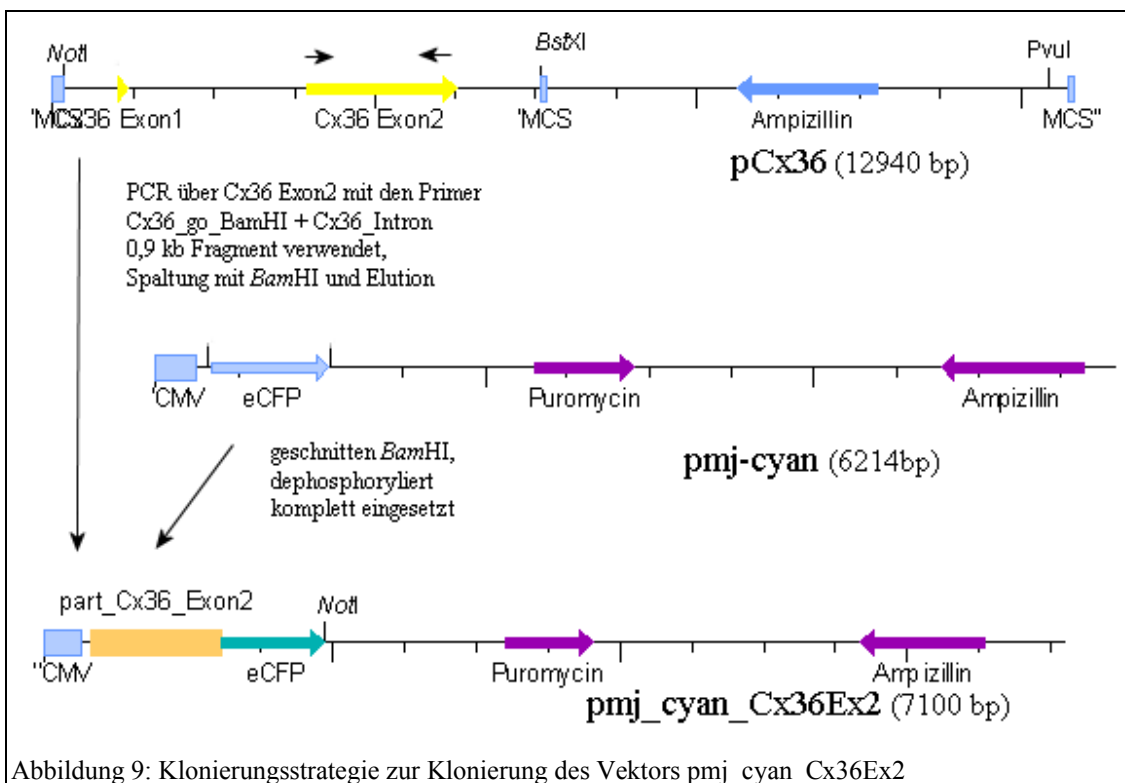


Abbildung 8: Gelfoto Testspaltung pmj\_cyan\_Cx36Ex2 mit *HindIII* und *XbaI*

Spalte 1: 1kb Leiter,  
Spalte 2: positiver Klon  
Spalte 3: neg. Klon

des Exons 2 des Cx36 aus dem Vektor pmCx36 (siehe 4.1) in den Vektor pmj-cyan (siehe 4.1.1) kloniert. Das Klonierungsschema ist auf der Abbildung 9 zu sehen. Dafür wurde eine Klonierungs PCR mit dem Vektor pCx36 durchgeführt. Dadurch sollte ermöglicht werden, dass die kodierende Region des eCFP sich später im fertigen Vektor im gleichen Leseraster befindet wie das Cx36. Durch die Verwendung einer modifizierten Primer Sequenz wurde das Stop Codon des Exons 2 des Cx36 deletiert. Für den Bereich zwischen dem Cx36 und dem eCFP wurde eine geeignet scheinende, sechs Aminosäuren lange Linker Sequenz gewählt (GATCCACCGGTCGCCACC). Für die PCR wurden die Primer Cx36\_go\_BamHI und CX36\_Intron (siehe 2.3.8) verwendet.



Die PCR amplifizierte ein ca. 900 Basenpaar großes DNS Fragment. Dieses wurde nach

## Ergebnisse

der PCR mit dem Enzym *Bam*HI verdaut, über ein Agarosegel aufgereinigt und für die Ligation verwendet.

Der Vektor pmj-cyan (siehe 4.1.1) wurde mit dem Enzym *Bam*HI gespalten, die komplementären Enden der DNS wurden dephosphoryliert, um eine Selbstligation zu vermeiden. Beide DNS Fragmente wurden ligiert. Der resultierende Vektor pmj\_cyan\_Cx36Ex2 ist ca. 7100 Basenpaare groß. Die Spaltung mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Xba*I zeigte auf dem Gelfoto die erwartete Bande bei ca. 750 Bp.

### 4.1.3 Klonierung pmj\_cyan\_Cx36Ex2\_3UTR

Zur Klonierung des Vektors pmj\_cyan\_Cx36Ex2\_3UTR wurde ein Teil des 3' Bereichs des Cx36 aus dem Vektor pmCx36 (siehe ) mit Hilfe einer PCR in den Vektor pmj\_cyan\_Cx36Ex2 (siehe ) kloniert, um einen möglichst nativen Zustand der Sequenz wieder herzustellen und das natürliche, Cx36 eigene PolyA-Signal verwenden zu können. Das Klonierungsschema ist auf der zu finden. Hierbei wurde eine PCR mit den Primern Cx36\_3UTR\_xba und Cx36\_xba\_3UTR und dem Vektor pmCx36 durchgeführt. Das resultierende 800 Bp große DNS Fragment wurde anschließend mit *Xba*I gespalten, die Enden aufgefüllt und danach über ein Agarosegel aufgereinigt und für die Ligation eingesetzt. Der Vektor pmj\_cyan\_Cx36Ex2 wurde mit *Not*I verdaut, die Enden ebenfalls aufgefüllt, dephosphoryliert und für die Ligation eingesetzt. Der resultierende Vektor pmj\_cyan\_Cx36Ex2\_3UTR ist ca. 7900 Bp groß. Die Testspaltung mit *Bbr*pI und *Hind*III zeigte wie erwartet die Bande bei 1,8 kb.

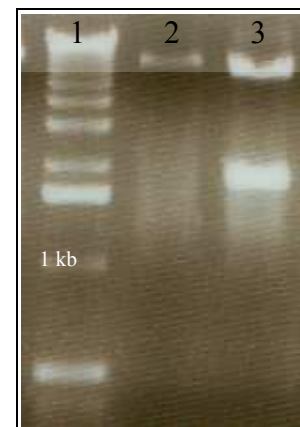
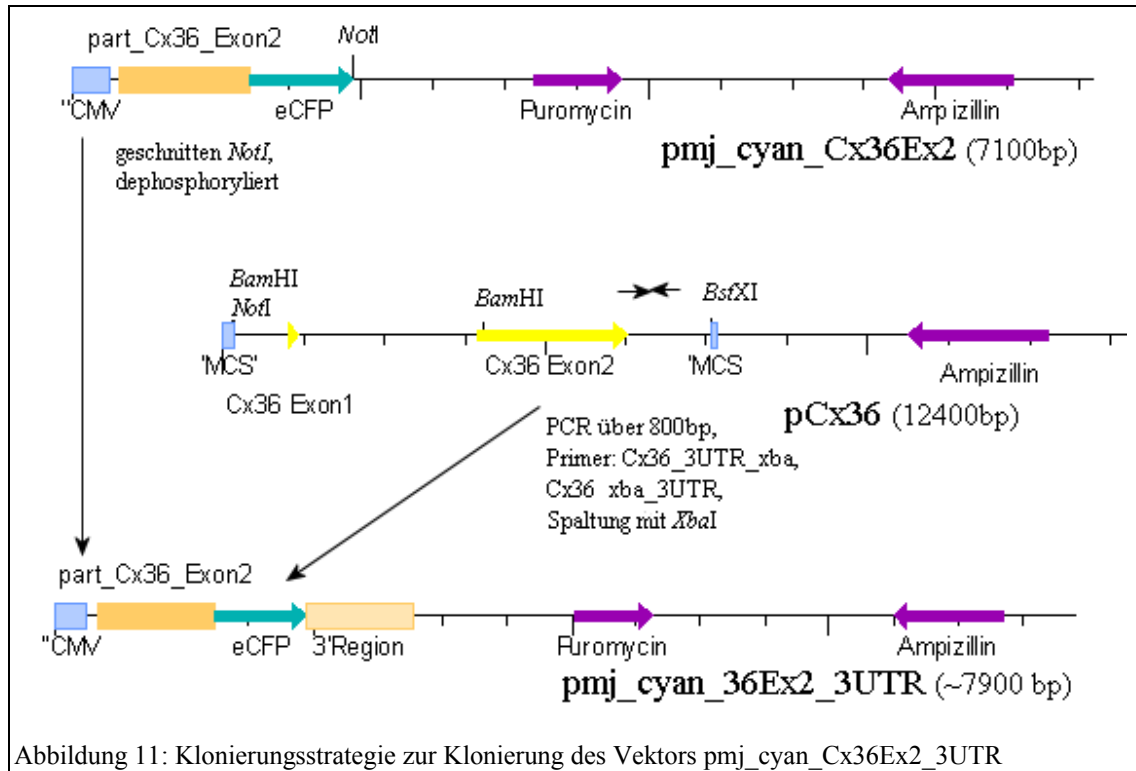


Abbildung 10: Gelfoto Testspaltung pmj\_cyan\_Cx36Ex2\_3utr mit *Bbr*pI und *Hind*III

Spalte 1: 1kb Leiter,  
Spalte 2: neg. Klon  
Spalte 3: positiver.  
Klon



#### 4.1.4 Klonierung pCx36\_CFP

Für die Klonierung des Vektors pCx36\_CFP wurde ein Teil aus dem Vektor pmCx36 mit einem Teil der kodierenden Region des Exons 2 des Cx36 und des Exon 1 des Cx36 in den Vektor pmj\_cyan\_Cx36Ex2\_3UTR kloniert. Dies sollte der letzte Zwischenschritt für den fertigen Insertionsvektor werden. Das Klonierungsschema findet man auf der Abbildung 13.

Dazu wurde der Vektor pmCx36 mit *NheI* und *XhoI* gespalten und dephosphoryliert. Das resultierende Fragment wurde dann in den ebenfalls *NheI* und *XhoI* geschnittenen Vektorrückgrat des Vektors pmj\_cyan\_Cx36Ex2\_3UTR kloniert. Der resultierende Vektor wurde pCx36\_CFP benannt und ist ca. 10000 Bp groß. Der Testspaltung mit *SmaI* auf Abbildung 12 zeigt die erwartete Bande bei ca. 750 Bp.

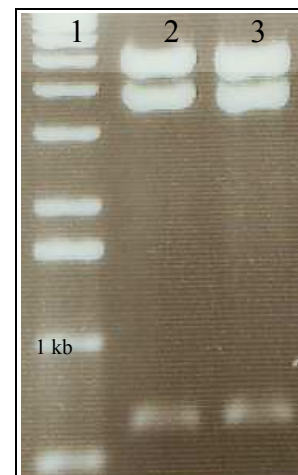
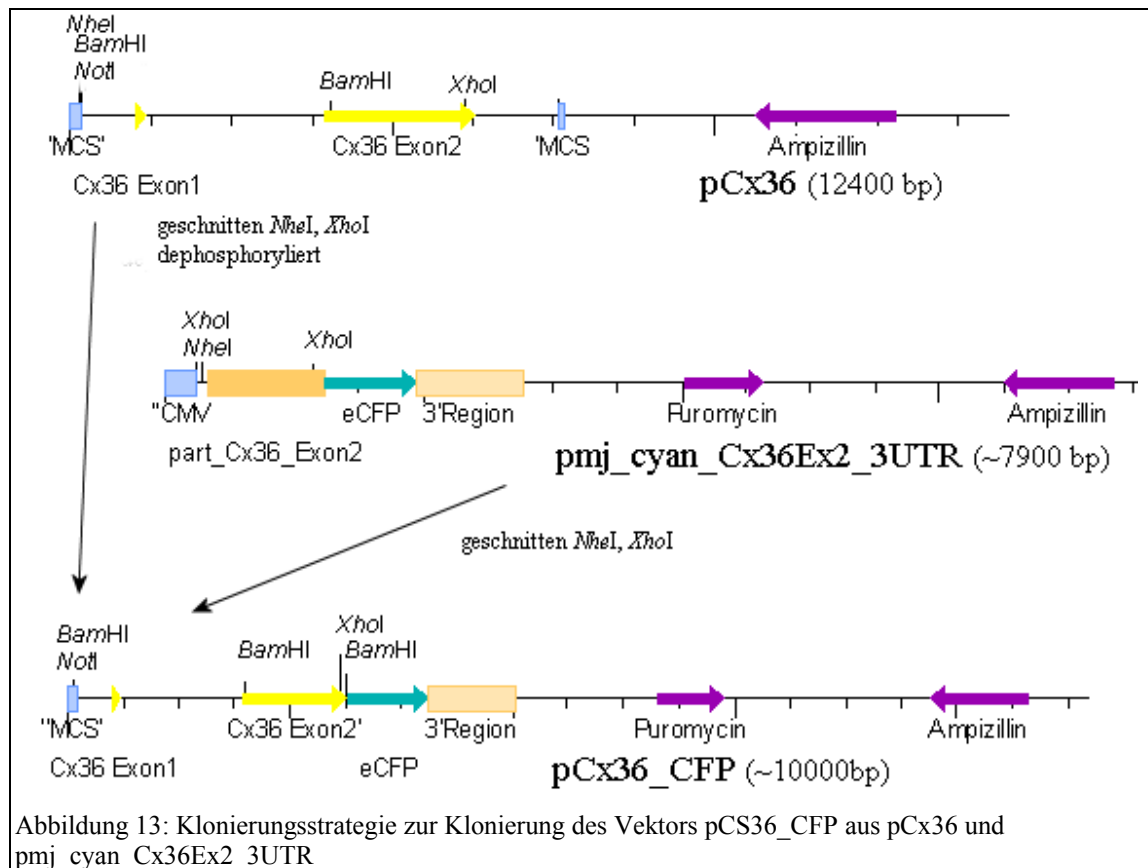


Abbildung 12: Gelfoto Spaltung pCx36\_CFP mit *SmaI*

Spalte 1: 1kb Leiter, Spalte 2 und 3: positiver Klon



## Ergebnisse



Der hieran anfolgende letzte Schritt wurde nicht mehr durchgeführt, da dieses Projekt eingestellt wurde aufgrund der weit fortgeschrittenen Arbeiten zum selben Thema durch eine andere Arbeitsgruppe (Feigenspan et al. 2003).

Aufgrund dieser Entscheidung wurde ein weiteres Projekt gestartet, die Klonierung eines Vektors für die Herstellung einer Maus, die Cx45 mit eCFP oder eGFP als Fusionsprotein exprimieren soll.

## 4.2 Klonierung des Vektors pSV\_45GFP für die homologe Rekombination in *E.coli* Bakterien

Für die Klonierung des Vektors pSV\_45GFP wurden der Vektor pmj-cyan (siehe 4.1.1), pmj-green (Joachim Degen, Doktorarbeit 2003), der Vektor Cx45\_Xba3000 (Hendrik Brune, Diplomarbeit 1999) und der Vektor pSV\_RecA (Heintz et al., 1999) verwendet.

Der resultierende Vektor pSV\_45\_GFP sollte das Cx45 im Leseraster mit der kodierenden Region des eGFP (das durch Mutationen verstärkt grün fluoreszierende Protein der Qualle *Aequoria victoria*) enthalten, zusätzlich dazu 500 Basenpaare des Exon 3 des Cx45 im Leseraster mit der Sequenz für das eGFP und deletiertem Stopp Codon, außerdem 500 Basenpaare des 3' Bereichs des Cx45. Diese beiden 500 Basenpaar Bereiche sind notwendig, um eine homologe Rekombination mit einem BAC (Bacterial Artificial Chromosome) in *E.coli* Bakterien durchführen zu können. Mit Hilfe dieser homologen Rekombination sollte ein BAC Vektor entstehen, mit dessen Hilfe Mäuse erzeugt werden sollten, die das Cx45 in Fusion mit dem eGFP exprimieren. Die Entscheidung eCFP zu verwenden wurde im Laufe der Klonierung zugunsten des eGFP geändert. Somit sind die ersten Klonierungsschritte mit eCFP vollzogen worden.

### 4.2.1 Klonierung des Vektors pmj\_45Ex3

Zur Klonierung des Vektors pmj\_45Ex3 wurde ein Teil des Exon3 des Connexin45 aus dem Vektor Cx45\_xba3000 kloniert und im Leseraster mit eCFP in den Vektor pmj-cyan kloniert. Das Klonierungsschema ist auf der Abbildung 16 Teil1 zu sehen. Es wurde eine PCR mit den Primern xba\_go\_end und end\_go\_xba sowie dem Vektor Cx45\_xba3000 durchgeführt. Das daraus entstandene ca. 500 Bp große DNS Stück wurde mit *Bam*HI geschnitten und aufgereinigt. Der Vektor pmj-cyan wurde mit *Bam*HI geschnitten und dephosphoryliert. Beide DNS Stücke wurden ligiert. Der resultierende Vektor wurde als pmj\_45Ex3



Abbildung 14: Gelfoto Testspaltung pmj\_45Ex3 mit *Nhe*I und *Bam*HI

Spalte 1: 1 kb Leiter, Spalte 2 und 3: neg. Klon, Spalte 4: positiver Klon

## Ergebnisse

bezeichnet. Die Testspaltung mit *NheI* und *BamHI* zeigte wie erwartet eine Bande bei ca. 500 Basenpaaren, wie auf Abbildung 14 zu sehen.

### 4.2.2 Klonierung des Vektors pmj\_Cx45cyan\_transbac

Das Klonierungsschema für die Klonierung des Vektors pmj\_45cyan\_transbac kann man der Abbildung 16, Teil 2 entnehmen. Für die Klonierung wurde der Vektor pmj\_45Ex3

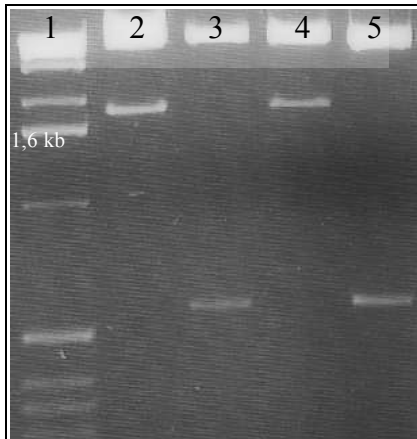


Abbildung 15: Gelfoto Testspaltung pmj\_Cx45cyan\_-transbac mit *XhoI* und *NotI*

Spalte 1: 1 kb Spalte, Spalte 2 und 4 Klon 1 und 2 Spaltung mit *XhoI*, Spalte 3 und 5: Spaltung Klon 1 und 2 mit *NotI*

(siehe 4.2.1) mit *NotI* geschnitten und dephosphoryliert.

Außerdem wurde eine PCR mit den Primern go utr\_xho\_neu und go\_end\_utr\_neu sowie dem Vektor Cx45\_xba3000 (siehe 4.2) durchgeführt. Das daraus

amplifizierte ca. 500 Bp große DNS Stück wurde mit *NotI* geschnitten und aufgereinigt. Beide DNS Stücke

wurden zu einem Ligationsansatz gegeben. Der hier entstandene Vektor wurde pmj\_45cyan\_transbac

bezeichnet. Die Testspaltung mit *XhoI* zeigte wie erwartet eine Bande bei 1,9 kb (Abbildung 15, Spalte 1),

die Spaltung mit *NotI* eine Bande bei ca. 600 Basenpaaren (Abbildung 15, Spalte 2).

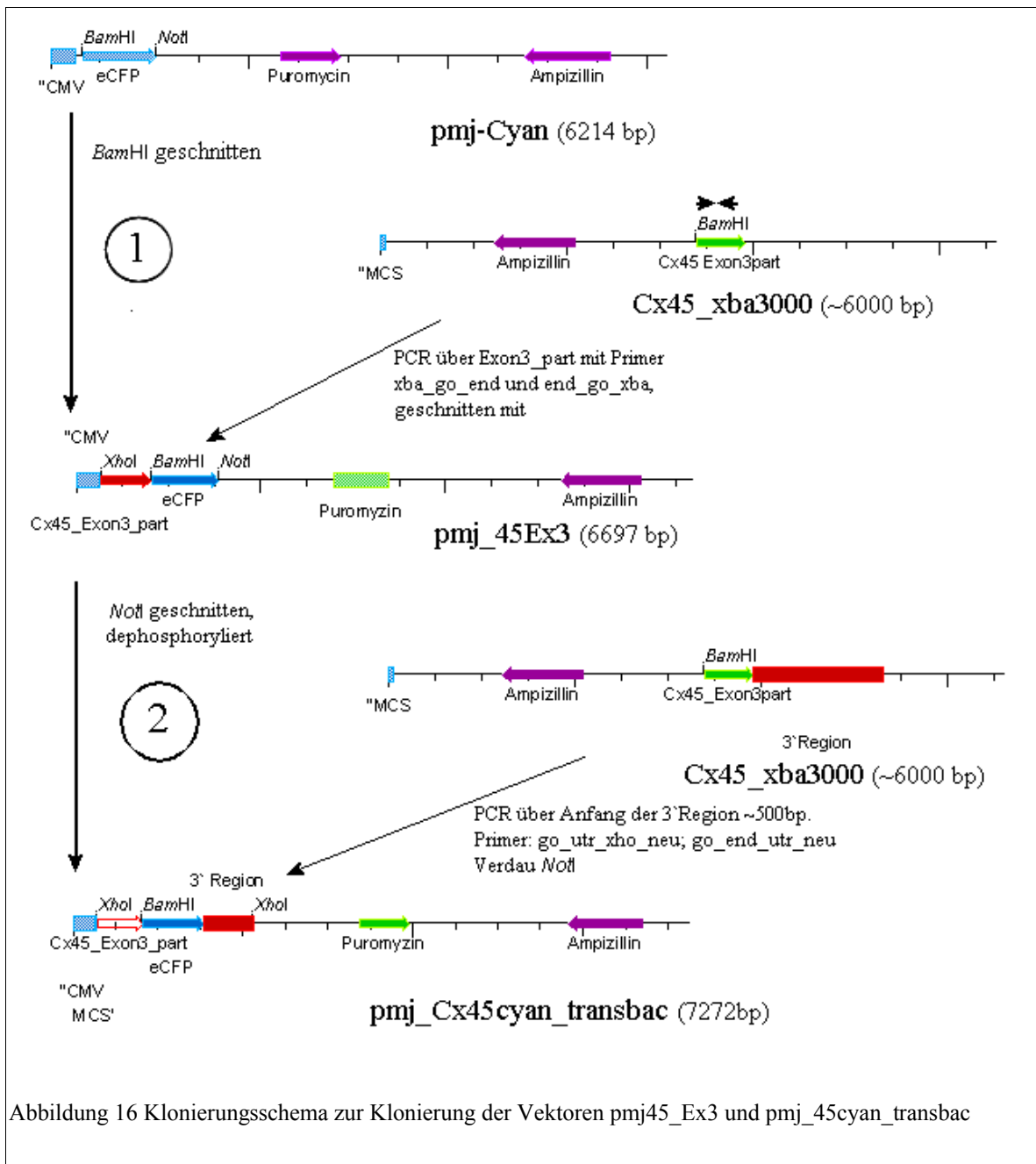


Abbildung 16 Klonierungsschema zur Klonierung der Vektoren pmj45\_Ex3 und pmj\_45cyan\_transbac

### 4.2.3 Klonierung des Vektors pmj\_45\_gfp\_transbac

Aufgrund einer Strategieänderung, bei der entschieden wurde, parallel zur Erzeugung des BAC Vektors einen „Insertions Vektors“ zu erzeugen, sollte der spätere BAC Vektor für eGFP anstatt eCFP als Fluoreszenzmarker Protein kodiert. Daher mußte in dem schon fertigen Vektor pmj\_45cyan\_transbac (siehe 4.2.2) die Sequenz für eCFP gegen die Sequenz für eGFP ausgetauscht werden. Das Klonierungsschema für die folgende

## Ergebnisse

Klonierung kann man der Abbildung 18 entnehmen. Es wurde hierfür der Vektor `pmj_45cyan_transbac` mit den Enzymen *Bam*HI und *Not*I geschnitten. Es wurde weiterhin eine PCR mit den Primern `BamHI_go_cfp_p_eco81I_new` und `endcfp_go_bamhi_neu` sowie dem Vektor `pmj_green` (Joachim Degen, Doktorarbeit, 2003) durchgeführt. Das daraus resultierende DNS Stück wurde mit *Bam*HI und *Not*I geschnitten und aufgereinigt. In den ersten Primer wurde eine weitere Schnittstelle für das Enzym *Eco*81I eingefügt, um den korrekten Austausch der Sequenzen überprüfen zu können. Beide DNS Stücke wurden ligiert und der entstandene Vektor `pmj_45_gfp_transbac` oder auch als `pmj_45_gfp` bezeichnet. Die Testspaltung mit *Eco*81I zeigte eine Bande auf der Höhe von 2,1 kb, womit die korrekte Insertion nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 17).

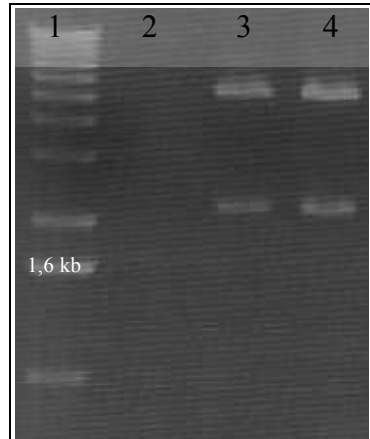
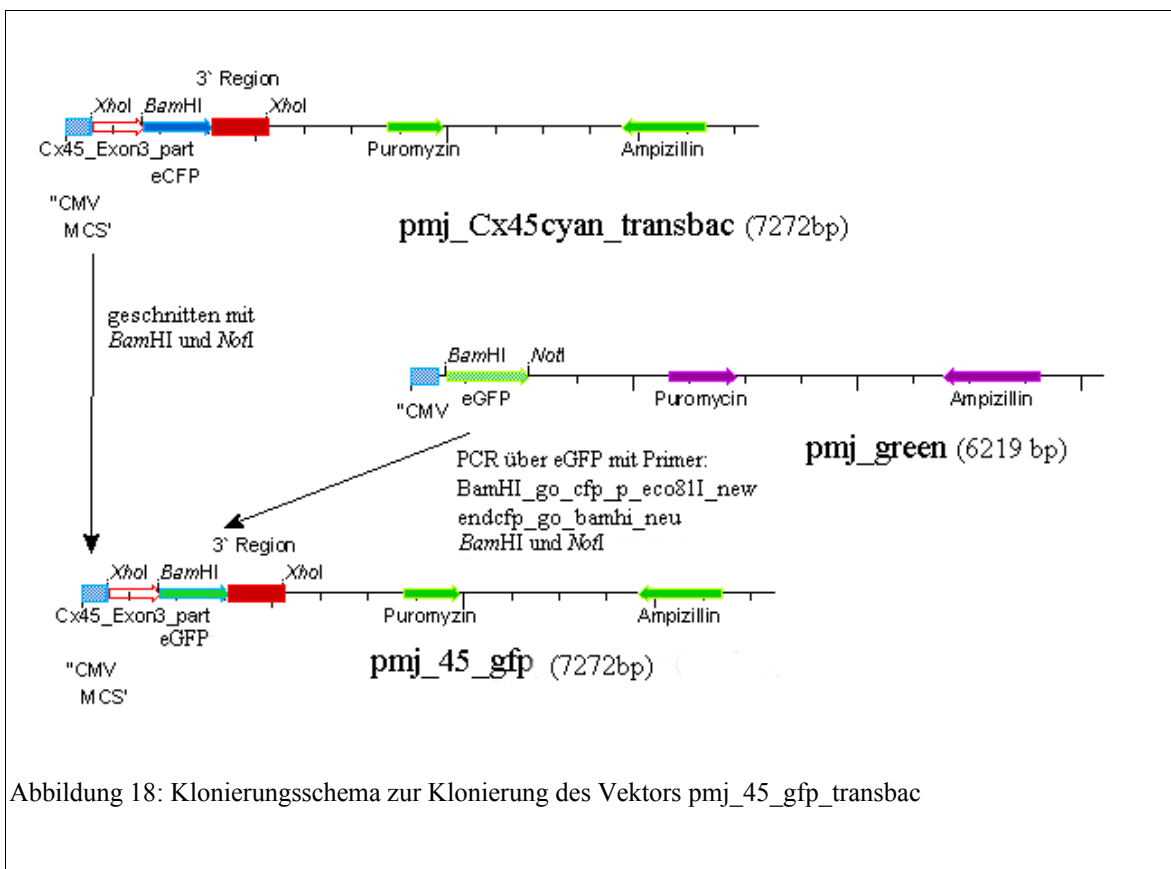


Abbildung 17: Gelfoto Testspaltung `pmj_45_gfp_transbac` mit *Eco*81I

Spalte 1: 1 kb Leiter, Spalte 2 neg. Klon, Spalte 3 und 4 positiver Klon.

Die Testspaltung mit *Eco*81I zeigte eine Bande auf der Höhe von 2,1 kb, womit die korrekte Insertion nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 17).



#### 4.2.4 Klonierung des Vektors pSV\_45\_GFP

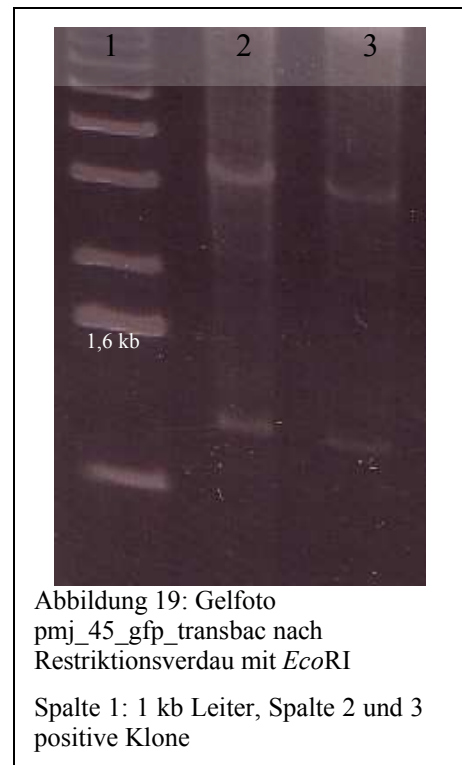
Für die homologe Rekombination in *E.coli* Bakterien mit dem BAC Vektor, der die kodierende DNS des Cx45 beinhaltet, wurde der Vektor pSV\_45\_GFP kloniert. Dazu wurde der Bereich aus dem Vektor pmf\_45\_gfp (siehe 4.2.1), der die kodierende DNS für das eGFP enthält, ausgeschnitten, flankiert jeweils von ca. 500 Basenpaaren des Exon3 des Cx45 und der 3' Region des Cx45. Dieser Bereich wurde in den Vektor pSV1\_RecA kloniert, der sowohl eine Tetrazyklin Resistenz beinhaltet, als auch die kodierende Sequenz für das Rekombinationsprotein A. Dazu wurde der Vektor pmj\_45\_gfp mit XhoI geschnitten, das 1800 Basenpaar Fragment aufgereinigt und für die Ligation verwendet.

Der zuvor mit dem Enzym *SalI* geschnittene und dephosphorylierte Vektor pSV1\_RecA wurde ebenfalls für die Ligation eingesetzt. Kritisch bei diesem Schritt ist eine sehr sorgfältige und saubere Aufreinigung des Vektors pSV1\_RecA.

Dieser Vektor ist ein sogenanntes „Low-Copy“ Plasmid, dass bei einer DNS Midi Präparation mit dem Kit „Jetstar 2.0 Plasmid MIDI Kit“ aufgereinigt werden muss, da ansonsten die Qualität der DNS für eine erfolgreiche Klonierung nicht ausreichend ist.

Die Aufnahme der aufgereinigten DNS sollte in einem Volumen von nicht mehr als 50 µl stattfinden.

Alternativ kann hier auch die Caesium-Chlorid Aufreinigung (siehe 3.5.1.9) verwendet werden. Unsauberes Arbeiten resultiert bei diesem Schritt in der Abwesenheit positiver Klone. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* getestet, positive Klone zeigten Banden bei 1,3 und 3,1 kb (siehe Abbildung 19).



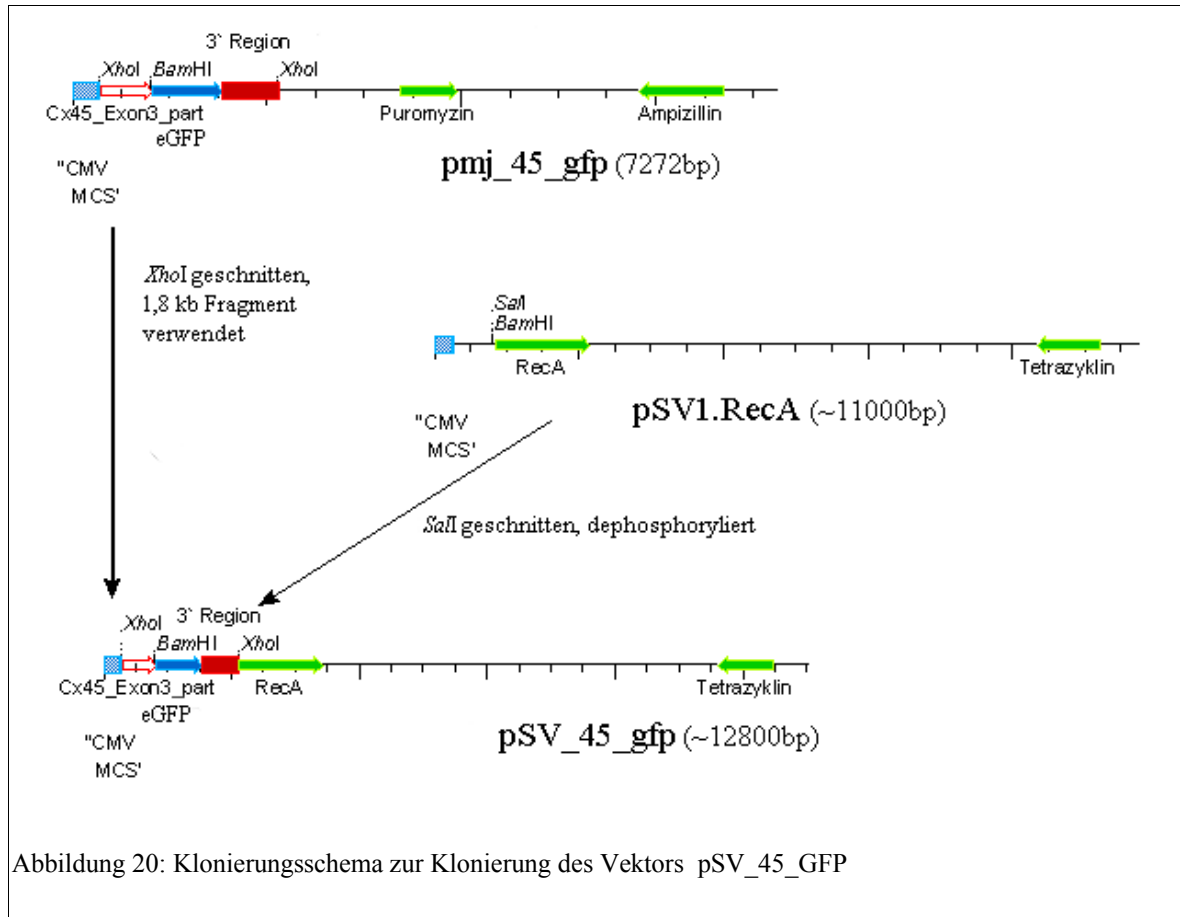


Abbildung 20: Klonierungsschema zur Klonierung des Vektors pSV\_45\_GFP

## 4.3 Klonierung des Vektors KI45\_CFP für die homologe Rekombination in ES-Zellen

Als Alternativstrategie zur Erzeugung einer transgenen Maus mit einem Fusionsprotein aus Cx45 und eGFP wurde der Vektor KI45\_CFP kloniert, der in der später daraus herzustellenden transgenen Maus ebenfalls ein Fusionsprotein exprimieren sollte. In diesem Vektor wurde allerdings das eCFP anstelle des eGFP verwendet. Dadurch besteht unter anderem die Möglichkeit, die Expression beider Fluoreszenzproteine in der lebenden Maus zu vergleichen. Als Ausgangspunkt der Klonierungsstrategie wurden die Vektoren pmj\_Cx45cyan\_transbac (siehe 4.2.2), Cx45\_xba3000, Cx45\_xba\_5000 und pBS-Sal\_frt-neo-frt benutzt. Die Vektoren Cx45\_xba3000 und Cx45\_xba5000 enthalten die Sequenzen für das Connexin45 aus der Maus inklusive der Intron und Exon Struktur und ca. 2.500 Basenpaare aus dem 3' Bereich. Der Vektor pmj\_Cx45cyan\_transbac beinhaltet die kodierende Sequenz für das eCFP im Leseraster mit einem 500 Basenpaar Teil des Exon 3 des Cx45 (genauere Details siehe 4.2.2). Der Vektor pBS-Sal\_frt-neo-frt enthält die kodierende Sequenz für das Neomycin Resistenzgen, flankiert von zwei frt Erkennungssequenzen.

Alle hier genannten Vektoren wurden bei allen Zwischenschritten durch geeignete Restriktionsspaltung überprüft. Vor entscheidenden Schritten und zum Abschluß wurden diese Vektoren in den wichtigen Bereichen sequenziert.



### 4.3.1 Klonierung des Vektors pmj\_45\_cyan\_3kut

Für die Klonierung des Vektors pmj\_45\_cyan\_3kut wurde aus dem Vektor Cx45\_xba3000 der Großteil des 3' Bereichs des Connexin45 in den Vektor pmj\_45cyan\_transbac (siehe 4.2.2) kloniert. Dadurch sollte der 3' Bereich für die spätere homologe Rekombination geschaffen werden.

Das Klonierungsschema ist auf der Abbildung 22 zu finden. Dazu wurde der Vektor Cx45\_xba3000 mit dem Restriktionsenzym *Xba*I geschnitten, danach wurden die Enden aufgefüllt. Anschließend wurde der Vektor mit *Swa*I geschnitten, so dass ein ungefähr 2700 Basenpaar großes DNS Stück ausgeschnitten wurde.

Der Vektor pmj\_45cyan\_transbac wurde mit dem Restriktionsenzym *Afl*III geschnitten, die Enden

wurden aufgefüllt und danach ebenfalls mit *Swa*I geschnitten. Das resultierende Vektorrückgrat wurde mit dem Fragment aus der Spaltung des Vektors Cx45\_xba3000 ligiert. Der resultierende Vektor wurde als pmj\_45\_cyan\_3kut bezeichnet.

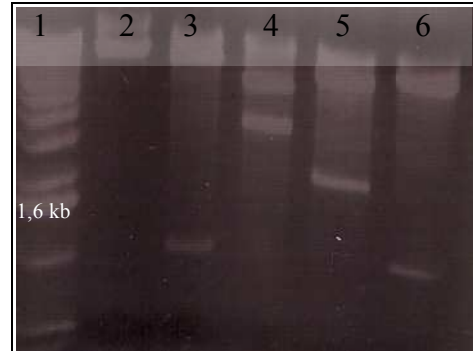


Abbildung 21: Gelfoto Testspaltung pmj\_45\_cyan\_3kut mit verschiedenen Restriktions Enzymen

Spalte 1: 1 kb Leiter, Spalte 2 ungespalten. Spalte 3-6 pos. Klone, Spalte 3 Spaltung mit *Bam*HI und *Swa*I, Spalte 4: Spaltung mit *Pst*I, Spalte 5 Spaltung mit *Bam*HI und *Kpn*I, Spalte 6 : Spaltung mit *Swa*I, *Kpn*I

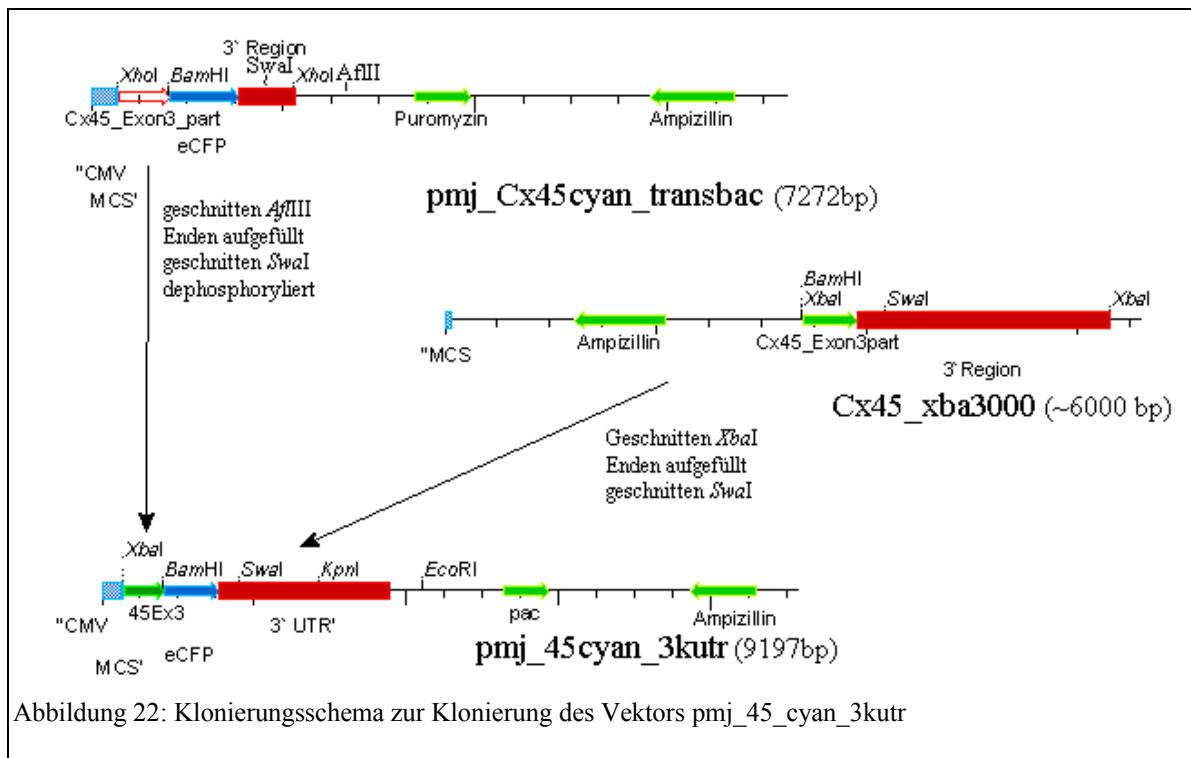


Abbildung 22: Klonierungsschema zur Klonierung des Vektors pmj\_45\_cyan\_3kut

## Ergebnisse

Die Restriktionsspaltung mit verschiedenen Enzymen zeigte wie auf Abbildung 21 zu sehen, die erwarteten Banden. Spaltung mit *Bam*HI und *Swa*I (Spalte 3) zeigte eine Bande bei 1 kb, Spaltung mit *Pst*I (Spalte 4) zeigte eine Bande bei 3,4 kb, die Spaltung mit *Bam*HI und *Kpn*I (Spalte 5) eine Bande bei 2,0 kb und die Spaltung mit *Swa*I und *Kpn*I (Spalte 6) zeigte eine Bande bei 1,05 kb.

### 4.3.2 Klonierung des Vektors pmj\_45cyan\_3kutr\_sans2.xba

Der Vektor pmj\_45\_cyan\_3kutr (siehe 4.3.1) enthält eine zusätzliche *Xba*I Schnittstelle,

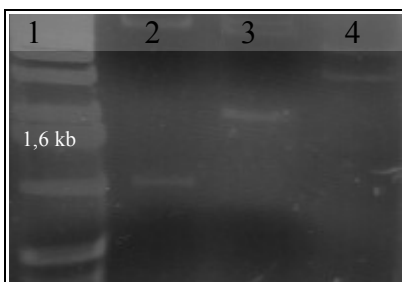


Abbildung 23: Gelfoto Testspaltung pmj\_45cyan\_3kutr\_sans2.xba mit verschiedenen Restriktions Enzymen

Spalte 1: 1 kb Leiter, Spalte 2-4: positive Klone, Spalte 2: Spaltung mit *Bam*HI und *Swa*I, Spalte 3: Spaltung mit *Bam*HI und *Kpn*I, Spalte 4 Spaltung mit *Pst*I

die bei der weiteren Klonierung hinderlich war. Um diese Schnittstelle zu elimieren, wurde die entsprechende Sequenz aus dem Vektor ausgeschnitten.

Das Klonierungsschema findet man auf der Abbildung 25.

Dabei wurde der Vektor pmj\_45\_cyan\_3kutr mit den

Restriktionsenzymen *Bbr*pI und *Eco*81I geschnitten.

Die Enden wurden aufgefüllt, der Vektor anschließend religiert und als pmj\_45cyan\_3kutr\_sans2.xba

bezeichnet. Der Testspaltung

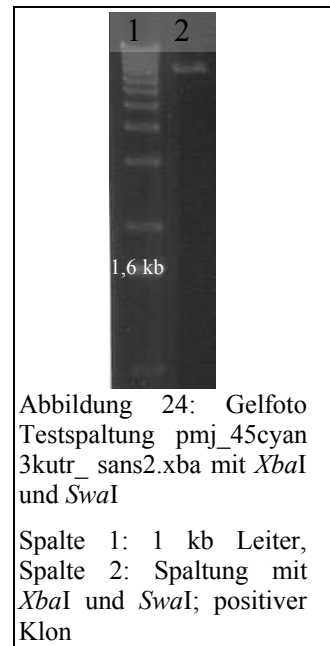
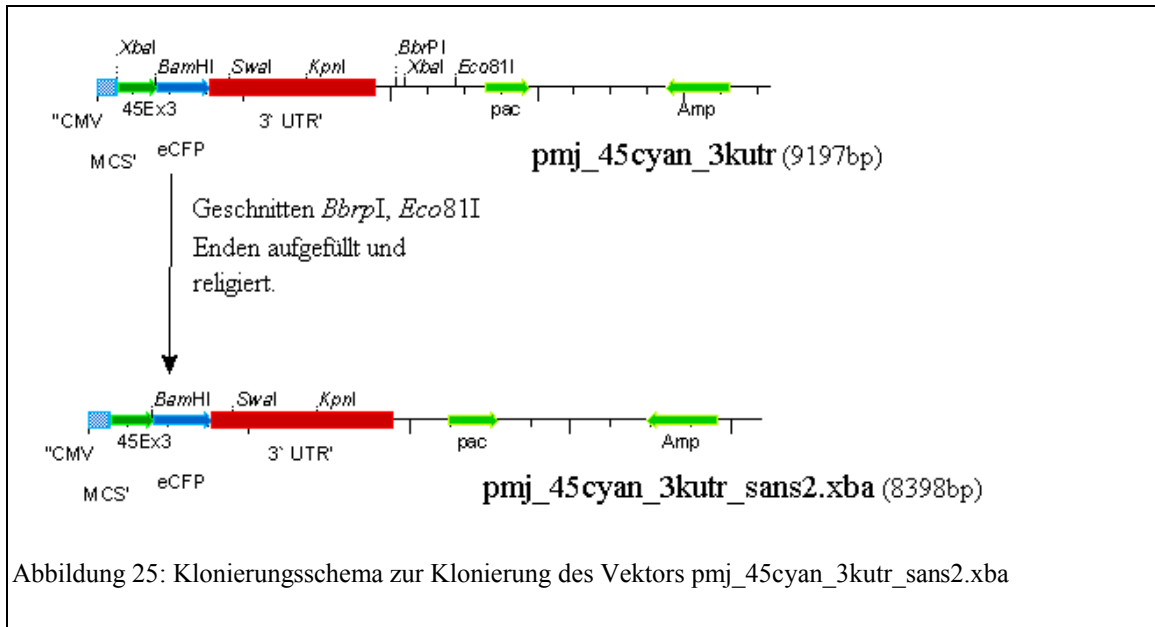


Abbildung 24: Gelfoto Testspaltung pmj\_45cyan\_3kutr\_sans2.xba mit *Xba*I und *Swa*I

Spalte 1: 1 kb Leiter, Spalte 2: Spaltung mit *Xba*I und *Swa*I; positiver Klon

mit *Xba*I und *Swa*I zeigte keine Bande mehr (siehe Abbildung 24) wie der vorherige Vektor pmj\_45cyan\_3kutr. Weitere Testspaltungen (Abbildung 23) mit *Bam*HI und *Swa*I, *Bam*HI und *Kpn*I sowie *Pst*I zeigten die erwarteten Banden bei 1 kb, 2,0 kb und 3,4 kb.



### 4.3.3 Klonierung des Vektors pCx45

Für die weitere Klonierung des „Knock-In“ Vektors mußte zuerst ein Vektor hergestellt werden, der die komplette Exon – Intron Struktur des Connexin45 beinhaltet. Dazu wurden ein Teil des Exon3 mit dem folgenden 3' Bereich aus dem Vektor Cx45\_Xba3000 in den Vektor Cx45\_Xba5000 kloniert. Dieser Schritt wurde mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Joachim Degen ausgeführt.

Dazu wurde der Vektor Cx45\_Xba3000 mit dem Restriktionsenzym *XbaI* geschnitten und das ca. 3.000 Basenpaar große DNS Stück weiter verwendet. Der Vektor Cx45\_Xba5000 wurde ebenfalls mit *XbaI* geschnitten, allerdings nur partial. Der partial verdaute Vektor wurde anschließend dephosphoryliert, aufgereinigt und zur Ligation mit dem 3000 Basenpaar Fragment angesetzt. Das Klonierungsschema findet sich auf der Abbildung 27. Der resultierende Vektor wurde pCx45 bezeichnet und ist ca.

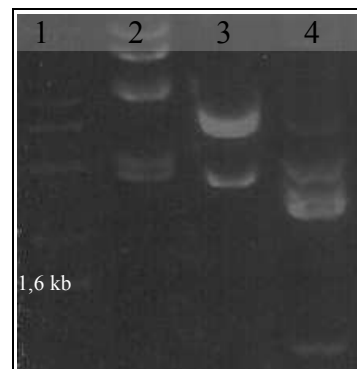
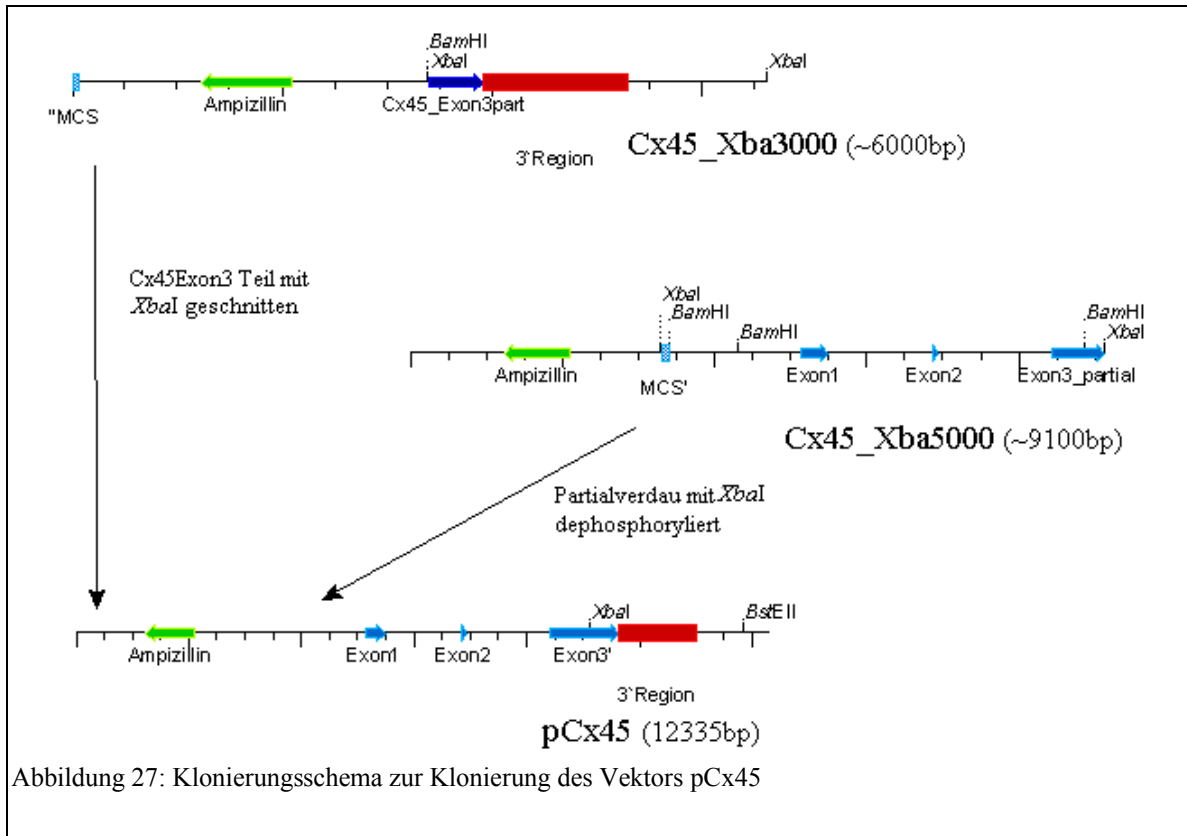


Abbildung 26: Gelfoto Testspaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen mit pCx45  
 Spalte 1: 1 kb Leiter, Spalte 2-4 positive Klone, Spalte 2: Spaltung mit *XbaI*, Spalte 3: Spaltung mit *SalI*, Spalte 4 Spaltung mit *PstI*

12,3 Kilobasen groß. Getestet wurde der Vektor (siehe Abbildung 26) mit den Restriktionsenzymen *XbaI* (Banden bei 5,7; 3,2 und 2,9 kb, Spalte 2), *SalI* (Banden bei 4,7; 4,3 und 2,9 kb, Spalte 3) und *PstI* (Banden bei 3,1; 2,7; 2,5; 2,4 und 1,2 kb, Spalte 4).



#### 4.3.4 Klonierung des Vektors pmj\_45cyan\_3kutr+45\_2,7

Im nächsten Schritt wurde ein Teil des 5' Bereichs des Cx45 aus dem Vektor pCx45 (siehe 4.3.3) in den Vektor pmj\_45cyan\_3kutr\_sans2.xba (siehe 4.3.2) kloniert. Das Klonierungsschema ist auf der Abbildung 29 zu sehen. Hier wurde der Vektor pCx45 mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Ecl*136II geschnitten und das 2,7 kb Fragment aufgereinigt und verwendet.

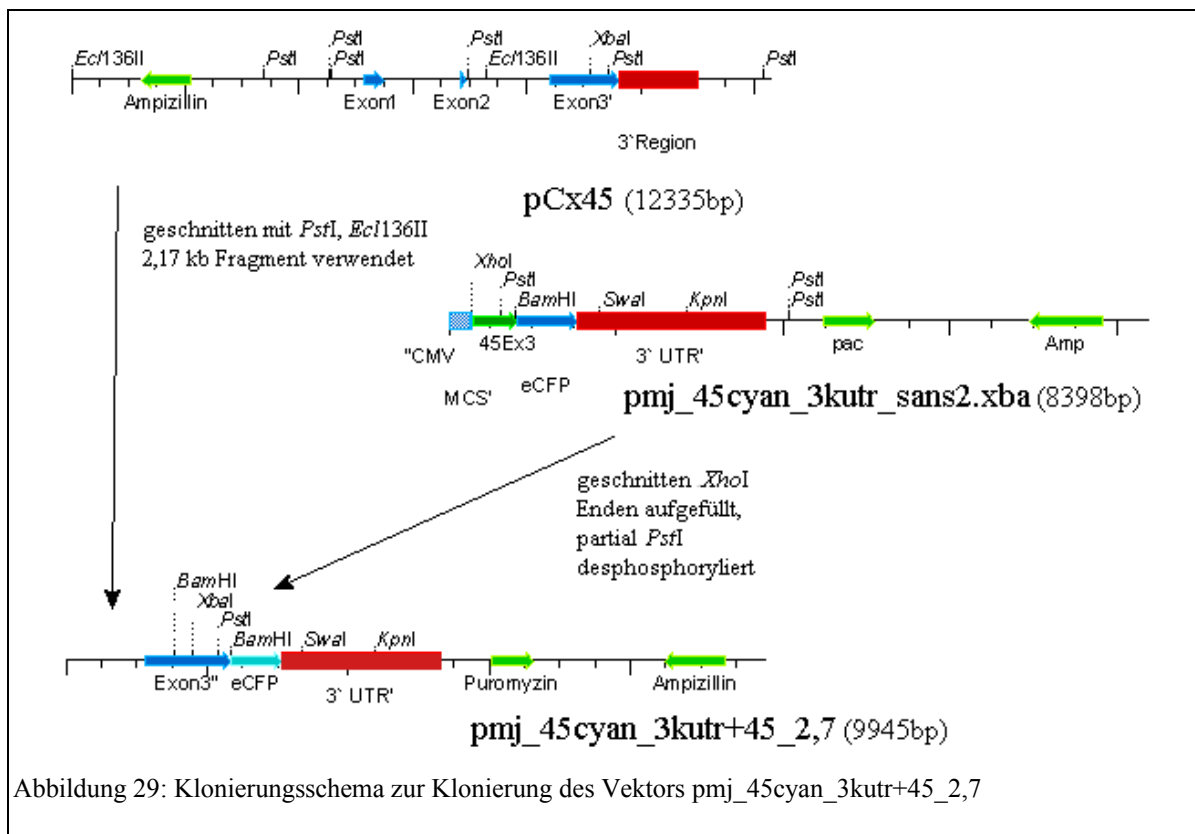
## Ergebnisse



Abbildung 28: Gelfoto Testspaltung pmj\_45cyan\_3kutr+45\_2,7 mit verschiedenen Restriktions Enzymen

Spalte 1: 1kb Leiter, Spalte 2-5 positiver Klon; Spalte 2 Spaltung mit *PstI*, Spalte 3 Spaltung mit *HindIII*, Spalte 4, Spaltung mit *XnaI/NotI*, Spalte 5 Spaltung mit *BbrpI/Asp718*

Der Vektor pmj\_45cyan\_3kutr\_sans2.xba wurde mit *XhoI* gespalten, die Enden wurden aufgefüllt und anschließend erfolgte eine Partialspaltung mit *PstI*. Der Vektor wurde dephosphoryliert, aufgereinigt und für die Ligation eingesetzt. (Auch dieser Schritt erfolgte in Kooperation mit Dr. Joachim Degen). Der resultierende Vektor wurde pmj\_45cyan\_3kutr+45\_2,7 bezeichnet und ist ca. 10 Kilobasen groß. Die Abbildung 28 zeigt die Testspaltung mit *PstI* (Banden bei 3,2 kb und 6,7 kb), *HindIII* (Banden bei 1,3 kb), *XbaI/NotI* (Banden bei 3 kb und 6,9 kb) und *BbrpI/Asp718I* (Banden bei 3,2 und 6,7kb).



### 4.3.5 Klonierung des Vektors PKImCx45CFP\_ohne\_Neo

Um die komplette Exon-Intron Struktur des Cx45 in den Knockin Vektor klonieren zu können, wurde die entsprechende Sequenz aus dem Vektor pCx45 (siehe 4.3.3) in den Vektor pmj\_45cyan\_3kutr+45\_2,7 (siehe 4.3.4) kloniert.

Das Klonierungsschema entnimmt man der Abbildung 31.

Hierbei wurde der Vektor pmj\_45cyan\_3kutr+45\_2,7 mit dem Restriktionsenzym *NheI* geschnitten und anschließend dephosphoryliert. Der Vektor Cx45\_Xba5000 wurde mit *XbaI* und *NheI* geschnitten und das resultierende 4 Kilobasen DNS Fragment für die Ligation eingesetzt.

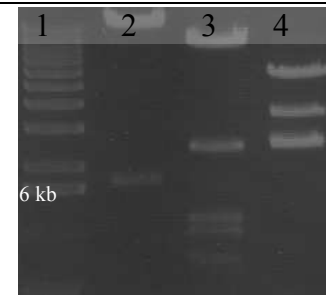


Abbildung 30: Gelfoto Testsplattung Vektor PKImCx45CFP\_ohne\_Neo mit versch. Restriktionsenzymen

Spalte 1: 1 kb Leiter, Spalte 2-4 po. Klone, Spalte 2 Spaltung mit *AhdI*, Spalte 3: *BglII*, Spalte 4: *PstI*

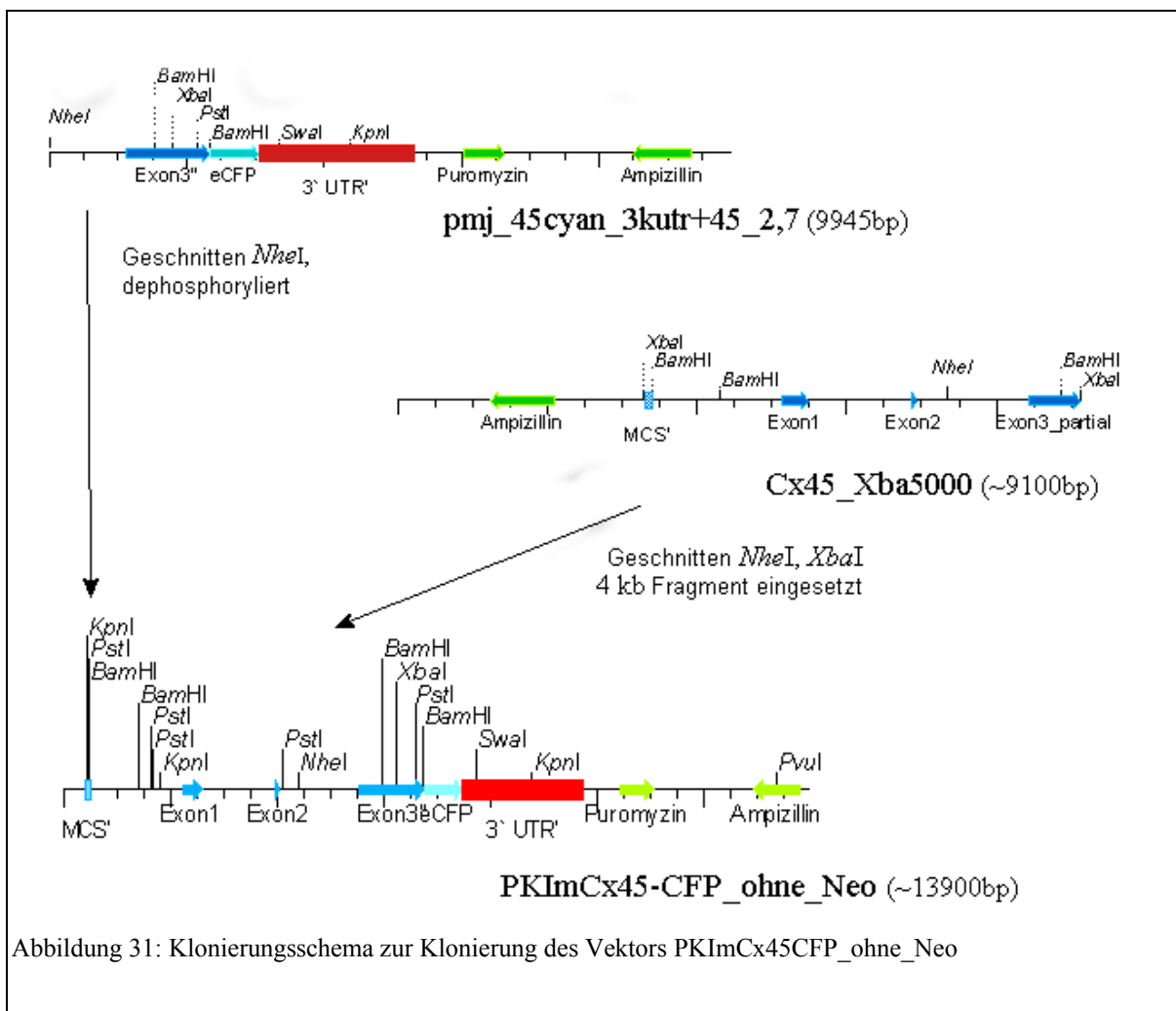


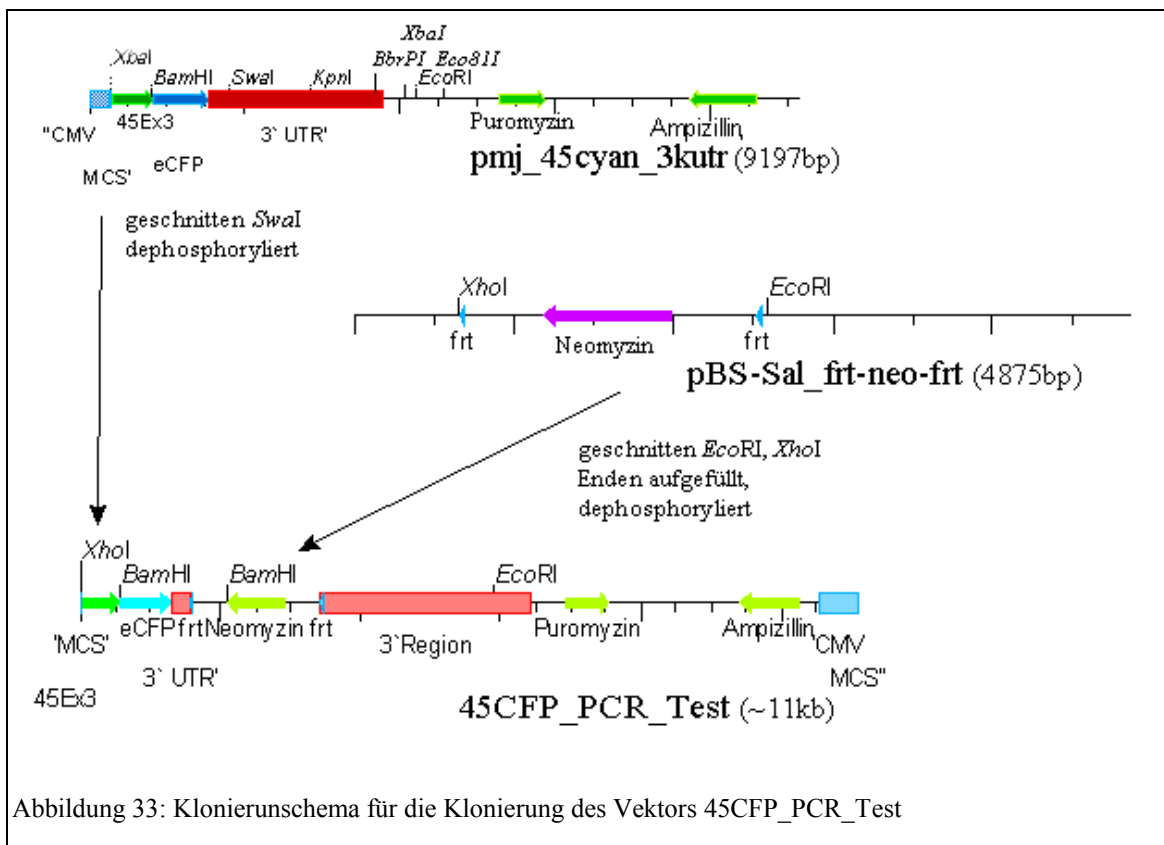
Abbildung 31: Klonierungsschema zur Klonierung des Vektors PKImCx45CFP\_ohne\_Neo

## Ergebnisse

Der resultierende Vektor wurde als PKImCx45CFP\_ohne\_Neo bezeichnet. Restriktionsspaltungen mit den Enzymen *AhdI* (Banden bei 1,6 kb, Reihe 2), *BglII* (Banden bei 2,4; 1,2; 0,9 und 0,6 kb, Reihe 3) und *PstI* (Banden bei 3,5; 2,5; und 2,4 kb, Reihe 4) zeigten die korrekten Banden (Abbildung 30).

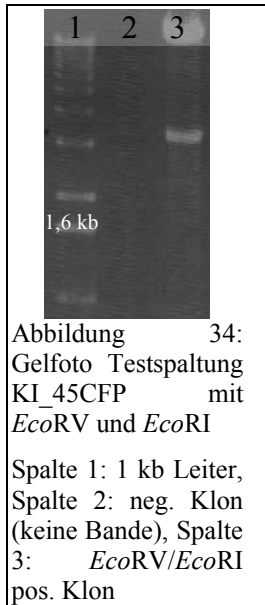
### 4.3.6 Klonierung des Vektors 45CFP\_PCR\_Test

Um die homologen Rekombination in ES Zellen mit Hilfe einer PCR überprüfen zu können, mußte eine entsprechende PCR etabliert werden. Der hier erzeugte Vektor stellt die Grundlage für die Etablierung dieser Test PCR dar. Um diesen Vektor zu erstellen wurde die Neo Kasette aus dem Vektor pBS-Sal\_frt-neo-frt in den Vektor pmj\_45cyan\_3kuttr (siehe 4.3.1) kloniert. Das Klonierungsschema ist der Abbildung 33 zu entnehmen. Für die Erstellung wurde der Vektor pmj\_45cyan\_3kuttr mit dem Restriktionsenzym *SwaI* geschnitten und dephosphoryliert. Der Vektor pBS-Sal\_frt-neo-frt wurde mit *EcoRI* und *XhoI*



geschnitten, die Enden wurden aufgefüllt. Die entstandenen DNS Stücke wurden nun ligiert. Der resultierende Vektor wurde 45CFP\_PCR\_Test benannt. Der Test mit dem Restriktions *Bam*HI zeigte wie erwartet eine Bande bei 2,6 kb, wie auf der Abbildung 32 zu sehen ist.

### 4.3.7 Klonierung des Vektors KI\_45CFP

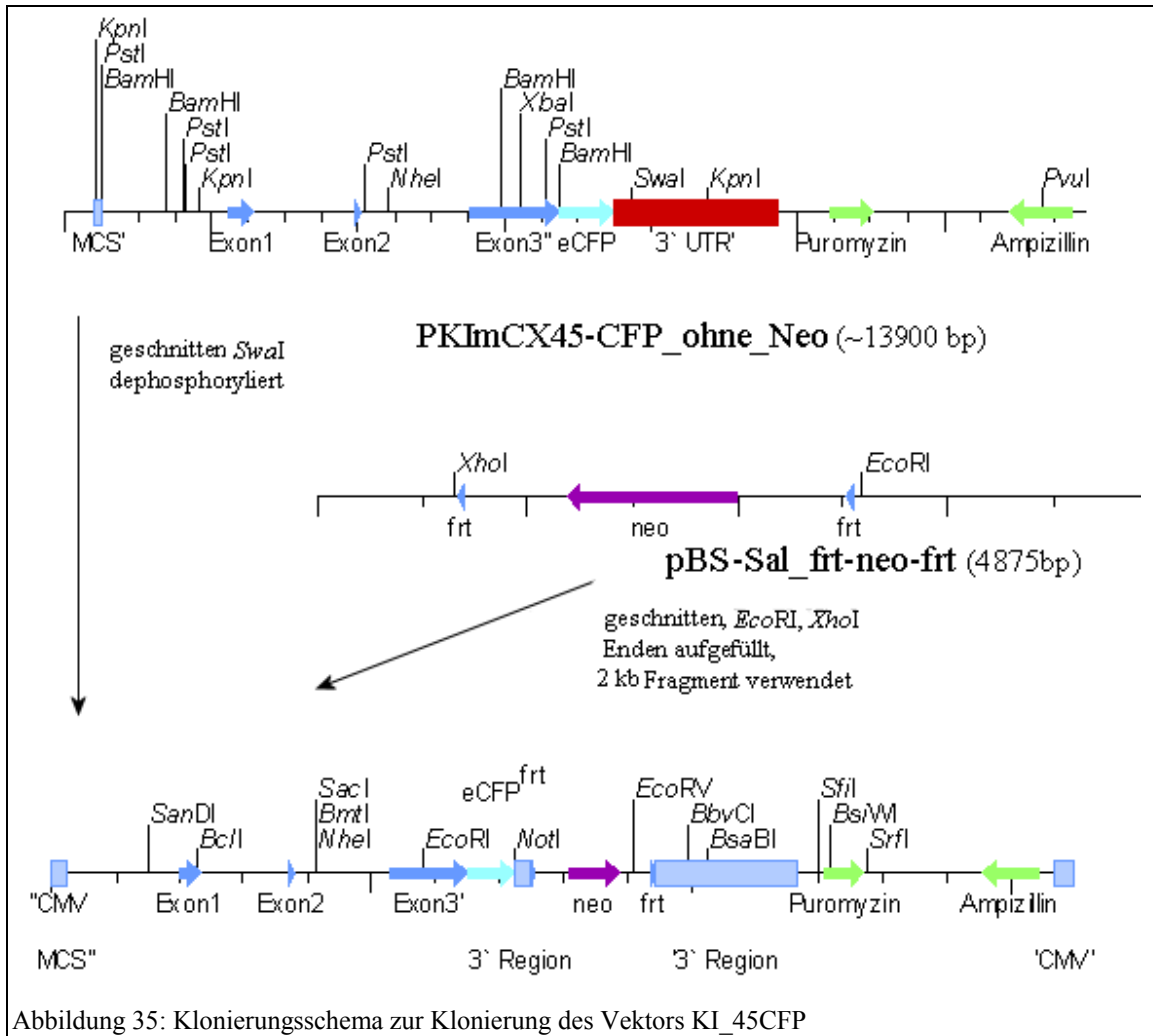


Zur Klonierung des letztlichen Knockin Vektors wurde die Neo Kassetten mit der Sequenz für das Resistenzgen gegen Neomycin in den Vektor PKImCx45CFP\_ohne\_Neo (siehe 4.3.5) kloniert. Das Klonierungsschema kann der Abbildung 35 entnommen werden.

Hierzu wurde der Vektor PKImCx45CFP\_ohne\_Neo mit dem Restriktionsenzym *Swa*I geschnitten und dephosphoryliert. Der Vektor pBS-Sal\_ftr-neo-ftr wurde mit *Xho*I und *Eco*RI geschnitten und die Enden aufgefüllt. Das resultierende ca. 2.000 Basenpaar große DNS Fragment wurde mit dem linearisierten Vektor PKImCx45CFP\_ohne\_Neo ligiert. Das Produkt aus dieser Ligation war der Vektor KI\_45CFP, der für die homologe Rekombination in

ES Zellen verwendet werden konnte. Der Vektor wurde mit Restriktionsenzymen *Eco*RV und *Eco*RI getestet und die erwartete Bande bei 3,3 kb war zu sehen, wie auf Abbildung 34 zu erkennen ist. Außerdem wurden der Vektor im Bereich des Exons3 und des eCFP sowie die Linker Region sequenziert. Die Sequenzen stimmten mit den Daten aus der Datenbank (PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) überein.



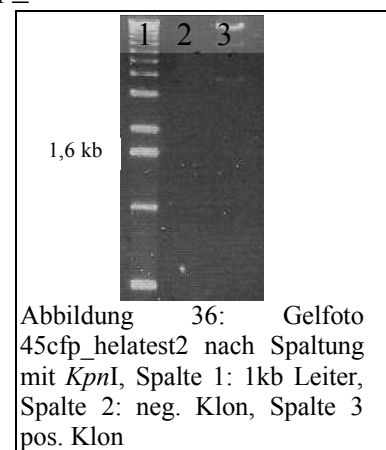


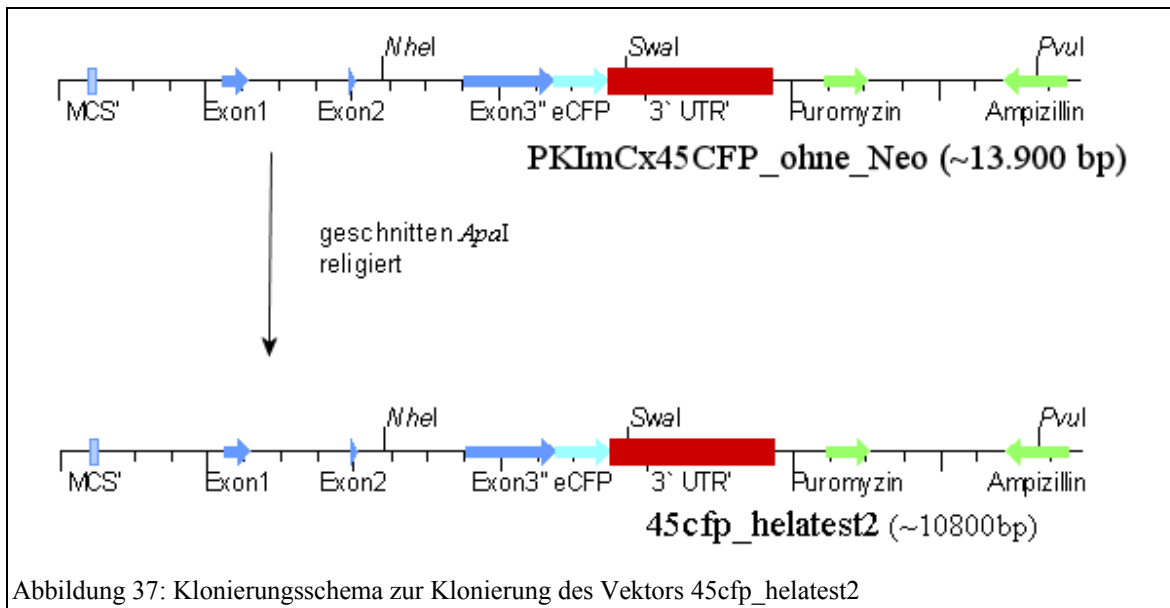
## 4.4 Klonierung des HeLa Testvektors 45cfp\_helatest4 (HT4)

Um die Funktionsfähigkeit des Fusionskonstruktes aus Connexin45 und eCFP zu überprüfen, wurde ein Vektor kloniert, mit dem die Expression in HeLa Zellkultur getestet werden konnte. Dieser Vektor wurde in 3 Klonierungsschritten hergestellt, wobei jeder einzelne Zwischenschritt testweise in HeLa Zellen transfiziert wurde, um zu evaluieren, ob durch den Vektor ein Fusionsprotein in den HeLa Zellen entsteht. Erst mit der Transfektion des Vektors 45cfp\_helatest4 entstanden Zellen, die Cyan-blaue Fluoreszenz in den Kontaktmembranen zeigten.

### 4.4.1 Klonierung des Vektors 45cfp\_helatest2

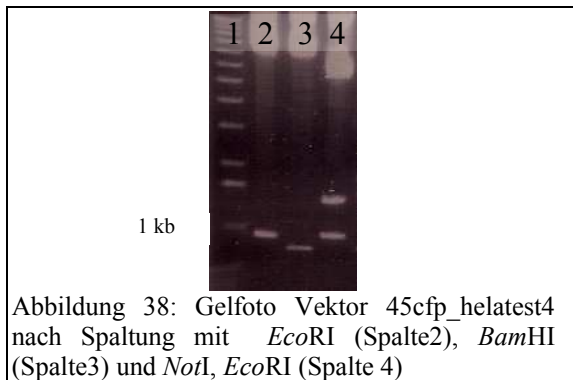
Als Ausgangsvektor für die Klonierung des Vektors 45cfp\_helatest2 wurde der Vektor PKImCx45CFP\_ohne\_Neo (siehe 4.3.5) benutzt. Das Klonierungsschema kann der Abbildung 37 entnommen werden. Der Vektor PKImCx45CFP\_ohne\_Neo wurde dabei mit *ApaI* geschnitten, anschließend wurde das Vektorrückgrat ohne die ausgeschnittene Sequenz mit den Exon1 und -2 wieder religiert. Der Vektor wurde 45cfp\_helatest2 genannt und ist ca. 10.800 Basenpaare groß. Eine Testspaltung mit *KpnI* sollte auf dem Gel die Banden 7,1 kb und 3,7 kb zeigen. Diese Banden sind auf dem Gel auf Abbildung 36 zu sehen, der Vektor wurde also korrekt kloniert.





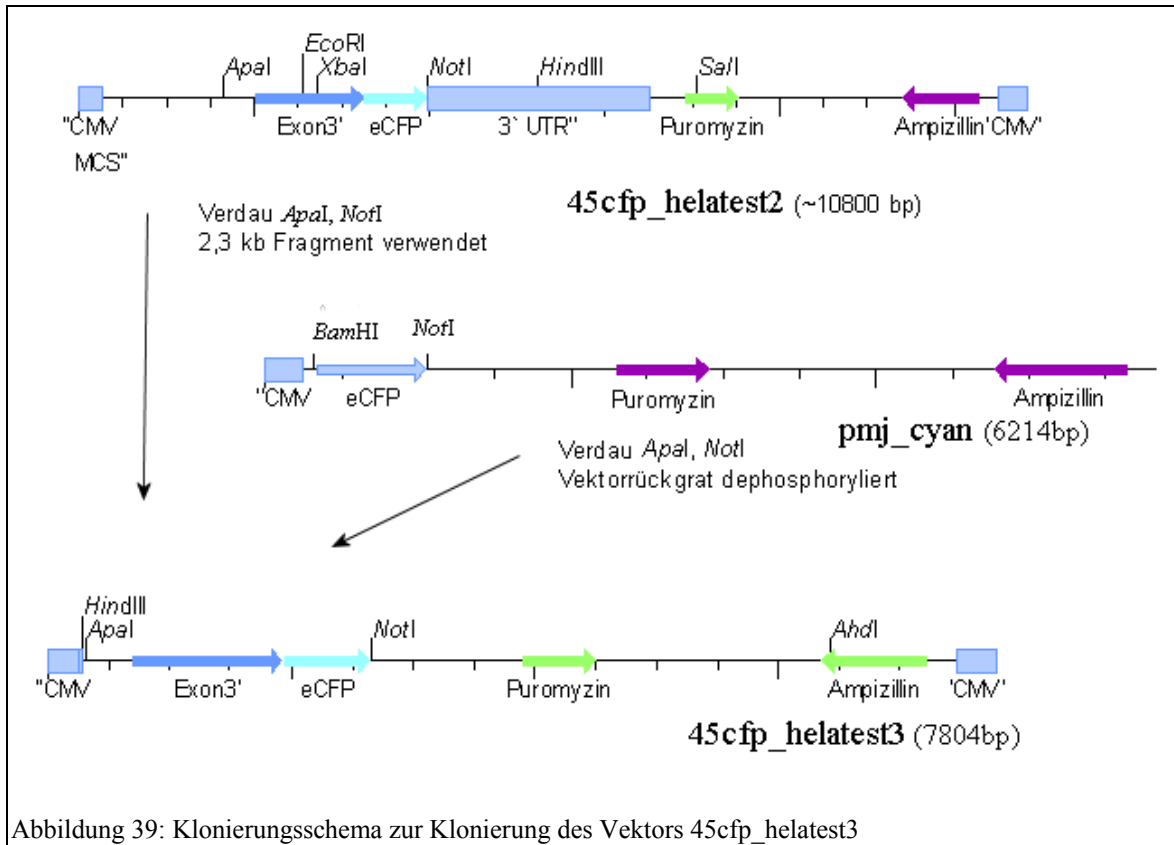
#### 4.4.2 Klonierung des Vektors 45cfp\_helatest3

Für die Klonierung des Vektors 45cfp\_helatest3 wurde der Sequenzbereich des Exons3 mit eCFP, aber ohne die 3' Region des Connexin45 aus dem Vektor 45cfp\_helatest2 (siehe 4.4.1), in den Vektor pmj\_cyan (siehe 4.1.1) kloniert. Das Klonierungsschema befindet sich auf der Abbildung 39. Der Vektor 45cfp\_helatest2 wurde dabei mit dem Restriktionsenzymen *ApaI* und *NotI* geschnitten und das 2,3 kb DNS Fragment dabei weiter verwendet. Der Vektor pmj\_cyan wurde ebenfalls mit *ApaI* und *NotI* geschnitten.



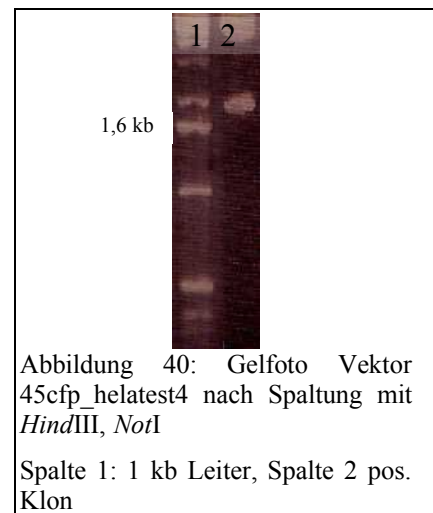
Hier wurde das 5,5 kb DNS Fragment verwendet und dephosphoryliert. Die beiden DNS Stücke wurden anschließend ligiert. Der resultierende Vektor wurde als 45cfp\_helatest3 bezeichnet und ist 7.804 Bp groß. Verschiedene Testspaltungen mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen

zeigten die korrekte Insertion des Fusionskonstruktes in den Vektor pmj\_cyan. Die Spaltung mit *EcoRI* zeigte (siehe Abbildung 38), wie erwartet, eine Bande auf der Höhe von 930 Bp, die Spaltung mit *BamHI* eine Bande bei 780 Bp und die Spaltung mit *EcoRI* und *NotI* Banden bei 930 Bp und 1.400 Bp.



#### 4.4.3 Klonierung des Vektors 45cfp\_helatest4

Für die Klonierung des Vektors 45cfp\_helatest4 wurde ein Teil aus dem Vektor Cx45\_codreg (Stephan Maxeiner, Doktorarbeit 2005) in den Vektor 45cfp\_helatest3 (siehe 4.4.2) kloniert, um auch die letzten 500 Basen vor dem Startcodon des Cx45 zu deletieren. Das Klonierungsschema kann der entnommen werden. Hierbei wurde der Vektor 45cfp\_helatest3 mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *HindIII* geschnitten, das Vektorrückgrat weiter verwendet und dephosphoryliert. Der Vektor Cx45\_codreg wurde ebenfalls mit *PstI* und *HindIII* geschnitten, dabei wurde das 1,1 kb DNS Fragment weiter verwendet. Die Ligationen brachte den Vektor 45cfp\_helatest4 oder auch HT4 mit einer Größe von 7.370 Basenpaaren hervor. Die Testspaltung mit den Restriktionsenzymen



## Ergebnisse

*HindIII* und *NotI* zeigte, wie auf der Abbildung 40 zu sehen, die erwartete Bande bei einer Höhe von 1,95 kb.

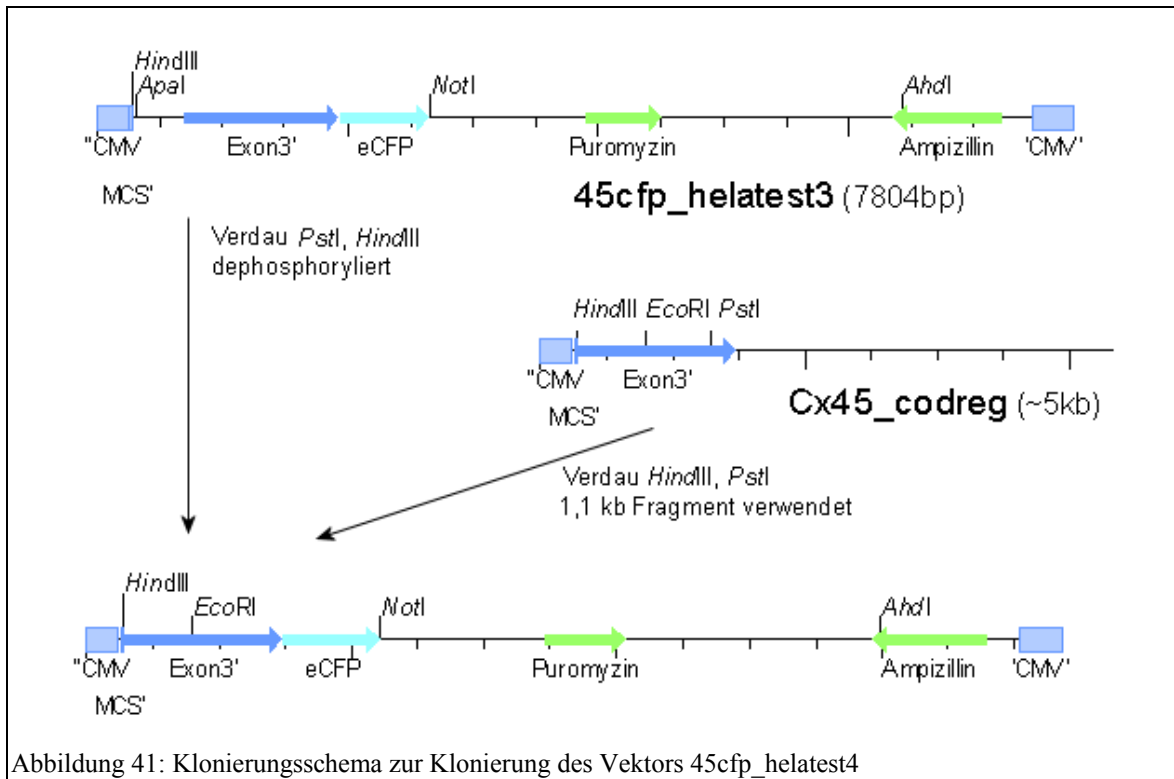


Abbildung 41: Klonierungsschema zur Klonierung des Vektors 45cfp\_helatest4

## 4.5 Homologe Rekombination von psv\_45GFP und einem BAC Vektor in *E.coli* Bakterien

Für die Herstellung eines BAC Vektors mit der Sequenz eines Fusionsproteins aus Cx45 und GFP wurde der Vektor psv\_45GFP in Bakterien transformiert, die den BAC Vektor mit der Sequenz für Cx45 enthielten. Dieser BAC Vektor wurde mittels Filter Durchmusterung einer Bibliothek (siehe 2.3.10) ermittelt. Aus diesen verschiedenen Klonen wurde derjenige mittels PCR ermittelt, der die günstigste Position in der Mitte des Vektors bezüglich der Sequenz für das Cx45 hatte. Die Aufreinigung des Vektors wurde mit Wildtype BAC Vektoren getestet. Die Rekombination erfolgte in zwei Schritten, wie in den folgenden Kapiteln ersichtlich werden wird.

### 4.5.1 BAC Filter Durchmusterung („Screening“)

Es wurde eine Southern Blot Hybridisierung mit einer Sonde aus dem Exon 3 des Cx45 und der BAC Bibliothek auf einem Hybridisierungsfiltersatz (siehe 2.3.10) durchgeführt. Die Bibliothek befindet sich auf einem durch ein Koordinatensystem eingeteilten Filter. Die Sonde stammt aus dem Vektor Cx45\_xba3000, wurde durch einen *EcoRI/PstI* Spaltung hergestellt und ist ca. 400 Bp groß. Die Southern Blot Hybridisierung der Filter zeigte, wie auf Abbildung 42 beispielhaft zu sehen ist, positive Signale. Die Punkte markieren positive Klone, die nach einem bestimmten System auf dem Filter aufgetragen wurden und anhand der Koordinaten bestimmt werden konnten (siehe 3.5.1.5).

Durch die Bestimmung der Koordinaten wurden die folgenden Klone als positiv bestimmt, siehe auch Kapitel 2.3.11:



Abbildung 42: Film von einem BAC Filterscreening nach rad. Southern Blot Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Exon3 von Cx45

<i>Nummer</i>	<i>Koordinaten</i>	<i>Klonname</i>
1	x1=182, y1=36, x2= 182, y2=38	RPCIB731I12176Q2
2	x1=192, y1=41, x1=192, y2=43	RPCIB731H10176Q2
3	x1=192, y1=46, x1=192, y2=48	RPCIB731G10176Q2
4	x1=167, y1=124, x1=170, y2=125	RPCIB731H15192Q2
5	x1=23, y1=77, x1=24, y2=80	RPCIB731A20166Q2
6	x1=102, y1=65, x1=105, y2=64	RPCIB731D0428Q2
7	x1=63, y1=117, x1=64, y2=120	RPCIB731I12235Q5

Tabelle mit den Koordinaten der positiven Klone nach BAC Filterscreening mit einer Sonde gegen das Exon3 des Cx45

### 4.5.2 Southern Blot Hybridisierungstest mit den identifizierten Klonen

Um zu bestimmen, ob die bestellten Vektoren auch tatsächlich die Sequenz für das Cx45, wurde zusätzlich eine Southern Blot Hybridisierung mit der schon in 4.5.1 verwendeten Sonde bei allen in 4.5.1 identifizierten Klonen durchgeführt. Dazu wurden die Klone mit *EcoRI* geschnitten und auf ein Gel aufgetragen (Abbildung 43).

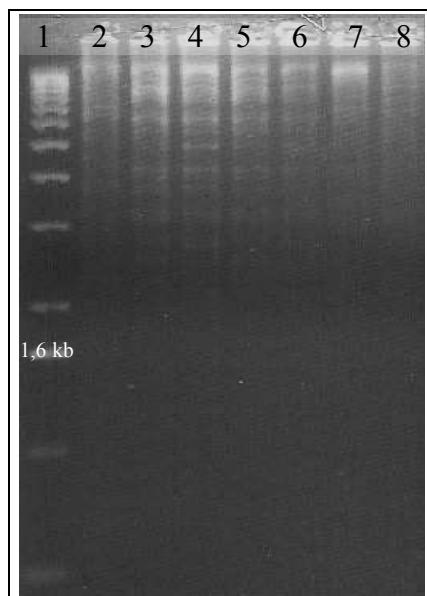


Abbildung 43: Gelfoto Spaltung der Filter positiven Bac Klone mit *EcoRI*

Spalte 1: 1kb Leiter, Spalte 2-8 Bac Klone, Spalte 3: Klon 2235

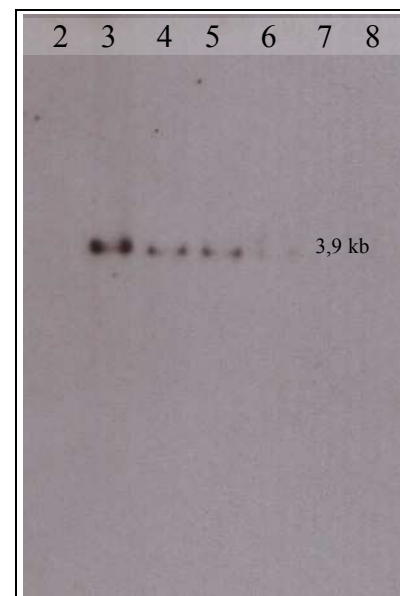


Abbildung 44: Autoradiographie Film - Nach Southern Blot Hybridisierung der Filterpositiven Klone

Spalte 2-8: Bac Klone, Spalte 3: Klon 2235

## Ergebnisse

Wie auf der Abbildung 44 zu sehen ist, wurden 4 Klone mit Hilfe der Southern Blot Hybridisierung identifiziert. Klon Nummer RPCIB731112235Q5 (in Folge „2235“ genannt) in der Reihe 3 zeigte dabei das stärkste Signal. Alle 4 Klone beinhalten die Sequenz für das Cx45, da auf dem Film eine Bande in der Höhe von 3,9 kb zu sehen

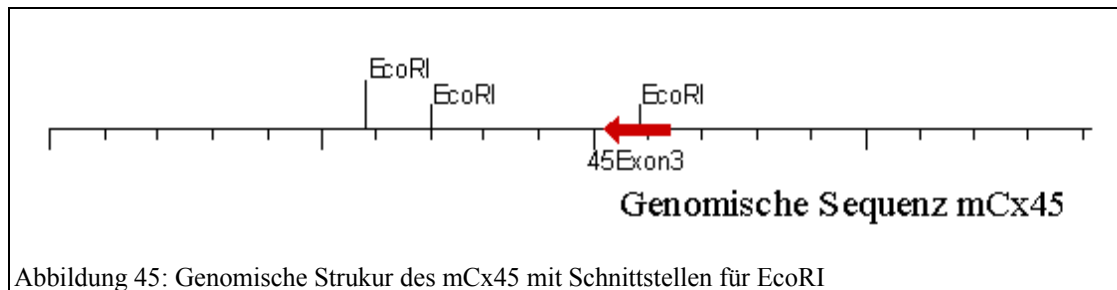


Abbildung 45: Genomische Struktur des mCx45 mit Schnittstellen für EcoRI

ist. Auf der Abbildung 45 erkennt man die genomische Struktur des Cx45 in der Maus, die *EcoRI* Schnittstellen erzeugen dabei ein 3,9 kb großes DNS Stück, welches mit einer Sonde für das Exon3 detektiert werden kann.

### 4.5.3 PCR Test der BAC Vektoren auf Position der Cx45 Sequenz innerhalb des BAC Vektors

Die aus 4.5.1 identifizierten Klone wurden ebenfalls mit Hilfe drei verschiedener PCRs weiter charakterisiert. Zum einen wurde mit einer PCR überprüft, ob das Exon3 des Connexins45 auch tatsächlich vorhanden ist, zum anderen wurde auf Regionen 30 kb stromaufwärts und 30 kb stromabwärts getestet.

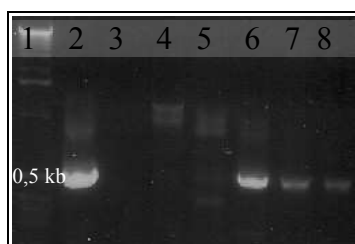


Abbildung 46: Gelfoto Test PCR mit den 7 BAC Klonen für das Exon 3 des Cx45

Spalte 1: 1 kb Leiter, Spalte 2-8 Bac Klone, Spalte 6: Klon 2235

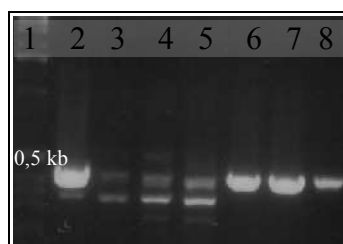


Abbildung 47: Gelfoto Test PCR auf 30 kb Stromaufwärts des Cx45 Exon3

Spalte 1: 1 kb Leiter, Spalte 2-8 Bac Klone, Spalte 6: Klon 2235

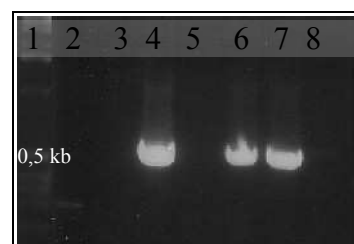


Abbildung 48: Gelfoto Test PCR auf 30 kb Stromabwärts des Cx45 Exon3

Spalte 1: 1 kb Leiter, Spalte 2-8 Bac Klone, Spalte 6: Klon 2235

Die Abbildung 46 zeigt das Ergebnis der PCR für den Test auf das Vorhandensein des Exons3 des Connexins45, die Primer dieser PCR waren „xba\_go\_end“ und „end\_go\_xba“.



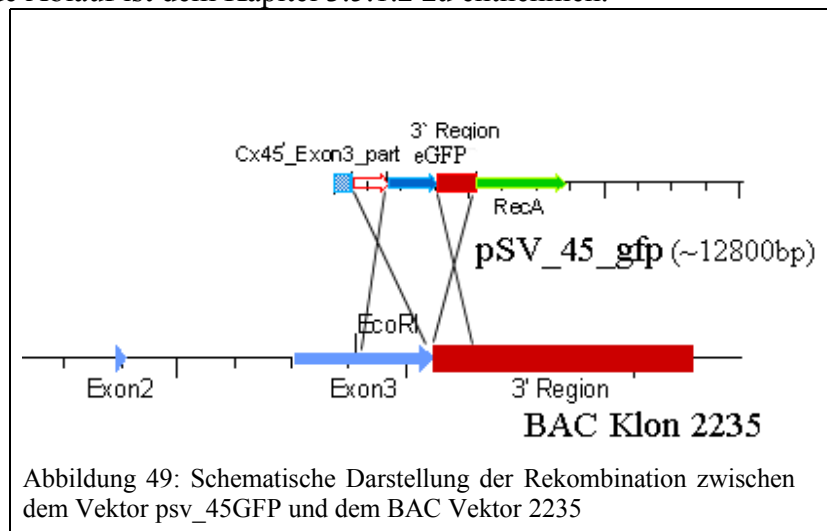
## Ergebnisse

Die Abbildung 47 illustriert das Ergebnis der PCR für den Test auf das Vorhandensein einer 30 kb stromaufwärts liegenden Sequenz des Exon3 des Connexin45 mit den Primern „nach45neuhin“ und „nach45neurueck“. Die Abbildung 48 zeigt das Ergebnis des PCR Test auf das Vorhandensein einer Sequenz 30 kb Stromabwärts des Connexin45 mit den Primern „30kbvor45hin“ und „30kbvor45rueck“. Auf allen drei Gelfotos ist zu sehen, dass der Klon in Reihe fünf immer ein Signal gibt und dass dieses auch das stärkste ist. Der Klon in Reihe fünf ist der Klon 2235, welcher auch schon in 4.5.2 als positiv identifiziert wurde. Dieser Klon wurde anschließend für die homologe Rekombination in *E.colis* Bakterien verwendet.

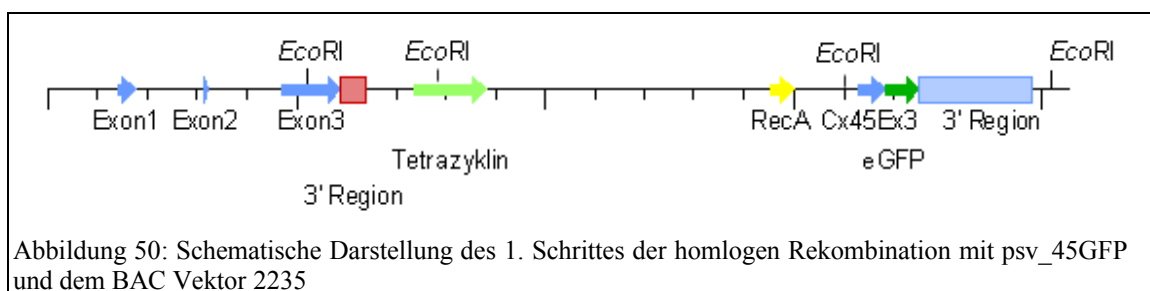
### 4.5.4 BAC - Homologe Rekombination Schritt 1

Der erste Schritt der homologen Rekombination erfolgte durch die Transformation des Vektors psV\_45GFP (siehe 4.2.4) in den Klon 2235, wie er in den vorherigen Kapiteln ermittelt wurde. Der genaue Ablauf ist dem Kapitel 3.5.1.2 zu entnehmen.

Auf der Abbildung 49 ist das Rekombinations-schema zu sehen. Es gibt, wie dort zu sehen, zwei Möglichkeiten der Rekombination. Möglichkeit eins über das Exon3 oder Möglichkeit zwei über die 3' Region. Je nachdem, welche



Rekombination stattgefunden hat, können mittels eines Verdauers der DNS mit *EcoRI* und anschließender



## Ergebnisse

Southern Blot Hybridisierung unterschiedliche Bandenhöhen aufgelöst werden. Die erfolgreiche Rekombination im Exon3 zeigte in diesem Fall zwei Banden in der Größe von 2,2 und 4,7 kb.

Die Abbildung 50 zeigt die Schnittstellen für *EcoRI*, woraus die genannten DNS Stücke entstanden. Mit einer Sonde gegen das Exon3 des Cx45 wurden diese Banden nach einer Southern Blot Hybridisierung sichtbar gemacht.

Die Abbildung 51 zeigte die positiven Banden bei 2,2 und 4,7 kb in der Reihe eins auf dem Ausschnittsbild. Dieser Klon war positiv und wurde für den zweiten Schritt weiterverwendet.

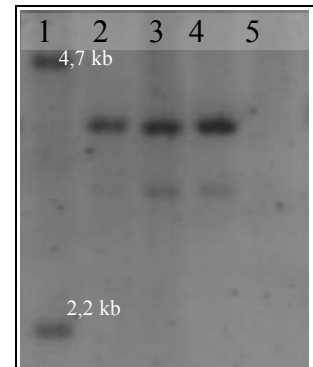


Abbildung 51: Autoradiographie nach einer Southern Blot Hybridisierung mit dem in Spalte 1 positiven Klon nach Rekombinationsschritt 1

Spalte 1: positiver Klon,  
Spalte 2-5: neg. Klone

### 4.5.5 BAC - Homologe Rekombination Schritt 2

Bei dem zweiten Schritt der homologen Rekombination erfolgt eine Rekombinationsreaktion innerhalb des DNS Stranges, wodurch die theoretische Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Rekombination bei ca. 50% liegt. Die gewünschte Rekombination ist auf der Abbildung 52 zu sehen. Eine weitere Möglichkeit ist die Rekombination über den 3' Bereich, wobei die Sequenz mit dem eGFP ausgeschnitten wird und der Wildtyp Zustand wieder hergestellt wird.

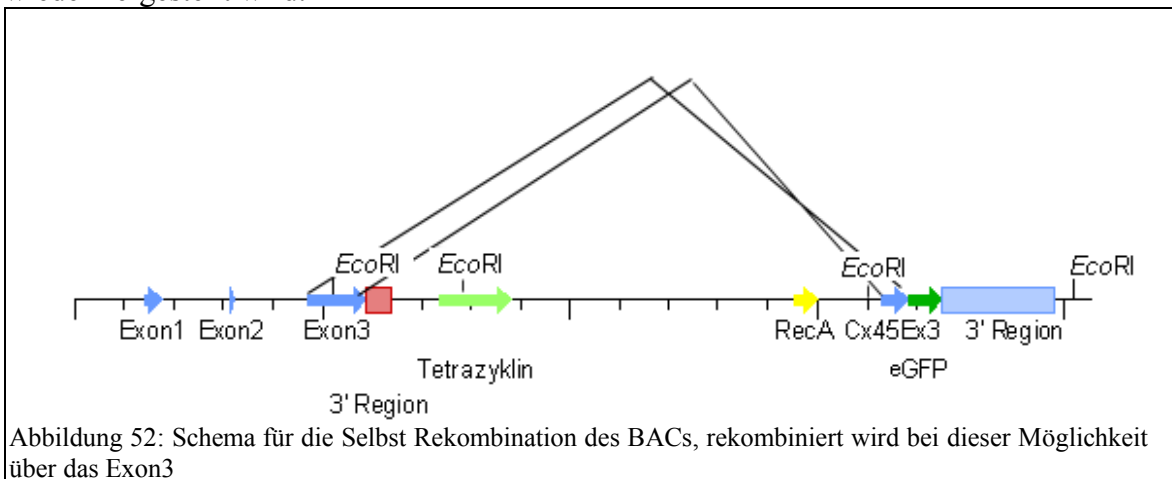
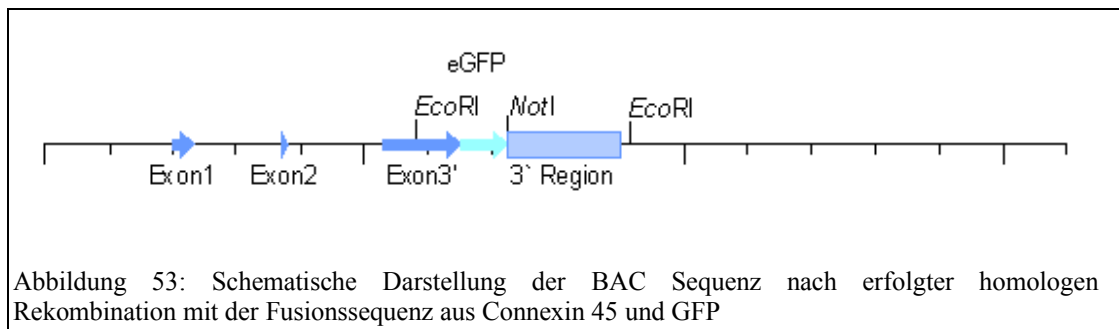


Abbildung 52: Schema für die Selbst Rekombination des BACs, rekombiniert wird bei dieser Möglichkeit über das Exon3

Auf der Abbildung 53 sieht man die schematische Darstellung des BAC Vektors nach erfolgreicher homologer Rekombination. Es ist ein Vektor entstanden, der die Sequenz für



das Connexin45 und die Sequenz für eGFP im Leseraster beinhaltet. Auch hier wurde der Vektor mit *EcoRI* getestet. Durch die zusätzliche Sequenz des eGFP ist die Bande, die durch diese Spaltung entsteht und durch eine Sonde gegen das Exon3

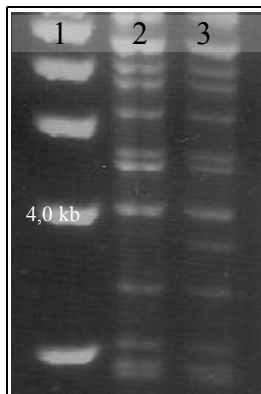


Abbildung 55: Gelfoto, Spaltung pos. Klon (Spalte 2) und Wildtyp (Spalte 3) BAC DNS mit *EcoRI*, Spalte 1: 1kb Leiter

via Southern Blot Hybridisierung detektiert werden kann, größer als im „Wildtyp“ Zustand. Die Rückrekombination zum Wildtyp zeigte eine Bande bei 3,9 kb, die erfolgreiche Rekombination eine Bande bei 4,6 kb, wie auf der Autoradiographie der Southern Blot Hybridisierung auf Abbildung 54 zu sehen ist.

Weiterhin zeigte eine Spaltung mit *EcoRI*, aufgetragen auf ein Gel (siehe Abbildung 55) eine Änderung der Fragmente: Beim Wildtyp ist eine Bande bei ~3,9 zu sehen die bei dem positiven Klon nicht zu sehen ist, wohingegen

der positive Klon eine stärkere Bande bei ~4,6 kb hat, die beim Wildtyp nicht zu erkennen ist. Weiterhin wurde eine Southern Blot

Hybridisierung mit einer Sonde gegen eGFP durchgeführt, welcher ebenfalls positive Signale zeigte (Daten nicht gezeigt). Somit wurde ein BAC Vektor erzeugt, der die gewünschte Sequenz aus einer Fusionssequenz aus Connexin 45 und eGFP hat. Dieser letzte Schritt wurde in Kooperation mit Julia von Maltzahn durchgeführt.

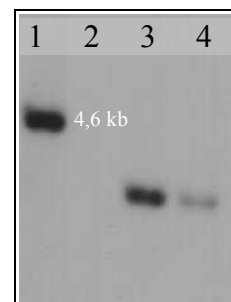


Abbildung 54: Autoradiographie nach einer Southern Blot Hybridisierung, nach Detektion mit einer Sonde gegen Cx45 Exon3

Spalte 1: positiver Klon, Spalten 2-4 neg. Klone bzw. Wildtyp (3 und 4)

### 4.5.6 Aufreinigung des BAC Vektors

Für die Oozyten Injektion des fertigen BAC Vektors muß dieser in ausreichender Menge aufgereinigt werden. Die Aufreinigung des BAC Vektors läßt sich am besten durch die Verwendung einer Puls-Gel Elektrophorese (siehe 3.5.1.10) überprüfen. Die genauen Details des Protokolls sind den Kapiteln 3.5.1.8 und 3.5.1.9 zu entnehmen. Diese Details sollten genau befolgt werden, da die Aufreinigung gerade von großen BAC Vektoren sehr schwierig ist.



Abbildung 56: Gelfoto nach Puls Gel Elektrophorese mit dem Wildtyp BAC Vektor, Spalte 1 Low Range PFG Marker, Spalte 2-4 unterschiedliche Präparationen des Wildtyp BAC Vektors

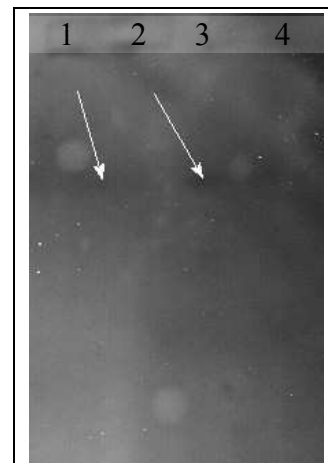


Abbildung 57: Autoradiographie nach Southern Blot Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Exon3 des Connexin45. Spalte 1 und 2: Wildtyp BAC Vektor aus nebenstehendem Gel.

Auf der Abbildung 56 erkennt man in den Spalten zwei bis vier unterschiedliche Präparationen des BAC Wildtyp Vektors 2235. Es wurde jeweils die Menge der Bakteriensuspension verändert: Spalte eins entsprechen 50 ml, Spalte zwei 100 ml und Spalte drei 200 ml Bakteriensuspension, welche für eine Maxipräparation eingesetzt wurden. Die obere scharfe Bande ist die Bande, die den BAC Vektor 2235 enthält. Verifiziert wurde diese Aussage wurde durch einen Southern Blot bestätigt mit einer Sonde gegen das Cx45 Exon3, wie auf Abbildung 57 zu sehen ist. Verwendet wurde dabei das Gel auf Abbildung 56. Die Southern Blot Hybridisierung war zwar schwach, die Bande ist allerdings eindeutig zu erkennen (durch Pfeile gekennzeichnet).

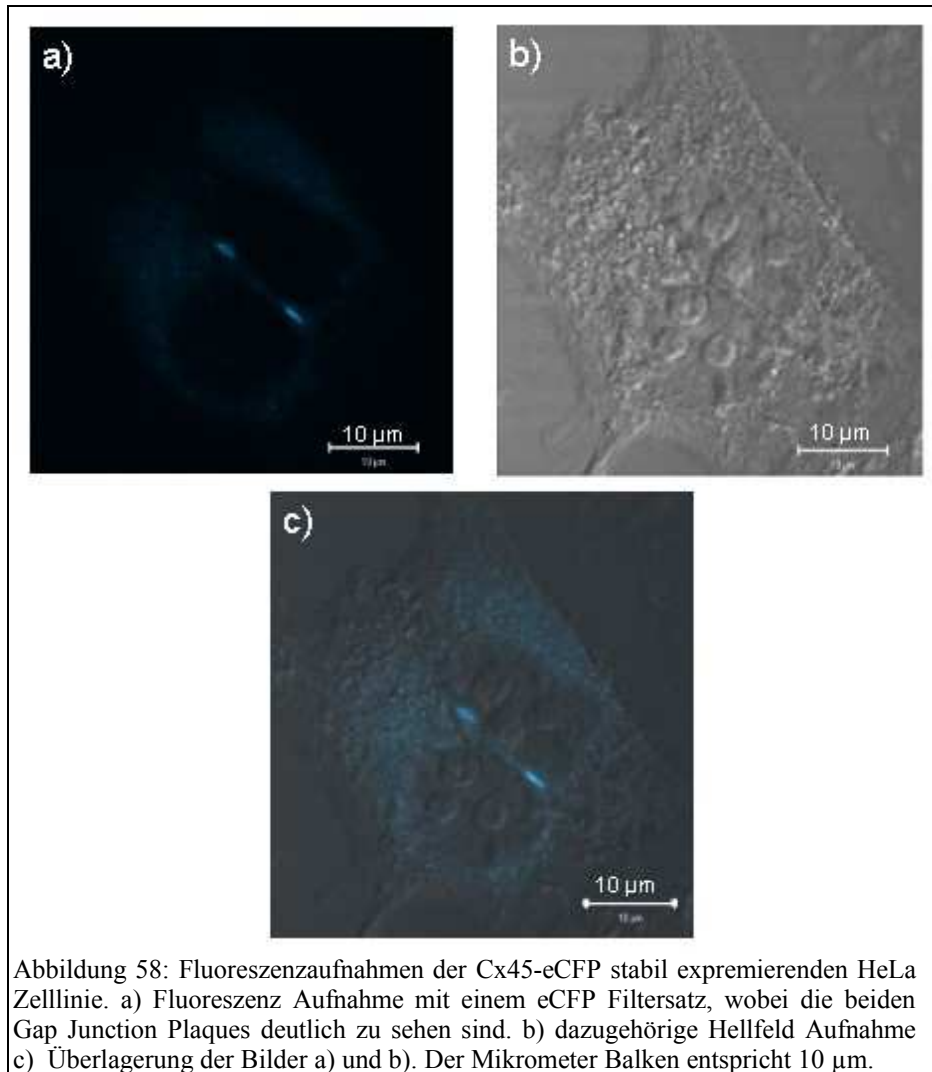
## 4.6 Herstellung von HeLa Zellen zur stabilen Expression des Fusionsproteins aus Connexin45 und eCFP

Um eine HeLa Zelllinie mit stabiler Expression eines Fusionsproteins aus Connexin 45 und eCFP zu erzeugen, wurden HeLa Wildtyp Zellen mit den Vektoren KI45\_CFP (siehe 4.3.7), 45cfp\_helatest2 (siehe 4.4.1), 45cfp\_helatest3 (siehe 4.4.2) und 45cfp\_helatest4 (siehe 4.4.3) transfiziert (siehe 3.3.2.3). Letztlich gelang mit dem Vektor 45cfp\_helatest4 eine stabile Transfektion. Da eine erfolgreiche Transfektion durch die Expression des Fusionsproteins erkennbar war, konnte die Effektivität durch einfache Betrachtung unter einem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden.

Aus der letztlich erfolgreichen Transfektion wurden 12 Klone isoliert und weiter kultiviert. Nur aus einem dieser Klone konnte eine stabile Zelllinie gezüchtet und weiter kultiviert werden.

### 4.6.1 HeLa Zellen mit exprimiertem Cx45-eCFP

Die Abbildung 58 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen mit dem LSM 510 zweier HeLa Zellen des positiven Klons aus dem vorhergehenden Kapitel. Auf der Abbildung 58 a) erkennt man zwei blau fluoreszierende Gap Junction Plaques zwischen zwei HeLa Zellen. Dass es sich um Plaques bestehend aus dem Cx45-eCFP handelt, wurde in den weiteren Kapiteln durch Immunfluoreszenz Untersuchungen mit verschiedenen Antikörpern bestätigt. Die Abbildung 58 b) zeigt die zu a) gehörige Hellfeldaufnahme, die Abbildung 58 c) das Überlagerungsbild von a) und b). Hier sieht man sehr deutlich, dass sich die Plaques zwischen zwei Zellen befinden.



#### 4.6.2 Immunfluoreszenzuntersuchung der Cx45-CFP positiven HeLa Zellen

Die Abbildung 59 zeigt eine Aufnahme mit dem LSM 510 einiger HeLa Zellen, die das Cx45-eCFP exprimieren. Auf der Abbildung 59 a) erkennt man die Aufnahme durch einen eCFP Filter, auf der Abbildung 59 b) die Aufnahme mit einem Filter für die Fluoreszenzmarkierung eines Antikörpers ( $\alpha$ -Kaninchen-Alexa 594), die bei einer Wellenlänge von 543 nm nachgewiesen werden.

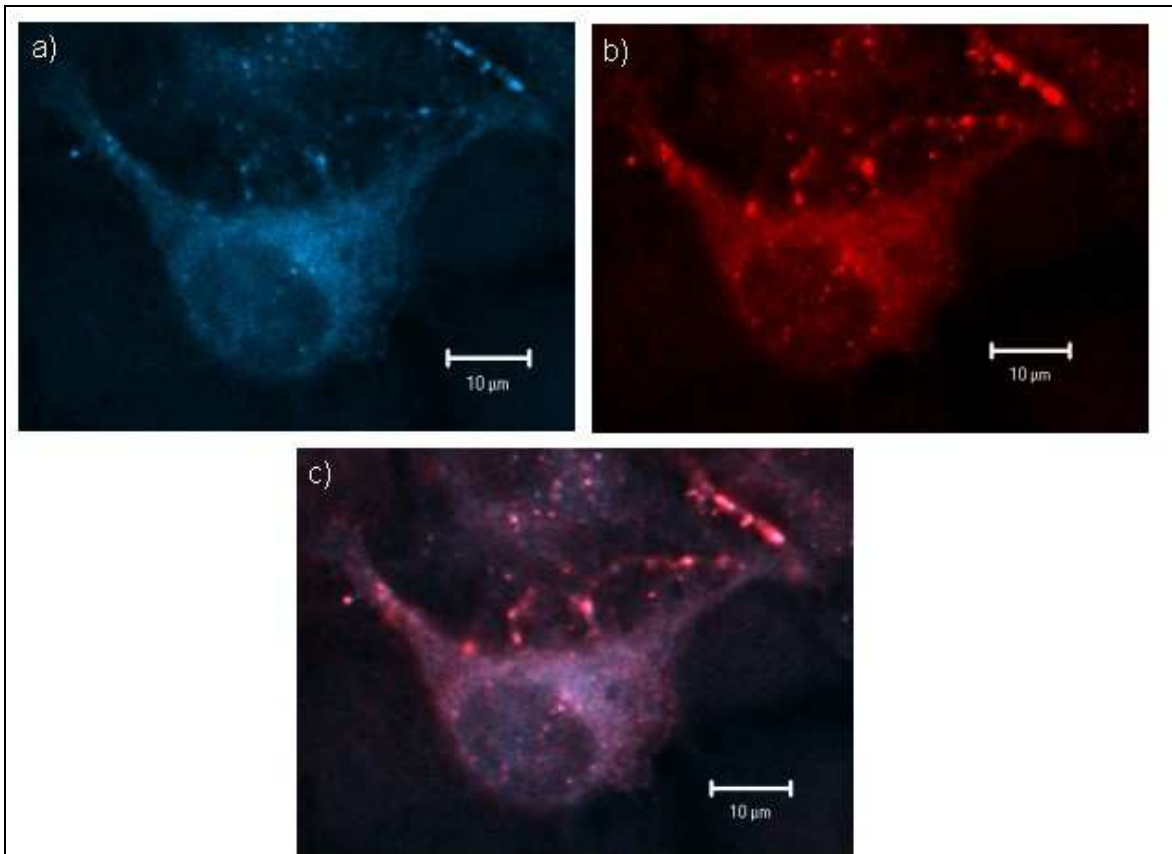
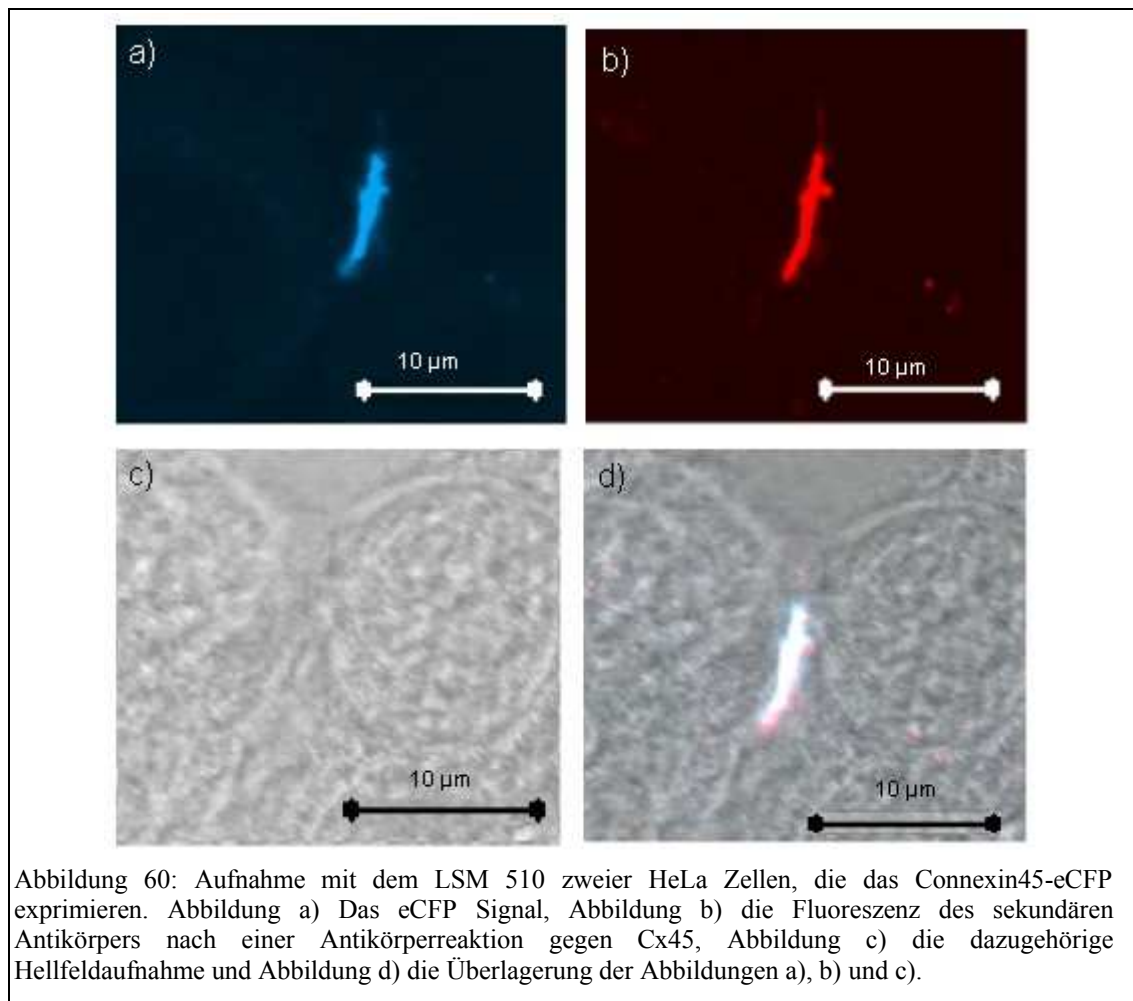


Abbildung 59: Aufnahme mit dem LSM 510 einiger HeLa Zellen, die das Cx45-CFP exprimieren. Abbildung a) zeigt die Aufnahme durch einen eCFP Filter, Abbildung b) die Aufnahme mit einem Filter der bei einer Wellenlänge von 543nm detektiert. Abbildung c) eine Überlagerung der beiden Kanäle. Der Mikrometerbalken entspricht 10 µm.

Zu sehen ist hier die Fluoreszenz des sekundären Antikörpers (anti-Kaninchen-Alexa 594 (rot)) gegen eGFP Antikörper (anti-eGFP Living Colors). Auf der Abbildung 59 c) ist eine Überlagerung der beiden Bilder Abbildung 59 a) und Abbildung 59 b) zu sehen. Die Überlagerung zeigt eindeutig die Kolo-kalisation der blauen und roten Fluoreszenz und damit die Kolo-kalisation des Connexin 45-eCFP und der Antikörper gegen eGFP. Der Mikrometerbalken entspricht 10 µm.

Abbildung 60 zeigt eine Aufnahme mit dem LSM 510 von zwei HeLa Zellen, die das Connexin45-eCFP exprimieren: a) illustriert das eCFP Signal des Fusionsproteins Cx45-eCFP, b) die Fluoreszenz der sekundären Antikörper gegen Connexin 45 Antikörper, c) die dazugehörige Hellfeldaufnahme und d) die Überlagerung von a), b) und c). Damit ist eindeutig gezeigt, dass die blau fluoreszierenden Plaques, Gap Junction Plaques, bestehend aus Connexin45-eCFP, sind.





## 4.7 Herstellung embryonaler Stammzellen mit gezielt mutiertem Cx45-Allel durch homologe Rekombination des Austauschvektors pCx45\_CFP

Nach der erfolgreichen Überprüfung der Funktionalität des Austauschvektors KI\_45CFP (siehe 4.3.7) durch Sequenzierung und Test des Fusionsproteins in HeLa Zellen wurde dieser in embryonale Stammzellen (HM1; 2.3.7) transfiziert.

### 4.7.1 Etablierung einer Test PCR zur schnellen Überprüfung einer erfolgten homologen Rekombination

Für die schnelle PCR Analyse von stabil transfizierten ES-Zellklonen auf eine erfolgreich stattgefundene homologe Rekombination war die Klonierung des PCR Testvektors 45CFP\_PCR\_Test (siehe 4.3.6) eine zwingende Voraussetzung. Der PCR Testvektor enthält eine um 120 Bp längere Sequenz des 3' Bereiches des Connexins45 als der Austauschvektor. Aus diesem Bereich wurde ein Primer (firt\_go\_3) abgeleitet, der zweite Primer (3\_go\_frt) wurde in der firt Sequenz der Neokassette abgeleitet. Dadurch entstand bei einer PCR ein Amplikon von 2,1 kb. Die quantitative Test PCR zeigte ein Signal bis 0,1 fg (siehe Abbildung 61). Dieses Amplikon kann nur nach erfolgter homologer Rekombination des Austauschvektors KI45\_CFP in embryonalen Stammzellen entstehen.

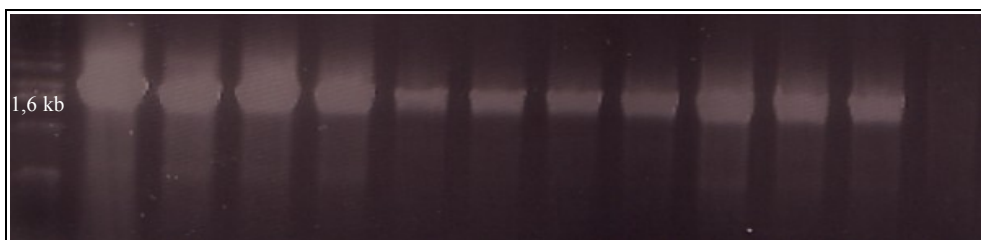


Abbildung 61: Gelfoto der quantitativen Test PCR für die Überprüfung der homologen Rekombination mit HTM1 Hintergrund DNS; man erkennt ein spezifisches Amplikon bei 2,1 kb. Spalte 1: 1kb Leiter. Spalte 2-13 PCR mit Verdünnungsreihe des PCR-Test Vektors. Spalte 2 - 1µg, dann jeweils 1/10 verdünnt bis Spalte 13 - 10 ag (Atogramm). In dem mittleren Verdünnungsbereich ist eine Abschwächung zu erkennen, die Ursache ist unbekannt, das Ergebnis aber reproduzierbar.

### 4.7.2 Erzeugung und Überprüfung der homolog rekombinierten ES-Zellen.

Nach der Transfektion der ES-Zellen mit dem Austauschvektor KI45\_CFP entstanden im Falle einer homologen Rekombination G418-resistente ES-Zellklone, bei denen ein Allel wie in Abbildung 62 dargestellt mutiert war.

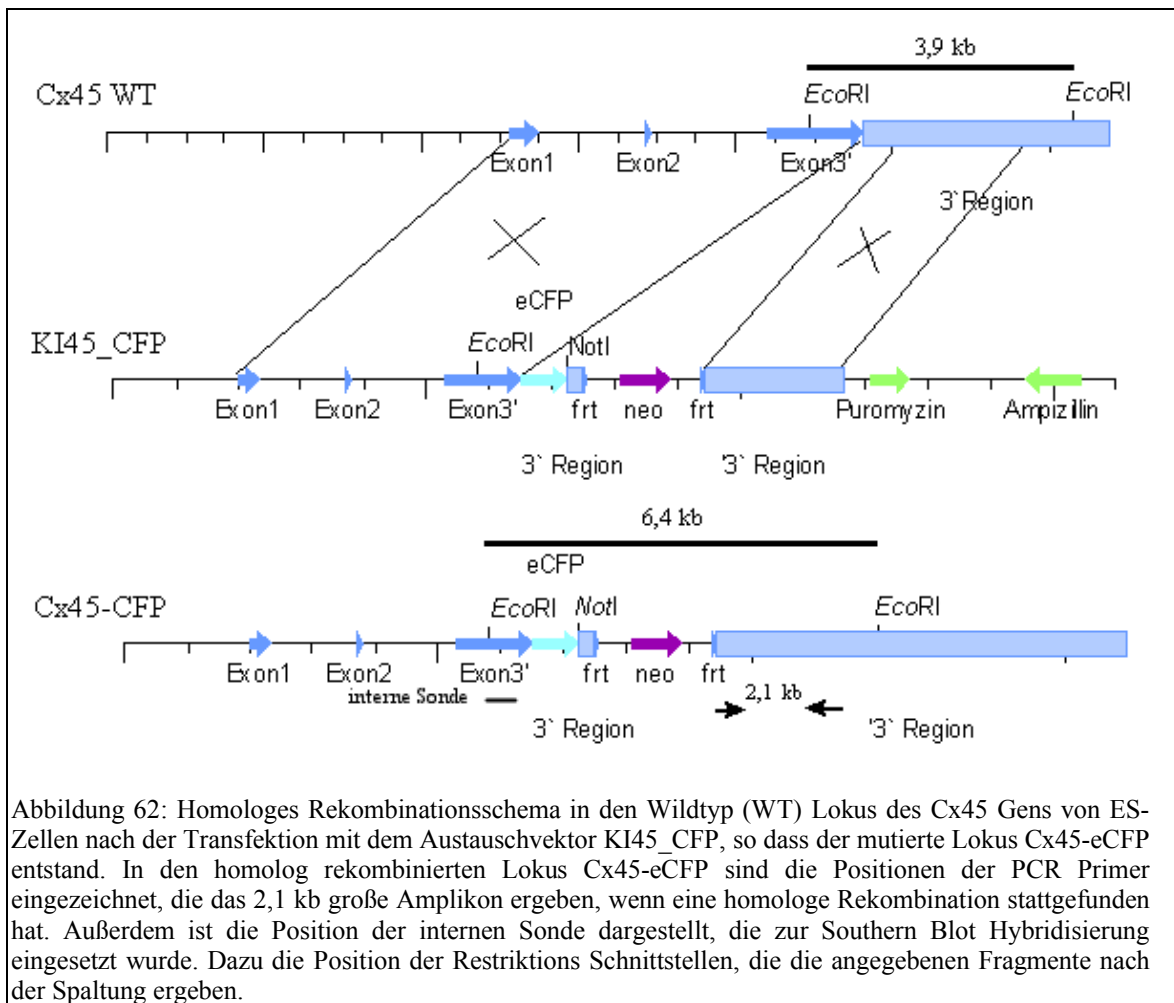


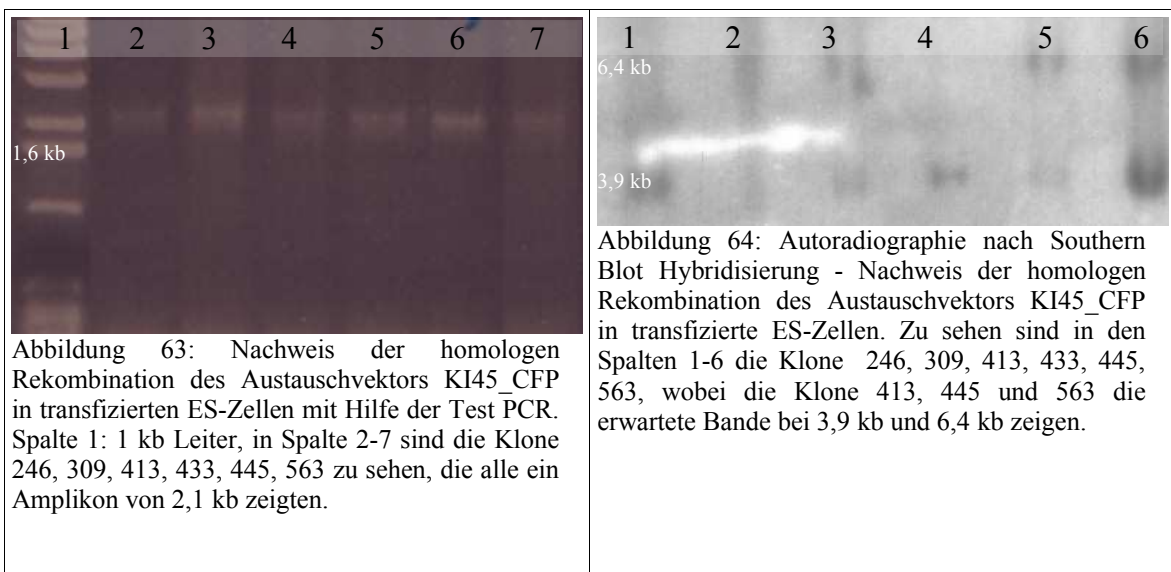
Abbildung 62: Homologes Rekombinationsschema in den Wildtyp (WT) Locus des Cx45 Gens von ES-Zellen nach der Transfektion mit dem Austauschvektor KI45\_CFP, so dass der mutierte Locus Cx45-eCFP entstand. In den homolog rekombinierten Locus Cx45-eCFP sind die Positionen der PCR Primer eingezeichnet, die das 2,1 kb große Amplikon ergeben, wenn eine homologe Rekombination stattgefunden hat. Außerdem ist die Position der internen Sonde dargestellt, die zur Southern Blot Hybridisierung eingesetzt wurde. Dazu die Position der Restriktions Schnittstellen, die die angegebenen Fragmente nach der Spaltung ergeben.

### 4.7.3 Charakterisierung der ES-Zellen auf genomischer Ebene

Um die homolog rekombinierten ES-Zell Klone zu charakterisieren wurde die aus ihnen gewonnene DNS doppelt analysiert (siehe Abbildung 63), zum einen durch PCR Analyse zum Nachweis der homologen Rekombination, zum anderen durch Southern Blot Analyse der PCR positiven ES-Zell Klone nach *EcoRI* Spaltung mit der internen Sonde. Dabei

## Ergebnisse

sollte das Wildtyp Allel eine Bande bei 3,9 kb zeigen und das homolog rekombinierte Allel eine Bande bei 6,4 kb. Eine Southern Blot Hybridisierung mit einer externen Sonde konnte aus Zeitgründen nicht mehr erfolgen. Bei der Southern Blot Hybridisierung wurde ein Restriktionsenzym gewählt, welches immer einmal innerhalb und einmal außerhalb des Austauschvektors schneidet (*EcoRI*). Nur nach erfolgreicher homologen Rekombination konnte die Hybridisierung mit den genannten Fragmenten erfolgen. Falsche Integrationen hätten Banden in unterschiedlicher Höhe ergeben, da *EcoRI* häufig im Genom schneidet und zusätzliche Fragmente variabler Größe aufgetaucht wären.



Insgesamt wurden in drei Transfektionen 866 Klone analysiert, wobei nach der dritten Transfektion zwölf Klone per PCR als korrekt homolog rekombiniert identifiziert wurden. Das entspricht einer Frequenz von ca. 1,4 %. Sechs dieser Klone wurden einer Southern Blot Analyse mit der internen Sonde unterzogen und die Anzahl der vorhandenen Chromosomen wurde untersucht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in der folgenden Tabelle zu sehen:

<i>Klon Nr.</i>	<i>PCR (2,1 kb)</i>	<i>SB WT</i>	<i>SB Intern</i>	<i>Morphologie</i>	<i>Karyotyp</i>
246	+	+	-	gut	n.d.
254	+	n.d.	n.d.	---	n.d.
301	+	n.d.	n.d.	Sehr gut	70%
309	+	+	-	Sehr gut	n.d.
413	+	+	+	Sehr gut	69%
433	+	+	-	Sehr gut	n.d.
445	+	+	+	Sehr gut	79%
454	+	n.d.	n.d.	---	n.d.
500	+	n.d.	n.d.	---	n.d.
546	+	n.d.	n.d.	---	n.d.
563	+	+	+	Sehr gut	75%
579	+	n.d.	-	gut	n.d.
Tab.4.7.3-1	<p>Charakterisierung der homolog rekombinierten ES-Zell Klone mit mutierten Cx45 Allel. Im PCR Test zeigten zwölf von 866 Klone ein positives Signal mit einem Amplikon bei 2,1 kb. Von den sechs weiter analysierten Klonen zeigten drei nach Southern Hybridisierung eine Einfachintegration des Austauschvektors. Eine morphologische Einschätzung der Klone wurde anhand typischer ES-Zell Charakteristika getroffen, wie kleine nicht differenzierte Zellen, kissenförmig und abgerundeter Wuchs der Klone; eingeteilt wurde hier in gut und sehr gut. Der Anteil der Zellen eines Klons mit vollständigen Chromosomensatz reichte bei den analysierten Klonen von 69% bis 79%. Ein + in den Southern Blot Spalten bedeutet zum einem, dass die Wildtyp Bande nachgewiesen wurde, zum anderen, dass eine Einfachintegration stattgefunden hat. Die Morphologie der Klone wurden als gut und sehr gut eingestuft. nd = nicht untersucht.</p>				

#### 4.7.4 Charakterisierung auf funktioneller Ebene

Für eine Charakterisierung auf funktioneller Ebene wurden ein Klon unter Fluoreszenzlicht mit dem LSM 510 untersucht. Positive Klone könnten hier eCFP exprimieren und dadurch mit Fluoreszenzlicht nachweisbar sein, wenn Connexin45 in ES-Zellen exprimiert wird. Untersucht wurde der Klon 301.

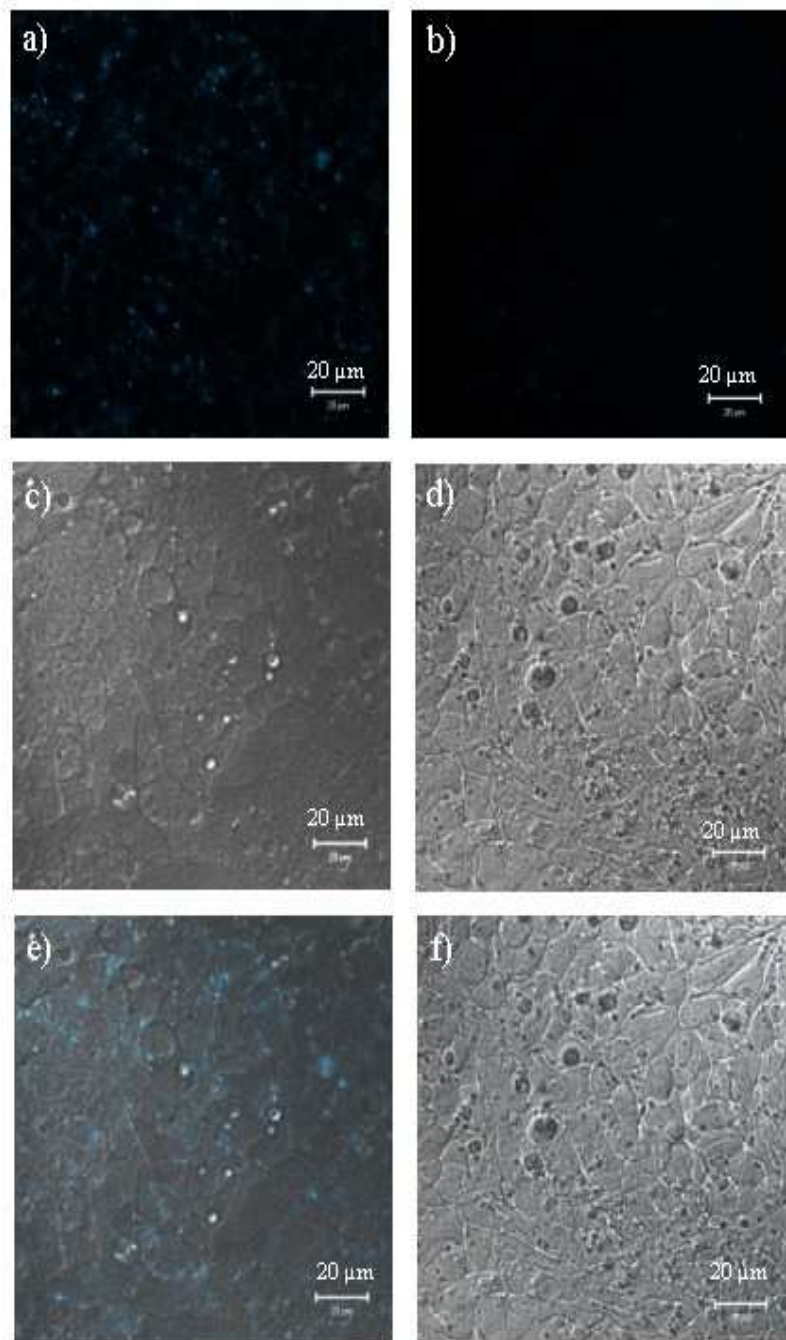


Abbildung 65: Aufnahmen des ES-Zell Klons 301 (a,c,e) und von Wildtyp ES-Zellen (b,d,f) mit dem Laserscan Mikroskop LSM 510. Aufnahme a) Fluoreszenzaufnahme , auf c) die dazugehörige Durchlicht Aufnahme , e) das Überlagerungsbild. b) ist die Fluoreszenzaufnahme, d) die dazugehörige Durchlichtaufnahme und f) zeigt das Überlagerungsbild. Der Balken entspricht 20 µm.

Abbildung 65 zeigt auf den Bildern a), c) und e) die Aufnahmen des Klons 301, wobei a) die Fluoreszenzaufnahme zeigt. Im Vergleich dazu zeigt das Bild b) die Fluoreszenzaufnahme von Wildtyp ES-Zellen. Angeregt wurde hier mit einem Laser mit der Wellenlänge 458 nm, womit die eCFP Fluoreszenz angeregt werden kann. Beide Aufnahmen wurden mit der gleichen Laserstärke gemacht. Man erkennt deutlich die Fluoreszenz des eCFP auf dem Bild a) im Vergleich zur kaum vorhandenen Hintergrundfluoreszenz (sehr schwach) von Bild b).

## 5 Diskussion

Zu Beginn der Arbeit existierten noch keine Mäuse, die ein Fusionsprotein aus einem Connexin und eGFP oder eCFP exprimierten. Mit Hilfe von Fusionsproteinen mit Beteiligung von eGFP wurden allerdings vorher schon Untersuchungen in Zellkultursystemen durchgeführt (Bukauskas et al., 1999; Paemeleire et al., 2000).

Mit Hilfe dieser Fusionsproteine sollte die Lokalisation des Connexin36 in der Maus besser aufgeklärt werden, da zu dem damaligen Zeitpunkt auch noch keine Antikörper existierten, mit denen Connexin36 zuverlässig nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grunde wurde ein Vektor kloniert, der das Connexin36 und das Fluoreszenzprotein eCFP im gemeinsamen Leseraster beinhaltet. Die Entscheidung eCFP und nicht eGFP zu benutzen, wurde getroffen, da so eine Reihe von Kollokalisationsuntersuchungen ermöglicht wurden. Diese transgenen Mäuse hätten mit Mäusen verpaart werden können, die andere Fusionsproteine mit eGFP exprimieren; eCFP und eGFP lassen sich mit Hilfe des LSM510 META sehr gut unterscheiden. Durch die unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften könnte man Interaktionen oder Kollokalisierungen besser aufklären. Das Projekt konnte leider nicht fertig gestellt werden, da eine andere Arbeitsgruppe bereits eine transgene Maus mit einem BAC Konstrukt erzeugt hatte, die Connexin36 mit eGFP als Fusionsprotein exprimierte (Feigenspan et al., 2004). Das Projekt wurde daher gestoppt und stattdessen mit der anderen Arbeitsgruppe um Prof. Monyer (Heidelberg) zusammengearbeitet.

Da die Verwendung eines BAC Vektors zur Herstellung einer transgenen Mauslinie einige Vorteile versprach (weniger Klonierungsschritte, einfachere Technik, schnellere Erzeugung transgener Tiere durch Vorkerninjektion (Yang et al.; 1997)), wurde ein weiteres Projekt auf dieser Basis aufgebaut. Es sollte ein Fusionsprodukt aus Connexin45 und eCFP hergestellt werden. Sowohl Cx36 als auch Cx45 werden in bestimmten Regionen des Gehirns und der Retina ausgeprägt. Daher konnte erwartet werden, dass auch ein Fusionsprotein aus Cx45 mit einem Fluoreszenzprotein in einer transgenen Maus neue Einsichten zur genauen Lokalisation des Cx45 Proteins ergeben könnte. Zum damaligen Zeitpunkt existierte noch kein zuverlässig funktionierender Antikörper gegen Cx45.

## Diskussion

Aufgrund erheblicher experimenteller Schwierigkeiten bei der Klonierung dieses Konstruktes wurde später entschieden, parallel einen Austauschvektor zu erzeugen, der das Connexin45 mit eCFP in Fusion enthalten sollte. Das „BAC System“ wurde dann auf die Verwendung von Connexin45 mit eGFP umgestellt, damit die beiden unterschiedlichen Mauslinien unterschiedliche GFP Varianten exprimieren.

Durch die eCFP/eGFP Fluoreszenzmarkierung der Connexin45 Proteine könnte man, mit den aus diesen beiden Vektoren (BAC und Insertions Vektor) erzeugten Mäusen, z.B. gezielt in der Retina dieser transgenen Tiere Farbstoffinjektionen vornehmen und die Ausbreitung der Farbstoffe untersuchen. Man könnte dadurch Aussagen über die Kopplungseigenschaften bezüglich der Fusionsproteine in der Retina gewinnen. Natürlich wäre auch eine direkte Fluoreszenz Mikroskopie mit frisch präparierten Retinae möglich, um Aussagen über die Lokalisation des Cx45 Fusionsprotein zu treffen. Interessant wäre der Vergleich beider transgener Tiere mit Cx45-CFP und Cx45-eGFP.

Ebenso könnte man diese Experimente mit Cx36-eGFP/Cx45-eCFP doppelt transgenen Tieren durchführen. Kopplungsuntersuchungen mit Hilfe des Farbstofftransfers könnte man auch in weiteren Geweben durchführen, in denen Cx45 exprimiert wird, wie z.B. in glatten Muskelzellen oder im reizleitenden Myocard.

Durch geschickte Verpaarung mit Cx45 KO Mäusen könnte man untersuchen, inwieweit das Connexin45-eCFP Fusionsprotein die Funktion des nativen Connexin45 übernehmen kann, und ob die Letalität der Cx45 del Tiere überwunden werden kann. Dieses Experiment könnte auch mit den BAC transgenen Mäusen durchgeführt werden um herauszufinden, inwieweit das Cx45-eGFP Fusionsprotein die Funktion des nativen CX45 übernehmen kann.

Generell sollte durch die Erzeugung von Connexin45-eCFP transgenen Mäusen eine Aussage erhalten werden, ob Tiere mit diesem Genotyp lebensfähig sind, im heterozygoten und im homozygoten Zustand. Es besteht ja immer die Möglichkeit, dass ein solches Konstrukt zu möglicherweise schwerwiegenden Phänotypen oder gar zu einer embryonalen Letalität führt. Wenn beide Linien sich als lebensfähig herausstellen, kann man diese direkt miteinander vergleichen und kreuzen, um auch eine Aussage über die Spezifität der Expression des BAC Konstruktes zu bekommen. Hierzu können ebenfalls direkte fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden, der Vergleich von eCFP und eGFP Fluoreszenz ist mit dem LSM510 META möglich.

Die Expression des Connexin45-eCFP der Cx45-eCFP Tiere kann auch durch direkte



Fluoreszenz Mikroskopie mit der Expression des eGFP von Cx45KO(eGFP) Tieren verglichen werden (Maxeiner et al, 2005). Auch hier kann wieder auf die Spezifität der Expression geschlossen werden, wobei überprüft werden kann, ob die Expression des eGFP im Zytoplasma mit der Expression des Cx45-eCFP in der Membran derselben Zelle, wie erwartet, zusammenfällt.

## 5.1 Klonierung des Vektors pCx36\_CFP

Aus den verfügbaren DNS Fragmenten des Connexin36 und verschiedener anderer Vektoren wurde der Vektor pmCx36\_CFP (siehe Abbildung 13 und Kapitel 4.1) hergestellt. In diesem Vektor befindet sich die kodierende Region des Connexin36 im Leseraster mit dem Fluoreszenz Protein eCFP. Als Ausgangvektor dienten der Vektor pmCx36 [Söhl Doktorarbeit, 1999] und der Vektor peCFP-N1 von Clontech. Der Endvektor sollte ein einfacher Austauschvektor werden, ohne die Möglichkeit einer konditionalen Deletion in der Maus durch das Cre/LoxP oder flp/frt System. Der fertiggestellte Vektor ist für Untersuchungen in HeLa Zellkultursystemen geeignet. Damit können auch Doppel-Transfektanten erzeugt werden, mit Cx45-eGFP und Cx36-eCFP. Mit Hilfe dieser transgenen Zellen könnte untersucht werden, inwieweit sich heteromere oder heterotypische Gap Junctions in HeLa Zellen ausbilden könnten.

## 5.2 Klonierung des Vektors BAC 45-GFP

Der hier hergestellte veränderte BAC Vektor sollte die kodierende Region des Connexin45 im Leseraster mit eCFP beinhalten. Im Laufe der Klonierung des Shuttlevektors wurde zwischenzeitlich das eCFP gegen eGFP ausgetauscht. Dies geschah, weil parallel zur Klonierung des Shuttlevektors ein klassischer Austauschvektor kloniert wurde, der ein Fusionsprodukt mit eCFP beinhaltet. Der Umstieg auf eGFP versprach eine Verbesserung der Chancen für den Nachweis des Fluoreszenzproteins, so dass letztlich in beiden zu erstellenden Mauslinien unterschiedliche GFP Varianten zum Einsatz kommen sollten. Zum Zeitpunkt der Entscheidung für dieses Projekt existierte noch kein Antikörper gegen Connexin45, der zuverlässig funktionierte.

Bei der Erzeugung einer transgenen Mauslinie mit Hilfe der Oozyten Injektion von genetisch veränderter DNS verspricht die Verwendung eines BAC Vektors einige Vorteile.

Aufgrund der Größe dieses Vektors, hier mit ca. 260 kb, sollten alle regulativen Sequenzen des endogenen Bereiches des Connexin45 inklusive des endogenen Promotors in dem Vektor integriert sein. Aus diesem Grund sollte die Expression des Fusionsproteins Cx45-eGFP der endogenen Expression des Cx45 entsprechen. Daher könnte in den transgenen Tieren eine Zelltypbestimmung durchgeführt werden, um festzustellen in welchen Zellen das Fusionsprotein zu finden ist.

Aus den verfügbaren DNS Sequenzen für das Connexin45 und anderen Vektoren wurde der „Shuttle“ Vektor für die homologe Rekombination in *E.coli* Bakterien hergestellt (siehe Kapitel 4.2). Die kritische Fusionssequenz mit dem deletierten Stop Kodon wurde sequenziert. Der „Shuttle“ Vektor ist ein Vektor mit einer geringen Kopienanzahl pro Bakterienzelle (Yang et al.; 1997) und war daher schwierig aufzureinigen und zu klonieren. Mit dem fertigen Shuttlevektor wurde die homologe Rekombination in *E.coli* Bakterien mit dem BAC Vektor 2235 erfolgreich durchgeführt, der letzte Schritt in Kooperation mit Julia von Maltzahn. Die erfolgreiche homologe Rekombination konnte mit Hilfe einer Southern Blot Hybridisierung nachgewiesen werden.

An die noch durchzuführende Aufreinigung kann sich die Injektion in Oozyten anschließen um auf diesem Wege eine transgene Mauslinie zu erzeugen. Da aufgrund der Methode mehr als eine Kopie des BAC Vektors in das Genom der Maus eingebaut werden kann (die Anzahl ist nicht vorhersagbar), muss als erstes festgestellt werden, wieviele Kopien des BAC Vektors in das Genom integriert wurden. Die Bestimmung der Anzahl wird mit Hilfe einer Southern Blot Hybridisierung abgeschätzt werden. Im Anschluss daran ist es möglich verschiedene Mauslinien zu etablieren, die eine unterschiedliche Anzahl von Kopien im Genom aufweisen. Diese Linien können miteinander verglichen werden, um die Auswirkungen einer Überexpression des Cx45-eGFP Fusionsproteins z.B. auf die Embryonalentwicklung zu analysieren. Voraussetzung hier ist allerdings, dass die Integration des BAC Konstruktes nicht zu mehr oder weniger starken Phänotypen oder sogar zu einer embryonalen Letalität führt.

## 5.3 Klonierung des Vektors KI45\_CFP

Da die Klonierung des Shuttle Vektors für die BAC Klonierung sehr schwierig und langwierig war, wurde zusätzlich ein Austauschvektor kloniert, der für die homologe Rekombination in ES-Zellen benutzt werden konnte. Dieser Vektor wurde aus den vorhandenen Sequenzen des Connexin45 und verschiedener anderer Vektoren (siehe Kapitel 4.3.7) kloniert. Die Klonierung umfasste acht Schritte.

Der fertige Austauschvektor wurde sequenziert und durch Restriktionsanalysen überprüft. Die funktionelle Überprüfung des Fusionskonstruktes wurde durch die Herstellung eines Zellkulturvektors erreicht, wie im folgenden Kapitel diskutiert wird. Der Austauschvektor besitzt die komplette Exon Intron Struktur des Connexin45 mit den Exons 1c, 2 und 3 als 5' homologen Bereich und ca. 2,4 kb des 3' Bereichs als Homologiebereich für das Rekombinationsereignis.

Das Stopcodon des Connexin45 wurde deletiert und eine Linkersequenz zwischen Cx45 Exon3 und eCFP inkloniert, Cx45 befindet sich im gleichen Leseraster mit eCFP. Hinter der eCFP Sequenz befindet sich ein Bereich von rund 400 Basenpaaren mit Sequenzen aus dem 3' Bereich des Connexin45. Diese Sequenz wurde so kurz gewählt, um die Insertion der Sequenz des eCFP als auch die des Neomycin Resistenzgens bei einer Rekombination in das Zielgenom zu begünstigen. Je kürzer diese Sequenz ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit eines Rekombinationsereignisses an dieser Stelle. Daran schließt sich die Neomycin Resistenz Kasette an, die von zwei f<sub>rt</sub> Sequenzen flankiert wird.

Die stromabwärts gelegene f<sub>rt</sub> Sequenz dient als Erkennungssequenz für einen der beiden Primer, mit denen die erfolgreiche homologe Rekombination in transfizierten ES-Zellen überprüft wurde- Der andere Primer bindet außerhalb der inserierten Sequenz. Diese PCR ist aufgrund der langen 5' Homologie des Austauschvektors die einzige Möglichkeit, mit der die Rekombination durch PCR nachgewiesen werden kann. Mit Hilfe dieses Vektors wurden ES-Zellen erzeugt, die Cyan fluoreszierende Connexin45-eCFP Proteine erzeugen (Kapitel 4.7).

## 5.4 Erzeugung stabiler HeLa Cx45-CFP Zellen

Ausgehend von einer Vorstufe des Austauschvektors (siehe 4.3.5) wurde ein Vektor kloniert, mit dem erfolgreich HeLa Zellen transfiziert werden konnten, die Cyan fluoreszierende Cx45-eCFP Proteine exprimieren. Es wurden vier Vektoren erzeugt, mit denen Transfektionsversuche unternommen wurden. Lediglich nach Transfektion mit dem zuletzt klonierten Vektor `45cfp_helatest4` (siehe 4.4.3) konnten entsprechend fluoreszierende Plaques nachgewiesen werden. Bei jedem Klonierungsschritt wurde ein Teil des 5' Bereichs mit der Exon-Intron Struktur des Cx45 entfernt. Erst mit der kompletten Entfernung des 5' Bereiches, so dass sich das Startcodon direkt hinter dem CMV Promotor des Vektors befand, konnten Zellen mit blauer Fluoreszenz nachgewiesen werden. Auch konnten vorher nach Zugabe des Selektionsmediums mit Puromycin kaum oder gar keine überlebenden Zellen festgestellt werden. Es bleibt aber festzuhalten, daß die Transfektion eines Zellkulturvektors mit Connexin45-CFP und Bereichen aus dem 5' Bereich des Connexins45 in HeLa Zellen nicht zu lebensfähigen HeLa Zellen führt. Die Zellen sterben nach Zugabe des Selektionsmarkers Puromycin ab. Überlebende Klone zeigten keine Fluoreszenz. Inwieweit der 5' Bereiche Einfluß auf die Lebensfähigkeit der HeLa hat, kann nicht entschieden werden. Hier könnte man mit induzierbaren Konstrukten versuchen herauszufinden, ob durch Induzierung der Expression ein letaler Effekt nachzuweisen ist.

Die überlebenden Zellen zeigten keine Expression des Cx45-CFP. Erst durch den Verzicht auf den 5' Bereich konnten einige wenige überlebensfähige HeLa Zellen beobachtet werden, aus denen auch eine stabile Zelllinie erstellt werden konnte.

Dass die blau fluoreszierenden Plaques in der Membran aus Connexin45 und eCFP bestehen, wurde mit Antikörperfärbungen nachgewiesen (siehe 4.6.2).

Der so erzeugte HeLa Klon könnte auch noch für eine weitere Transfektion benutzt werden, um eine Coexpression mit anderen mit einem Fluoreszenzprotein markierten oder auch unmarkierten Connexinen zu untersuchen.

## 5.5 Erzeugung homolog rekombinierter Cx45-CFP ES-Zellen

Nachdem klar wurde, dass Cx45-CFP in HeLa Zellen Gap Junction Plaques bilden und der Austauschvektor KI45\_CFP sequenziert und für korrekt befunden wurde, wurde dieser Vektor zur homologen Rekombination in ES-Zellen eingesetzt.

Nach stabiler Transfektion von ES-Zellen unter Verwendung des linearisierten Austauschvektor „KI45\_CFP“ (siehe 4.3.7) wurden insgesamt 866 G418-resistente ES-Zellklone aus drei verschiedenen Transfektionen isoliert. Von diesen 866 Klonen wurden zwölf durch PCR positiv getestet, die aufgrund des PCR Ergebnisses im 3' Bereich als homolog rekombiniert charakterisiert wurden (siehe 4.7.3). Die Frequenz lag damit bei ca. 1,4%. Von diesen zwölf PCR positiven ES-Zellklonen wurden sechs mit Hilfe einer Southern Blot Hybridisierung weiter charakterisiert (siehe 4.7.3). Dadurch konnte die homologe Rekombination auf der 3' Seite bestätigt werden. Die sich anschließende Karyotyp Analyse der Klone gab Auskunft über die in der Zellkultur aufgetretenen Chromosomen-Aberrationen und führte zu der Auswahl der ES-Zellklone (siehe Tab.4.7.3-1) für die Blastozysten-Injektion. Einer der positiven ES-Zellklone (Klon 301) konnte mit Hilfe des Laserscan Mikroskopes untersucht werden. Dieser Klon zeigte eine Fluoreszenz im für eCFP typischen Frequenzbereich (siehe 4.7.4), allerdings war diese Fluoreszenz sehr schwach. Inwieweit daraus erzeugte transgene Tiere tatsächlich eine genügend starke Expression des Cx45-CFP zeigen und damit eine Lokalisationstudie oder Interaktionsstudien ermöglichen werden, ist mit diesen Ergebnissen nicht abschätzbar.

Eine PCR über den 5' Bereich ist aufgrund der sehr langen 5' Homologie im Austauschvektor nicht möglich. Die Bestätigung der korrekten Rekombination kann hier nur über eine Southern Blot Hybridisierung erfolgen, die noch durchgeführt werden muß.

Die hier erzeugten ES-Zellen können nun für Blastozysten Injektionen verwendet werden, um eine transgene Cx45-eCFP Mauslinie zu erzeugen. Mit dieser produzierten Mauslinie lassen sich dann z.B. „Rescue“ Experimente durchführen. Zum Beispiel könnte man noch eine Kreuzung mit Cx45-KO Tieren machen, um herauszufinden, ob das Fusionsprotein aus Cx45 und eCFP die Funktion des Cx45 vollständig übernehmen kann, oder ob es dabei zu Problemen kommt, die sich in einer phänotypischen Anomalie äußern. Im ersten Schritt wird zu zeigen sein, ob heterozygote Tiere mit dem Genotyp Cx45/Cx45-CFP lebensfähig

sind oder ob ein Phänotyp nachweisbar ist. Falls ein schwerwiegender Phänotyp oder sogar eine embryonale Letalität festgestellt wird, zeigt dieses, dass der C-Terminus von Cx45 nicht ohne Funktionsverlust markiert sein darf. Dies würde allerdings eine Reihe von Fragen aufwerfen, welche Funktion des C-Terminus des Cx45 gestört wäre, wie z.B. die Bindung verschiedener Proteine.

## 5.6 Ausblick

Weitere Experimente die mit den hier erstellten Ergebnissen möglich sind, sind zum einen die Herstellung der transgenen Mäusen mit Hilfe der genetisch veränderten ES-Zellen durch Blastozysteninjektion und des BAC Vektors durch die Oozyten Injektion. Der BAC Vektor muß vorher noch aufgereinigt werden. Als erstes wird dabei festzustellen sein, inwieweit die so erzeugten Mäuse lebensfähig sind.

Wenn sie denn lebensfähig sind, können die so erzeugten Mäuse dabei direkt miteinander verglichen werden, und können mit Cx45 KO Mäusen gekreuzt werden. So kann auch herausgefunden werden, ob die embryonale Letalität der Cx45KO Mäuse durch das Fusionsprotein Cx45-CFP oder Cx45-eGFP aufgehoben werden kann, das Fusionsprotein die Funktion des nativen Cx45 übernehmen kann.

Weiterhin können mit Geweben dieser Mäuse Farbstoffinjektionsexperimente durchgeführt werden, um das Kopplungsverhalten der Zellen untereinander zu untersuchen. Zusätzlich können Farbstofftransfer Experimente mit den erzeugten Cx45-eCFP HeLa Zellen durchgeführt werden. Diese Ergebnisse könnten dann mit den Ergebnissen aus den Gewebeuntersuchungen verglichen werden.

Mit den Mäusen, die durch die Injektion des BAC Vektors in Oozyten hergestellt werden können, können Überexpressions Experimente durchgeführt werden, z.B. ob die Überexpression des Connexin45-eGFP Einfluß auf die Embryogenese hat.

An beiden erzeugten Mauslinien kann mit Hilfe von Elektrokardiogramm Experimente untersucht werden, inwieweit sich am Herzen Unterschiede zu Wildtyp Mäusen erkennen lassen. Weitere interessante Gewebe zur Untersuchung sind z.B. Retina, Darm oder auch das Gehirn.

## Diskussion

Die so erzeugten Mäusen sollten vollständig charakterisiert werden, z.B. durch die Herstellung von Kryoschnitten und Immunfluoreszenz Untersuchungen zu Lokalisations und Kolo-kalisationsexperimente mit verschiedenen Connexinen, direkte Fluoreszenz Untersuchungen zu Lokalisation der Cx45 Fusionsproteine und elektrophysiologische Untersuchungen an Gewebedickschnitten des Gehirns, Elektroretinogramme und weitere Verhaltenstests.

## 6 Zusammenfassung

Für Untersuchungen der genauen Lokalisation des Cx45 Proteins in Geweben wurde ein Austauschvektor erstellt, bestehend aus zur Verfügung stehenden Sequenzabschnitten des Cx45 und dem „enhanced cyano fluorescent protein (eCFP)“. In diesem Vektor befinden sich Cx45 mit deletiertem Stop Codon und eCFP im gleichen Leseraster, so dass bei einer Expression ein Fusionsprotein aus Cx45 und eCFP entstehen kann. Der Vektor wurde in embryonale Stammzellen transfiziert und positive Klone wurden durch PCR, fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und Southern Blot Hybridisierungs Analysen bestätigt. Diese ES Zellen können für die Erzeugung einer transgenen Maus verwendet werden.

Außerdem wurde ein Shuttlevektor kloniert, mit dessen Hilfe ein BAC Vektor durch homologe Rekombination in *E.coli* Bakterien verändert werden konnte. Dieser BAC Vektor beinhaltet nach der homologen Rekombination die Sequenz von Connexin45 mit deletiertem Stop Codon und eGFP im selben Leseraster. Die Expression eines Fusionsproteins steht dabei unter dem endogenen Cx45 Promotor. Dieser BAC Vektor kann für die Oozyten Injektion verwendet werden, um eine transgene Maus herzustellen, die das Fusionsprotein aus Cx45 und eGFP überexprimiert durch zufällige Insertion des Vektors in das Zielgenom. Außerdem wurde ein Vektor erzeugt, der in HeLa Zellen transfiziert wurde und dort zur Expression von blau fluoreszierenden membranständigen Gap Junction Plaques führte. Diese Plaques konnte mit Hilfe von Antikörper gegen Cx45, bestätigt werden. Es wurde ein positiver Klon aus diesen Versuchen gewonnen.

Zur weitergehenden Untersuchung des neuronalen Cx36 wurde die Vorstufe eines Austauschvektors, unter Verwendung verschiedener Zwischenvektoren, erstellt. Dieser Austauschvektor wurde mittels kodierender DNAs von Maus Cx36 und eCFP kloniert. Die Sequenzen von Cx36 und eCFP befinden sich im Leseraster, das Stop Codon des Cx36 wurde deletiert, so dass bei der Expression im Zellkultursystem oder in der Maus ein Fusionsprodukt entstehen kann. Mit diesem Fusionsprotein aus Cx36 und eCFP kann die Lokalisation des Connexin36 in Geweben der Cx36 auch ohne Antikörper gegen Cx36 durchgeführt werden. Der Vektor eignet sich für Untersuchungen in HeLa Zellkultursystemen.



## 7 Literatur

Al-Ubaidi MR, White TW, Ripps H, Poras I, Avner P, Gomes D, und Bruzzone R. 2000. Functional properties, developmental regulation, and chromosomal localization of murine connexin36, a gap- junctional protein expressed preferentially in retina and brain. *J Neurosci Res* 59:813-826.

Alcolea S, Theveniau-Ruissy M, Jarry-Guichard T, Marics I, Tzouanacou E, Chauvin JP, Briand JP, Moorman AF, Lamers WH, Gros DB. 1999. Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circ Res.* 84:1365-79.

Anderson CL, Zundel MA, Werner R. 2005. Variable promoter usage and alternative splicing in five mouse connexin genes. *Genomics.* 85:238-44.

Atkinson MM, Lampe PD, Lin HH, Kollander R, Li XR, und Kiang DT. 1995. Cyclic AMP modifies the cellular distribution of connexin43 and induces a persistent increase in the junctional permeability of mouse mammary tumor cells. *J Cell Sci* 108:3079-3090.

Ausubel FM, Brent A, Kingston RE, Moore DD, Seidman JA, Smith JA, und Struhl K. 1989-2001. *Current protocols in molecular biology.* John Wiley & Sons, New York.

Belluardo N, Trovato-Salinaro A, Mudo G, Hurd YL, und Condorelli DF. 1999. Structure, chromosomal localization, and brain expression of human Cx36 gene. *J Neurosci Res* 57:740-752.

Belluardo N, Mudo G., Trovato-Salinaro A, Le Gurun S, Charollais A, Serre-Beinier V, Amato G, Haefliger JA, Meda P, und Condorelli DF. 2000. Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain. *Brain Res* 865:121-138.

Bennett MVL und Verselis VK. 1992. Biophysics of gap junctions. *Semin Cell Biol* 3:29-47.

Beyer EC, Goodenough DA, und Paul DL. 1988. The Connexins, a Family of Related Gap Junction Proteins. In: Hertzberg EL und Johnson RG (eds.), New York, Alan R Liss., *Gap Junctions* 167-175.

Bradley A, Zheng B, und Liu P. 1998. Thirteen years of manipulating the mouse genome: a personal history. *Int J Dev Biol* 42:943-50.

Brink PR, Cronin K, Banach K, Peterson E, Westphale EM, Seul KH, Ramanan SV, und Beyer EC. 1997. Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37. *Amer J Physiol* 273:C1386-C1396.

Brink P. 2000. Gap junction voltage dependence. A clear picture emerges. *J Gen Physiol* 116:11-12.

Brune Hendrik, 2000. Diplomarbeit. Konstruktion und Test eines Vektors zur zell- bzw.

## Literatur

entwicklungsspezifischen Deletion des Cx45-Gens in der Maus. Universität Bonn.

Bruzzone R, White TW, und Goodenough DA. 1996. The cellular Internet: On-line with connexins. *Bioessays* 18:709-718.

Bruzzone R und Ressot C. 1997. Connexins, gap junctions and cell-cell signaling in the nervous system. *Eur J Neurosci* 9:1-6.

Bruzzone S, Guida L, Zocchi E, Franco L, und De Flora A. 2001. Connexin 43 hemichannels mediate Ca<sup>2+</sup>-regulated transmembrane NAD<sup>+</sup> fluxes in intact cells. *FASEB J* 15:10-12.

Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe M, Herb A, und Monyer H. 2003. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13644-13649.

Buchholz F, Angrand PO, und Stewart AF. 1996. A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res* 24:3118-3119.

Bukauskas FF, Angele AB, Verselis VK, Bennett MV. 2002; Coupling asymmetry of heterotypic connexin 45/ connexin 43-EGFP gap junctions: properties of fast and slow gating mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 14;99(10):7113-8. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10228.

Bullock WO, Fernandez JM, und Short JM. 1987. XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5:376-380.

Butterweck A, Elfgang C, Willecke K, Traub O. 1994. Differential expression of the gap junction proteins connexin45, -43, -40, -31, and -26 in mouse skin. *Eur J Cell Biol*. 65:152-63.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263:802-5.

Cicirata F, Parenti R, Spinella F, Giglio S, Tuorto F, Zuffardi O, und Gulisano M. 2000. Genomic organization and chromosomal localization of the mouse Connexin36 (mCx36) gene. *Gene* 251:123-130.

Condorelli DF, Parenti R, Spinella F, Trovato SA, Belluardo N, Cardile V, und Cicirata F. 1998. Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur J Neurosci* 10:1202-1208.

Cooper CD und Lampe PD. 2002. Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. *J Biol Chem* 277:44962-44968.

Coppen SR, Dupont E, Rothery S, Severs NJ. 1998. Connexin45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart. *Circ Res*. 82:232-43.

## Literatur

- Degen, Joachim. 2003. Erzeugung und Charakterisierung von konditionalen Knock-In Reporter-Mäusen des Connexin36.
- Desplantez T, Halliday D, Dupont E, Weingart R. 2004. Cardiac connexins Cx43 and Cx45: formation of diverse gap junction channels with diverse electrical properties. *Pflugers Arch.* 448:363-75.
- Dillon N, Grosveld F. 1993. Transcriptional regulation of multigene loci: multilevel control. *Trends Genet.* 9:134-7. Review.
- Eiberger J, Degen J, Romualdi A, Deutsch U, Willecke K, und Söhl G. 2001. Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell Commun Adhes* 8:163-165.
- Eiberger J, Kibschull M, Strenzke N, Schober A, Bussow H, Wessig C, Djahed S, Reucher H, Koch DA, Lautermann J, Moser T, Winterhager E, Willecke K. 2006. Expression pattern and functional characterization of connexin29 in transgenic mice. *Glia.* 53:601-11.
- Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Fraté H, Butterweck A, Traub O, Kléber AG, Hülser DF, und Willecke K. 1995. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129:805-817.
- Eng SR, Gratwick K, Rhee JM, Fedtsova N, und Turner EE. 2001. Defects in sensory axon growth precede neuronal death in Brn3a-deficient mice. *J Neurosci* 21:541-549.
- Evans WH und Martin PE. 2002. Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol* 19:121-136.
- Feigenspan A, Teubner B, Willecke K, und Weiler R. 2001. Expression of neuronal connexin36 in AII amacrine cells of the mammalian retina. *J Neurosci* 21:230-239.
- Feigenspan A, Janssen-Bienhold U, Hormuzdi S, Monyer H, Degen J, Söhl G, Willecke K, und Weiler R. Cellular expression of neural connexin36 in the outer retina of the mouse. *J Neurosc*
- Foote CI, Zhou L, Zhu X, und Nicholson BJ. 1998. The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. *J Cell Biol* 140:1187-1197.
- Frengen E, Weichenhan D, Zhao B, Osoegawa K, van Geel M, de Jong PJ. 1999. A modular, positive selection bacterial artificial chromosome vector with multiple cloning sites. *Genomics.* 58:250-3.
- Eirik Frengen, Dieter Weichenhan, Baohui Zhao, Kazutoyo Osoegawa, Michel van Geel and Pieter J. de Jong. 1999. A Modular, Positive Selection Bacterial Artificial Chromosome Vector with Multiple Cloning Sites, *Genomics* 58:250-253
- Falk MM, Lauf U. 2001. High resolution, fluorescence deconvolution microscopy and tagging with the autofluorescent tracers CFP, GFP, and YFP to study the structural composition of gap junctions in living cells. *Microsc Res Tech.* 52:251-62. Review.

## Literatur

- Fuhrspan EJ, Potter DD. 1959. Slow post-synaptic potentials recorded from the giant motor fibre of the crayfish. *J Physiol.* 145:326-35.
- Gilula NB. 1987. Topology of gap junction protein and channel function. *Ciba Found Symp* 125:128-139.
- Gimlich RL, Kumar NM, und Gilula NB. 1990. Differential Regulation of the Levels of Three Gap Junction mRNAs in *Xenopus* Embryos. *J Cell Biol* 110:597-605.
- Goodenough DA und Paul DL. 2003. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:285-294.
- Goodenough DA. 1976. In vitro formation of gap junction vesicles. *J Cell Biol.* 68:220-31.
- Goodenough DA. 1976. The structure and permeability of isolated hepatocyte gap junctions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 40:37-43.
- Gros DB und Jongsma HJ. 1996. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 18:719-730.
- Gulisano M., Parenti R, Spinella F, und Cicirata F. 2000. Cx36 is dynamically expressed during early development of mouse brain and nervous system. *Neuroreport* 11:3823-3828.
- Gustincich S, Batalov S, Beisel KW, Bono H, Carninci P, Fletcher CF, Grimmond S, Hirokawa N, Jarvis ED, Jegla T, Kawasaki Y, LeMieux J, Miki H, Raviola E, Teasdale RD, Tominaga N, Yagi K, Zimmer A, Hayashizaki Y, Okazaki Y, RIKEN GER Group, und GSL Members. 2003. Analysis of the mouse transcriptome for genes involved in the function of the nervous system. *Genome Res* 13:1395-1401.
- Güldenagel M, Söhl G, Plum A, Traub O, Teubner B, Weiler R, und Willecke K. 2000. Expression patterns of connexin genes in mouse retina. *J Comp Neurol* 425:193-201.
- Güldenagel Martin. 2001. Doktorarbeit. Erzeugung und Analyse Connexin36-defizienter Mäuse. Universität Bonn.
- Hamilton CM, Aldea M, Washburn BK, Babitzke P, Kushner SR. 1989 New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 171:4617-22.
- Harris AL. 2002. Voltage-sensing and substate rectification: moving parts of connexin channels. *J Gen Physiol* 119:165-169.
- Hashimoto-Gotoh T, Sekiguchi M. 1977. Mutations of temperature sensitivity in R plasmid pSC101. *J Bacteriol.* 131:405-12.
- Hennemann H, Schwarz HJ, und Willecke K. 1992b. Characterization of gap junction genes expressed in F9 embryonic carcinoma cells: molecular cloning of mouse connexin31 and -45 cDNAs. *Eur J Cell Biol* 57:51-58.
- Herrera PL. 2000. Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 127:2317-2322.

## Literatur

- Hidaka S, Akahori Y, Kurosawa Y. 2004. Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 24:10553-67.
- Hombach S, Janssen-Bienhold U, Söhl G, Schubert T, Büssow H, Ott T, Weiler R, und Willecke K. 2004. Connexin57 (Cx57) deficient mice with lacZ reporter gene reveal functional expression of Cx57 in horizontal cells of the retina. *J Neurosci*
- Hormuzdi SG, Pais I, LeBeau FE, Towers SK, Rozov A, Buhl EH, Whittington MA, und Monyer H. 2001. Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice. *Neuron* 31:487-495.
- Horst M, Harth N, und Hasilik A. 1991. Biosynthesis of glycosylated human lysozyme mutants. *J Biol Chem* 266:13914-13919.
- Hosoda F, Nishimura S, Uchida H, Ohki M. 1990. An F factor based cloning system for large DNA fragments. *Nucleic Acids Res*. 18:3863-9.
- Ioannou PA, Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer MA, de Jong PJ. 1994. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet*. 6:84-9.
- Jacob A und Beyer EC. 2001. Mouse connexin 45: genomic cloning and exon usage. *DNA Cell Biol* 20:11-19.
- Jaenisch R. 1988. Transgenic animals. *Science*. 240:1468-74. Review.
- Jeon CJ, Strettoi E, und Masland RH. 1998. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18:8936-8946.
- John SA und Revel JP. 1991. Connexon integrity is maintained by non-covalent bonds: intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin-43. *Biochem Biophys Res Commun* 178:1312-1318.
- Jones HWJr, McKusick VA, Harper PS, und Wu KD. 1971. George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet Gynecol* 38:945-949.
- Kandel ER, Schwartz JH, und Jessell TM. 1995. Principles of Neural Science. Elsevier Science Publishing Co., New York.
- Kennison JA. 1993. Transcriptional activation of Drosophila homeotic genes from distant regulatory elements. *Trends Genet*. 9:75-9. Review.
- Kim UJ, Shizuya H, Kang HL, Choi SS, Garrett CL, Smink LJ, Birren BW, Korenberg JR, Dunham I, Simon MI. 1996. A bacterial artificial chromosome-based framework contig map of human chromosome 22q. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:6297-301.
- Ko YS, Coppen SR, Dupont E, Rothery S, Severs NJ. 2001. Regional differentiation of desmin, connexin43, and connexin45 expression patterns in rat aortic smooth muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21:355-64.

## Literatur

Koval M. 2006. Pathways and control of connexin oligomerization. *Trends Cell Biol.* 16:159-66.

Krutovskikh VA, Piccoli C, Yamasaki H, und Yamasaki H. 2002. Gap junction intercellular communication propagates cell death in cancerous cells. *Oncogene* 21:1989-1999.

Krüger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, und Willecke K. 2000. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 127:4179-4193.

Kumai M, Nishii K, Nakamura K, Takeda N, Suzuki M, Shibata Y. 2000 Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development.* 127:3501-12.

Kumar NM und Gilula NB. 1996. The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388.

Laird DW. 1996. The life cycle of a connexin: Gap junction formation, removal, and degradation. *J Bioenerg Biomembrane* 28:311-318.

Lampe PD und Lau AF. 2000. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384:205-215.

Levin M. 2002. Isolation and community: a review of the role of gap-junctional communication in embryonic patterning. *J Membr Biol* 185:177-192.

Lewandoski M. 2001. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2:743-755.

Li X, Simard JM. 2001. Connexin45 gap junction channels in rat cerebral vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281:H1890-8.

Magin TM, McWhir J, und Melton DW. 1992. A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res* 20:3795-3796.

Martin AO, Mathieu MN, Chevillard C, und Guerineau NC. 2001. Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca<sup>2+</sup> increases between chromaffin cells in adrenal slices: A role in catecholamine release. *J Neurosci* 21:5397-5405.

Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC. 2002. Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res.* 90:1100-7.

Maxeiner S, Krüger O, Schilling K, Traub O, Urschel S, und Willecke K. 2003. Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience* 119:689-700.

Maxeiner S, Dedek K, Janssen-Bienhold U, Ammermuller J, Brune H, Kirsch T, Pieper M, Degen J, Kruger O, Willecke K, Weiler R. 2005. Deletion of connexin45 in mouse retinal

neurons disrupts the rod/cone signaling pathway between AII amacrine and ON cone bipolar cells and leads to impaired visual transmission. *J Neurosci.* 25:566-76.

Maxeiner Stephan, 2005, Doktorarbeit

Meiners S, Xu A, und Schindler M. 1991. Gap junction protein homologue from *Arabidopsis thaliana*: evidence for connexins in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4119-4122.

Mills SL, O'Brien JJ, Li W, O'Brien J, und Massey SC. 2001. Rod pathways in the mammalian retina use connexin 36. *J Comp Neurol* 436:336-350.

Minkoff R, Bales ES, Kerr CA, Struss WE. 1999. Antisense oligonucleotide blockade of connexin expression during embryonic bone formation: evidence of functional compensation within a multigene family. *Dev Genet.* 24:43-56.

Morley GE, Ek-Vitorin JF, Taffet SM, und Delmar M. 1997. Structure of connexin43 and its regulation by pH(i). *J Cardiovasc Electrophysiol* 8:939-951.

Mullis KB und Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.

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

Nagy A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109.

Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, und Behringer R. 2003. *Manipulating the Mouse Embryo; a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Nagy JI, Li X, Rempel J, Stelmack G, Patel D, Staines WA, Yasumura T, und Rash JE. 2001. Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43. *J Comp Neurol* 441:302-323.

Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neeffjes J. 2005 Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature.* 434:83-8.

Neuhaus IM, Dahl G, und Werner R. 1995. Use of alternate promoters for tissue-specific expression of the gene coding for connexin32. *Gene* 158:257-262.

Niessen H, Harz H, Bedner P, Krämer K, und Willecke K. 2000. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Sci* 113:1365-1372.

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.* 107:255-64.

## Literatur

- O'Connor M, Peifer M, Bender W. 1989. Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science*. 244:1307-12.
- Paemeleire K, Martin PE, Coleman SL, Fogarty KE, Carrington WA, Leybaert L, Tuft RA, Evans WH, Sanderson MJ. 2000. Intercellular calcium waves in HeLa cells expressing GFP-labeled connexin 43, 32, or 26. *Mol Biol Cell*. 11:1815-27.
- Palmiter RD, Brinster RL. 1985. Transgenic mice. *Cell*. 41:343-5. Review.
- Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, und Lukyanov S. 2000. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol* 10:R473-R474.
- Paul DL. 1995. New functions for gap junctions. *Curr Opin Cell Biol* 7:665-672.
- Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, Innis JW, Dinulos MB, Christian C, Hannibal MC, und Jabs EW. 2003. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet* 72:408-418.
- Perkins GA, Goodenough DA, und Sosinsky GE. 1998. Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 rotation for interdigitating two apposing connexons. *J Mol Biol* 277:171-177.
- Petrasch-Parwez E, Habbes HW, Weickert S, Lobbecke-Schumacher M, Striedinger K, Wiczorek S, Dermietzel R, Epplen JT. 2004. Fine-structural analysis and connexin expression in the retina of a transgenic model of Huntington's disease. *J Comp Neurol*. 479:181-97.
- Phelan P und Starich TA. 2001. Innexins get into the gap. *Bioessays* 23:388-396.
- Plum A, Winterhager E, Pesch J, Lautermann J, Hallas G, Rosentreter B, Traub O, Herberhold C, und Willecke K. 2001. Connexin31-deficiency in mice causes transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation. *Dev Biol* 231:334-347.
- Plum Achim. 1999. Doktorarbeit. Untersuchungen zur Regulation, Funktion und Austauschbarkeit verschiedener Connexingene in der Maus. Universität Bonn.
- Porter A. 1998. Controlling your losses: conditional gene silencing in mammals. *Trends Genet* 14:73-79.
- Rash JE, Staines WA, Yasumura T, Patel D, Furman CS, Stelmack GL, und Nagy JI. 2000. Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7573-7578.
- Rash JE, Yasumura T, Davidson KG, Furman CS, Dudek FE, und Nagy JI. 2001a. Identification of cells expressing Cx43, Cx30, Cx26, Cx32 and Cx36 in gap junctions of rat brain and spinal cord. *Cell Commun Adhes* 8:315-320.
- Rash JE, Yasumura T, Dudek FE, und Nagy JI. 2001b. Cell-specific expression of



## Literatur

connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci* 21:1983-2000.

Revel JP und Karnovsky M.J. 1967. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* 33:C7-C12.

Risek B, Klier FG, Gilula NB. Developmental regulation and structural organization of connexins in epidermal gap junctions. *Dev Biol*. 1994 Jul;164(1):183-96.

Rodríguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, und Dymecki SM. 2000. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25:139-140.

Rose B und Loewenstein WR. 1975. Calcium ion distribution in cytoplasm visualised by aequorin: diffusion in cytosol restricted by energized sequestering. *Science* 190:1204-1206.

Rouach N, Avignone E, Meme W, Koulakoff A, Vanance L, Blomstrand F, und Giaume C. 2002. Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell* 94:457-475.

Sáez JC, Gregory WA, Watanabe T, Dermietzel R, Hertzberg EL, Reid L, Bennett MV, und Spray DC. 1989. cAMP delays disappearance of gap junctions between pairs of rat hepatocytes in primary culture. *Am J Physiol* 257:C1-C11.

Sáez JC, Berthoud VM, Moreno AP, und Spray DC. 1993. Multiplicity of Controls in Differentiated and Undifferentiated Cells and Possible Functional Implications. *Adv Second Messenger and Phosphoprotein Res* 27:163-198.

Sáez JC, Martinez AD, Branes MC, und Gonzalez HE. 1998. Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz J Med Biol Res* 31:593-600.

Sáez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, und Beyer EC. 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83:1359-1400.

Saltiel AR. 2001. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 104:517-529.

Sambrook J und Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schoppa NE und Westbrook GL. 2002. AMPA autoreceptors drive correlated spiking in olfactory bulb glomeruli. *Nat Neurosci* 5:1194-1202.

Schubert T, Degen J, Hormuzdi S, Güldenagel M, Monyer H, Willecke K, und Weiler R. 2004. Cx36 mediates coupling of OFF-alpha ganglion cells in the mouse retina. *J Neurosci*.

Schwarz M, Wanke I, Wulbrand U, Moennikes O, und Buchmann A. 2003. Role of connexin32 and beta-catenin in tumor promotion in mouse liver. *Toxicol Pathol* 31:99-102.

## Literatur

Schwenk F, Zevnik B, Bruning J, Rohl M, Willuweit A, Rode A, Hennek T, Kauselmann G, Jaenisch R, und Kühn R. 2003. Hybrid embryonic stem cell-derived tetraploid mice show apparently normal morphological, physiological, and neurological characteristics. *Mol Cell Biol* 23:3982-3989.

Schubert T, Maxeiner S, Kruger O, Willecke K, Weiler R. 2005 . Connexin45 mediates gap junctional coupling of bistratified ganglion cells in the mouse retina. *J Comp Neurol*. 490:29-39.

Serre-Beinier V, Le Gurun S, Belluardo N, Trovato-Salinaro A, Charollais A, Haefliger JA, Condorelli DF, und Meda P. 2000. Cx36 preferentially connects beta-cells within pancreatic islets. *Diabetes* 49:727-734.

Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:8794-7.

Shipley MT, McLean JH, Zimmer LA, und Ennis M. 1996. The olfactory system. In *Handbook of chemical neuroanatomy, Integrated systems of the CNS*. Ed. Björklund A, Hökfelt T, und Sanson LW. Elsevier, Amsterdam.

Simon AM und Goodenough D.A. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol* 8:477-483.

Simon AM, Goodenough DA, Li E, und Paul DL. 1997. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385:525-529.

Simpson I, Rose B, Loewenstein WR. 1977 Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science*. 195:294-6.

Skerrett IM, Aranowitz J, Shin JH, Cymes G, Kasperek E, Cao FL, und Nicholson BJ. 2002. Identification of amino acid residues lining the pore of a gap junction channel. *J Cell Biol* 159:349-360.

Smith M und Pereda AE. 2003. Chemical synaptic activity modulates nearby electrical synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4849-4854.

Söhl G, Gillen C, Bosse F, Gleichmann M, Müller HW, und Willecke K. 1996. A second alternative transcript of the gap junction gene connexin32 is expressed in murine Schwann cells and modulated in injured sciatic nerve. *Eur J Cell Biol* 69:267-275.

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

Söhl Goran. 1999. Doktorarbeit. Identifizierung des Connexin36 Gens sowie Expressionsanalyse in Retina und Gehirn der Maus. Universität Bonn.

Söhl G, Güldenagel M, Traub O, und Willecke K. 2000. Connexin expression in the retina. *Brain Res Brain Res Rev* 32:138-145.

## Literatur

- Söhl G, Eiberger J, Jung YT, Kozak CA, und Willecke K. 2001a. The mouse gap junction gene connexin29 is highly expressed in sciatic nerve and regulated during brain development. *Biol Chem* 382:973-978.
- Söhl G, Theis M, Hallas G, Brambach S, Dahl E, Kidder G, und Willecke K. 2001b. A new alternatively spliced transcript of the mouse connexin32 gene is expressed in embryonic stem cells, oocytes, and liver. *Exp Cell Res* 266:177-186.
- Söhl G, Nielsen PA, Eiberger J, und Willecke K. 2003. Expression Profiles of the Novel Human Connexin Genes hCx30.2, hCx40.1, and hCx62 Differ from Their Putative Mouse Orthologues. *Cell Commun Adhes* 10:27-36.
- Sosinsky G. 1995. Mixing of connexins in gap junction membrane channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:9210-4.
- Spray DC, Bennett MVL, Campos de Carvalho AC, Eghbali B, Moreno AP, und Verselis V. 1991. Transjunctional voltage dependence of gap junction channels. In: *Biophysics of gap junction channels* (Ed. Peracchia C), CRC Press, Boca Raton, Florida:97-116.
- Srinivas M, Rozental R, Kojima T, Dermietzel R, Mehler M, Condorelli DF, Kessler JA, und Spray DC. 1999. Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction protein connexin36. *J Neurosci* 19:9848-9855.
- Steinberg TH, Civitelli R, Geist ST, Robertson AJ, Hick E, Veenstra RD, Wang HZ, Warlow PM, Westphale EM, Laing JG, et al. 1994. Connexin43 and connexin45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *EMBO J.* 13:744-50.
- Taniguchi M, Sanbo M, Watanabe S, Naruse I, Mishina M, und Yagi T. 1998. Efficient production of Cre-mediated site-directed recombinants through the utilization of the puromycin resistance gene, *pac*: a transient gene-integration marker for ES cells. *Nucleic Acids Res* 26:679-680.
- Temme A, Buchmann A, Gabriel HD, Nelles E, Schwarz M, und Willecke K. 1997. High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr Biol* 7:713-716.
- Teubner B, Degen J, Söhl G, Güldenagel M, Bukauskas FF, Trexler EB, Verselis VK, De Zeeuw CI, Lee CG, Kozak CA, Petrasch-Parwez E, Dermietzel R, und Willecke K. 2000. Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein. *J Membr Biol* 176:249-262.
- Teubner B, Odermatt B, Güldenagel M, Söhl G, Degen J, Bukauskas F, Kronengold J, Verselis VK, Jung YT, Kozak CA, Schilling K, und Willecke K. 2001. Functional expression of the new gap junction gene connexin47 transcribed in mouse brain and spinal cord neurons. *J Neurosci* 21:1117-1126.
- Teubner B, Michel V, Pesch J, Lautermann J, Cohen-Salmon M, Söhl G, Jahnke K, Winterhager E, Herberhold C, Hardelin JP, Petit C, und Willecke K. 2003. Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential.

## Literatur

Hum Mol Genet 12:13-21.

Thuneberg L und Peters S. 2001. Toward a concept of stretch-coupling in smooth muscle. I. Anatomy of intestinal segmentation and sleeve contractions. *Anat Rec* 262:110-124.

Trosko JE, Ruch RJ. 1998. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci.* 3:d208-36. Review.

Tsien RY. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 67:509-44. Review.

Unwin PN und Zampighi G. 1980. Structure of the junction between communicating cells. *Nature* 283:545-549.

Valdimarsson G und Kidder GM. 1995. Temporal control of gap junction assembly in preimplantation mouse embryos. *J Cell Sci* 108:1715-1722.

Valiunas V, Polosina YY, Miller H, Potapova IA, Valiuniene L, Doronin S, Mathias RT, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS, Brink PR. 2005. Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J Physiol.* 568:459-68.

Valiunas V, Bechberger JF, Naus CC, Brink PR, Goldberg GS. 2005. Nontransformed cells can normalize gap junctional communication with transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 333:174-9.

von Maltzahn J, Wulf V, Willecke K. 2006. Spatiotemporal expression of connexin 39 and -43 during myoblast differentiation in cultured cells and in the mouse embryo. *Cell Commun Adhes.* 13:55-60.

Wang M, Chen XN, Shouse S, Manson J, Wu Q, Li R, Wrestler J, Noya D, Sun ZG, Korenberg J, et al. 1994. Construction and characterization of a human chromosome 2-specific BAC library. *Genomics.* 24:527-34.

Wang YF, Daniel EE. 2001. Gap junctions in gastrointestinal muscle contain multiple connexins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281:G533-43.

Weidmann S. 1952. The electrical constants of Purkinje fibres. *J Physiol.* 118:348-60.

Willecke K, Jungbluth S, Dahl E, Hennemann H, Heynkes R, und Grzeschik KH. 1990. Six genes of the human connexin gene family coding for gap junctional proteins are assigned to four different human chromosomes. *Eur J Cell Biol* 53:275-280.

Willecke K, Heynkes R, Dahl E, Stutenkemper R, Hennemann H, Jungbluth S, Suchyna T, und Nicholson BJ. 1991. Mouse Connexin37: Cloning and Functional Expression of a Gap Junction Gene Highly Expressed in Lung. *J Cell Biol* 114:1049-1057.

Willecke K und Haubrich S. 1996. Connexin expression systems: To what extent do they reflect the situation in the animal?. *J Bioenerg Biomembrane* 28:319-326.

Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, und Söhl G. 2002. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and

## Literatur

human genome. *Biol Chem* 383:725-737.

Wilson C, Bellen HJ, Gehring WJ. 1990. Position effects on eukaryotic gene expression. *Annu Rev Cell Biol.* 6:679-714. Review.

Woo SS, Jiang J, Gill BS, Paterson AH, Wing RA. 1994. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res.* 22:4922-31.

Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* 378:789-92.

Xin D und Bloomfield SA. 1999. Comparison of the responses of AII amacrine cells in the dark- and light-adapted rabbit retina. *Vis Neurosci* 16:653-665.

Yang XW, Model P, Heintz N. 1997. Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat Biotechnol.* 15:859-65.

Yamasaki H, Krutovskikh V, Mesnil M, Tanaka T, Zaidan-Dagli ML, und Omori Y. 1999. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. *C R Acad Sci III* 322:151-159.

Yeager M und Nicholson BJ. 1996. Structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol* 6:183-192.

Zimmer R, Verrinder Gibbins AM. 1997. Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics.* 42:217-26.



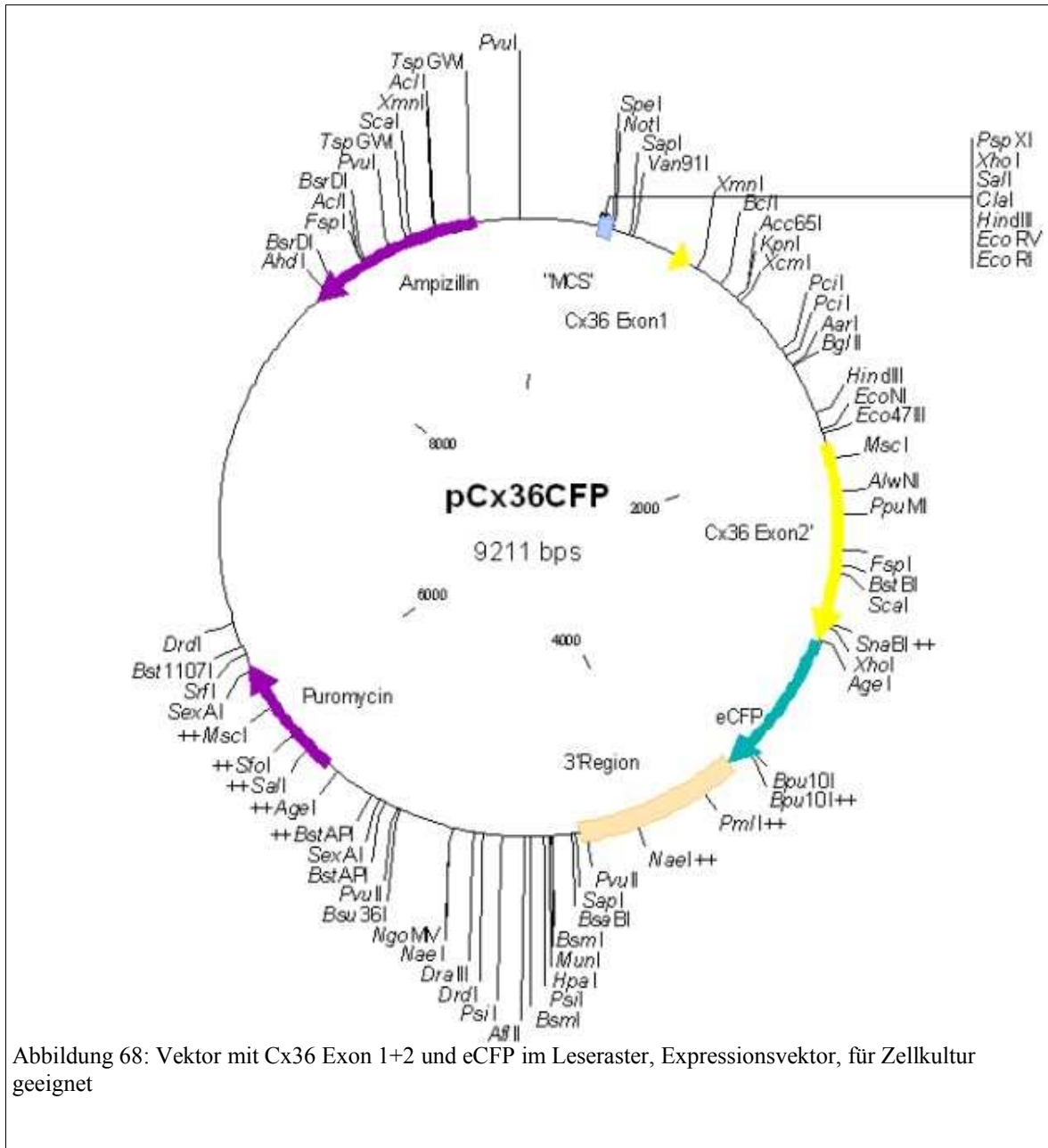


Abbildung 68: Vektor mit Cx36 Exon 1+2 und eCFP im Leseraster, Expressionsvektor, für Zellkultur geeignet





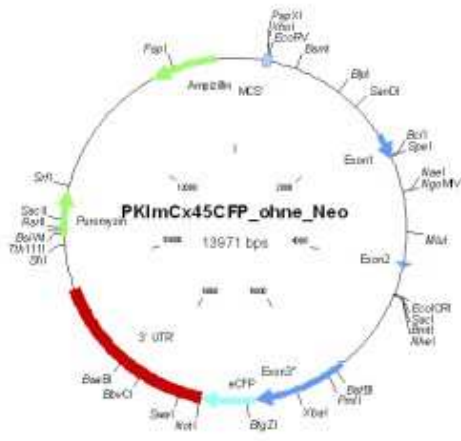


Abbildung 73: Vorstufe des fertigen KI Vektors mit CX45 und eCFP im Leseraster

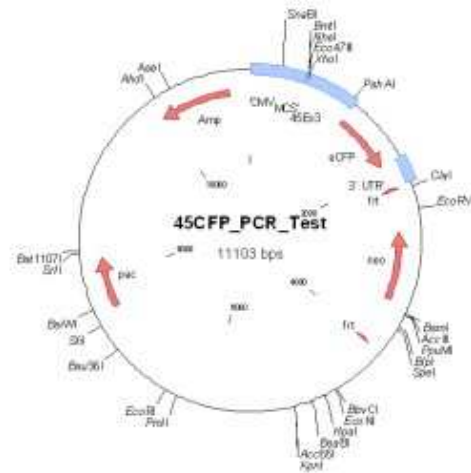


Abbildung 74: Testvektor für die PCR mit Cx45 und eCFP im Leseraster und einem verlängerten Bereich aus dem 3' Bereich des CX45

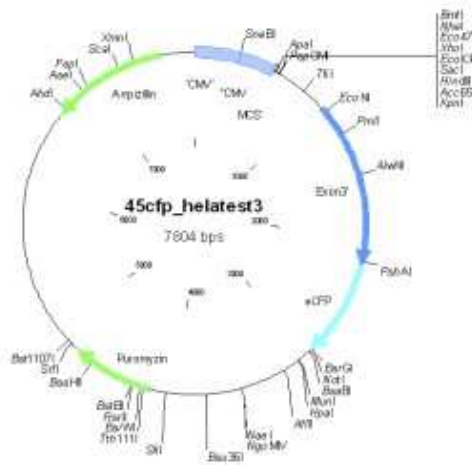


Abbildung 75: 3. Hela Test Vektor mit CX45 und eCFP und verkürztem 5' Bereich

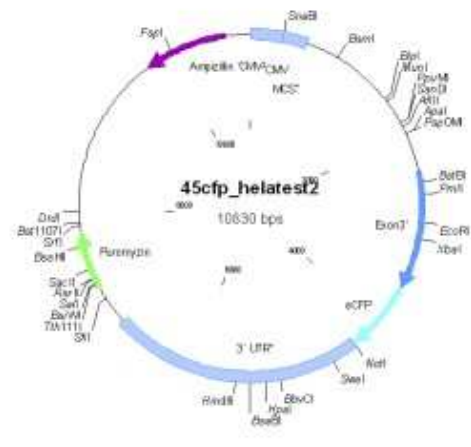


Abbildung 76: 2. Hela Test Vektor mit verkürztem Cx45 5' Bereich

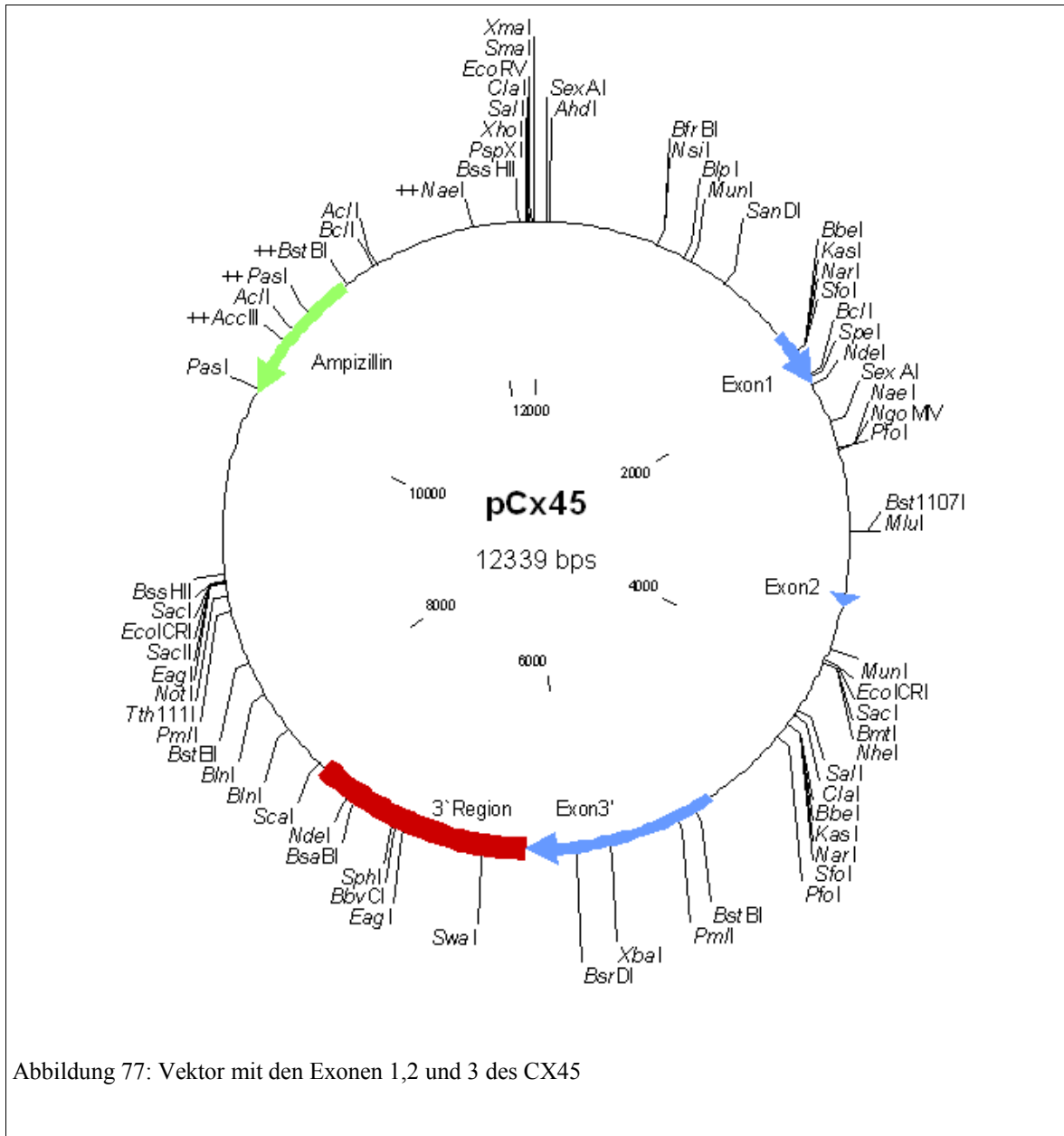


Abbildung 77: Vektor mit den Exonen 1,2 und 3 des CX45

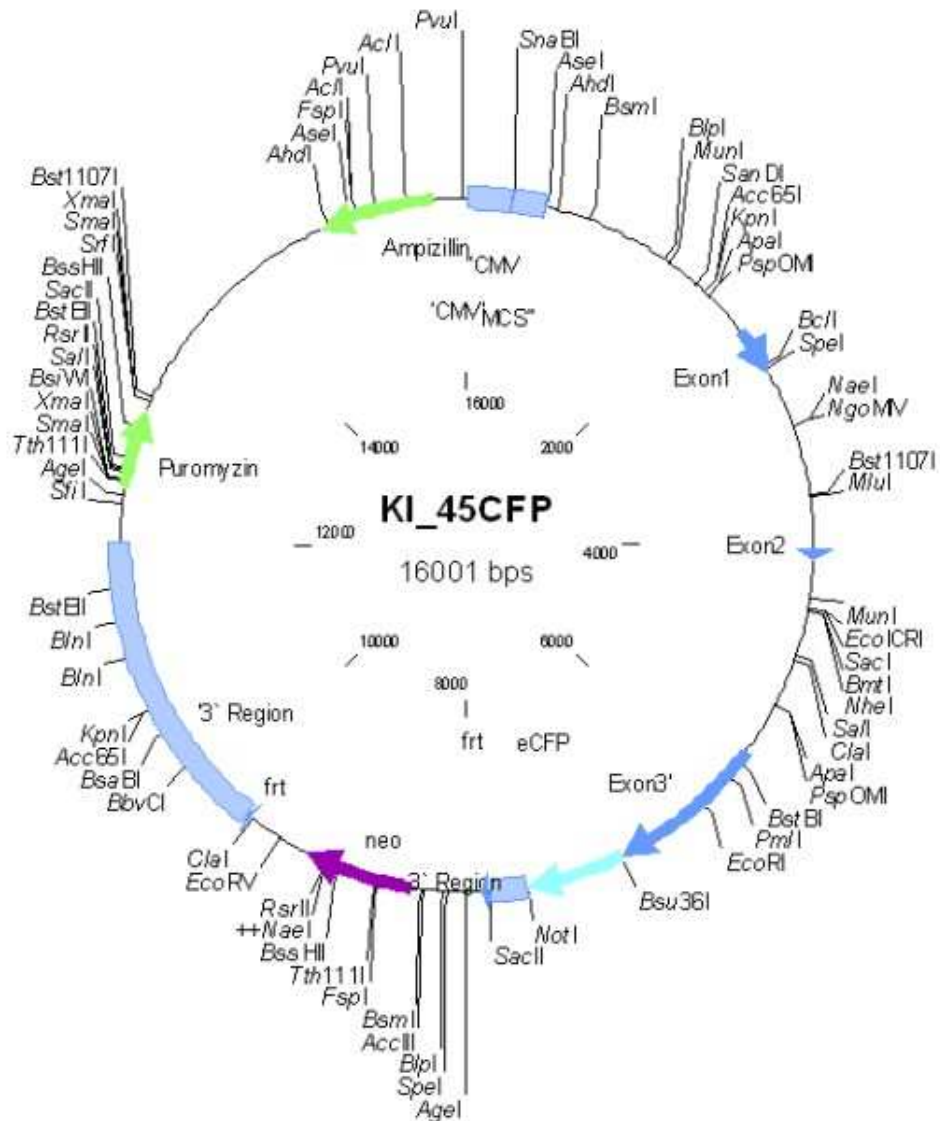


Abbildung 78: Insertions Vektor mit der Sequenz des Cx45 und eCFP im gleichen Leseraster



# 9 Lebenslauf