

**Untersuchungen zu  
Bindeproteinen,  
funktioneller Modifikation und  
subzellulärer Lokalisation  
von Connexinproteinen**

Dissertation

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

vorgelegt von

**Thorsten Höher**

**aus  
Koblenz**

**Bonn, 2008**

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Willecke
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Höfeld

Tag der Promotion: 11.12.2008

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Universität als Dissertation eingereicht worden ist.

Bonn, August 2008

---

Thorsten Höher

Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung.

Charles Darwin

## Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof Dr. Klaus Willecke für die Überlassung des Themas und der uneingeschränkten Unterstützung und unermüdligen Diskussionsbereitschaft

Weiterhin danke ich der Dissertationskommission, Herrn Prof. Dr. Jörg Höfeld für die freundliche Übernahme des Koreferats, Herrn Prof Dr Dieter Fürst für die Übernahmen des fachnahen und Frau PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert für die Übernahme des fachangrenzenden Gutachtens.

Prof. Dr. Rolf Dermietzel von der Ruhr-Universität Bochum danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und hilfreiche Kritik hinsichtlich unterschiedlicher Experimente bezüglich der Phosphorylierung des Connexin36 Proteins.

Juniorprofessor Dr. Raphael Stoll und Dr. Dirk Wolters von der Ruhr-Universität Bochum danke ich für die umfangreiche Unterstützung mit Rat und Tat in der Bearbeitung der Strukturanalyse des Connexin45 Carboxyterminus sowie der Durchführung der entsprechenden spektrometrischen Untersuchungen respektive für die gute Zusammenarbeit sowie der Einweisung in die MudPIT-Technologie und die entsprechenden Messungen, denen ein Teil der vorliegenden Arbeit zugrunde liegt.

Weiterhin danke ich Dr. Stephanie Urschel für die Einarbeitung in das herausfordernde Thema sowie der fruchtbaren Zusammenarbeit im "Retinaprojekt".

Dr. Stephan Maxeiner, Dr. Joachim Degen, Dr. Julia von Maltzahn und Stephan Sonntag danke ich für viele hilfreiche Diskussionen und Ratschläge in den unterschiedlichsten Fragestellungen.

Ausserdem gebührt Dr. Timm Schubert von der Universität Oldenburg Dank für die Messung der PKA-abhängigen Kopplung von AII-Amakrinzellen in der Retina sowie hilfreicher Kritik bei der Verfassung des entsprechenden Manuskriptes.

Dr. Julia von Maltzahn danke ich für die angenehme Zusammenarbeit, besonders hinsichtlich der Analyse der Cx45eGFP-BAC-Maus sowie des Korrekturlesens dieser Arbeit. Cantas Alev vom RIKEN-Institut in Kobe, Japan, danke ich für die Zusammenarbeit im MudPIT-Projekt, der ersten gemeinsamen Analysen der entsprechenden Rohdaten sowie des massenspektrometrischen Nachweises von phosphorylierten Aminosäureresten im Cx36 Protein.

Ein besonderer Dank gilt ausserdem den ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern im "Labor 826", besonders Dr. Tanja Auth, Dr. Markus Kretz, Dr. Sonja Hombach, Dr. Radoslav Dobrowolski, Stephan Sonntag, Oliver Tress, Petra Kußmann, Melanie Schütz, Robert Requardt, und nicht zuletzt Melanie Jokwitz sowie allen weiteren KollegInnen, deren hilfreiche Ratschläge in dieser Arbeit nicht wegzudenken gewesen wäre.

Meinem guten Freund Dr. Markus Kretz danke ich für den unerlässlichen Zuspruch und die stets aufbauenden Worte, auch über den "großen Teich" hinweg. Meinen Freunden Adam Gawlik, Stefanie Diez und Stefanie Bruckner und meinen Mitbewohnern Dayana Klöckner und Bastian Küllenberg danke ich für ihr Verständnis, das im Laufe meiner Dissertation aufzubringen sicher keine Selbstverständlichkeit gewesen ist.

Allergrößter Dank gebührt letztlich meinen Eltern, ohne deren moralische und materielle Unterstützung diese Arbeit undenkbar gewesen wäre.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
A. bidest,	zweifach destilliertes Wasser
bzw.	
ddH <sub>2</sub> O	
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin(-Resistenzgen)
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
A <sub>x</sub>	Absorption bei Licht der Wellenlänge x in nm
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaMKII	calmodulinabhängige Kinase II
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat-hydrat
Ci	Curie (3,7 x 10 <sup>10</sup> Zerfälle/sec)
CL bzw. cl	zytoplasmatische Schleife
cm	Zentimeter
Cx	Connexin
d.h.	das heißt
Da	Dalton
db-cAMP	dibutyryl-cAMP
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM	DMEM ohne Methionin
M <sup>-</sup>	
DMEM P <sup>-</sup>	DMEM ohne Phosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxytymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eCFP	verstärkt blau fluoreszierendes Protein
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein
eYFP	verstärkt gelb fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
et al.	et alia
EtBr	Ethidiumbromid

EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
Flag-tag	Flag-Markierung
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatographie
G	Guanin
g	Gramm
Glt	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
H-89	PKA-Inhibitor
His <sub>6</sub> -tag	6-fach-Histidinmarkierung
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
IB	Immunoblot
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
ind.	Induziert
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
KO	Knock-out
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	Milliampere
MALDI-ToF	matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight
MCS	Vielfachklonierungsstelle
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MudPIT	Multidimensionale Proteinidentifikationstechnologie
mRNS	Boten-RNS
MS	Massenspektroskopie
mündl.	Mündlich
N	Normalität
n.a.	nicht analysiert
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei Licht einer Wellenlänge von x nm
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pI	Isoelektrischer Punkt eines Proteins, d.h. wo die Nettoladung gleich 0 ist
PKA	Protein Kinase A, cAMP abhängige Kinase
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription
<i>S.</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
<i>japonicum</i>	
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SCH2339	D <sub>1</sub> -Dopaminrezeptorantagonist
0	
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembranregion
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vergl.	vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem



<b>Aminosäuren</b>	<b>Dreibuchstaben-Code</b>	<b>Einbuchstaben-Code</b>	<b>molekulare Masse in einem Peptid [Da]</b>
Alanin	Ala	A	71,0
Arginin	Arg	R	157,2
Asparagin	Asn	N	114,1
Asparaginsäure	Asp	D	114,0
Cystein	Cys	C	103,1
Glutaminsäure	Glu	E	128,1
Glutamin	Gln	Q	128,1
Glycin	Gly	G	57,0
Histidin	His	H	137,1
Isoleucin	Ile	I	113,1
Leucin	Leu	L	113,1
Lysin	Lys	K	129,1
Methionin	Met	M	131,1
Phenylalanin	Phe	F	147,1
Prolin	Pro	P	97,1
Serin	Ser	S	87,0
Threonin	Thr	T	101,1
Tryptophan	Trp	W	186,2
Tyrosin	Tyr	Y	163,1
Valin	Val	V	99,1

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Gap Junctions</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Topologie der Gap Junctions</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Aufbau der Gap Junctions</b>	<b>2</b>
<b>1.4 Eigenschaften der Gap Junctions</b>	<b>4</b>
<b>1.5 Regulation der Gap Junctions</b>	<b>5</b>
<b>1.6 Interaktionspartner der Connexinproteine</b>	<b>6</b>
<b>1.7 Expression und Funktion des Connexin36</b>	<b>7</b>
<b>1.8 Expression und Funktion des Connexin45</b>	<b>8</b>
<b>1.9 Aufbau der Retina und ihre elektrische Verschaltung</b>	<b>9</b>
<b>1.10 Biologie des GORASP2-Proteins</b>	<b>12</b>
<b>1.11 Multidimensionale Protein Identifikations Technologie (MudPIT)</b>	<b>14</b>
<b>1.12 Biomolekulare Nukleäre Magnet Resonanz (NMR)-Spektroskopie</b>	<b>15</b>
<b>1.13 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>2. Material</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Stammlösungen, Puffer und Medien sowie Allgemeine Lösungen</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2 Lösungen für Arbeiten mit DNS</b>	<b>20</b>
<b>2.1.3 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Lösungen für die Kultur embryonaler Stammzellen der Maus</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Medien und Lösungen für die Zell-Kultur</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Lösungen zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien</b>	<b>27</b>
<b>2.5 Lösungen für die Protein-Analytik</b>	<b>27</b>
<b>2.6 Lösungen und Chemikalien für den GST-Pulldown</b>	<b>29</b>
<b>2.7 Kommerzielle Reagenziensätze</b>	<b>31</b>
<b>2.8 Nukleinsäuren</b>	<b>31</b>
<b>2.8.1 Oligonukleotide als Startermoleküle für die Polymerase-Kettenreaktion</b>	<b>31</b>

<b>2.8.2 Startermoleküle für Auftragssequenzierungen</b>	<b>33</b>
<b>2.8.3 Klonierungsvektoren</b>	<b>34</b>
<b>2.8.4 Rekombinante Plasmide</b>	<b>34</b>
<b>2.9 Eukaryontische Zelllinien</b>	<b>36</b>
<b>2.10 Bakterienstämme</b>	<b>36</b>
<b>2.11 Größenstandards</b>	<b>37</b>
<b>2.12 Allgemeine Labormaterialien</b>	<b>37</b>
<b>2.13 Fertige Lösungen und Chemikalien</b>	<b>38</b>
<b>2.14 Geräte</b>	<b>38</b>
<b>2.15 Antikörper</b>	<b>40</b>
<b>2.15.1 Primärantikörper</b>	<b>40</b>
<b>2.15.2 Sekundärantikörper</b>	<b>40</b>
<b>3. Methoden</b>	<b>41</b>
<b>3.1 DNS-Präparation</b>	<b>41</b>
<b>3.1.1 Präparative Plasmidisolierung (Midipräparation)</b>	<b>41</b>
<b>3.1.2 Alkalische Plasmidisolierung (Minipräparation)</b>	<b>41</b>
<b>3.1.3 Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen</b>	<b>41</b>
<b>3.2 RNS-Präparation</b>	<b>42</b>
<b>3.2.1 Gewinnung von cDNS aus Embryonen (ED 9.5), sowie adultem Herzgewebe</b>	<b>42</b>
<b>3.2.2 Gewinnung von cDNS aus Kulturzellen</b>	<b>42</b>
<b>3.3. Gelelektrophorese zur Größenfraktionierung von Nukleinsäuren</b>	<b>43</b>
<b>3.3.1 Native Agarose-Gelelektrophorese</b>	<b>43</b>
<b>3.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung</b>	<b>44</b>
<b>3.4 Enzymatische Modifikation von DNS</b>	<b>44</b>

3.4.1 DNS-Spaltung durch Restriktionsendonuklease	44
3.4.2 Vollständige Spaltung von DNS	44
3.4.3 Dephosphorylierung von Vektorenden	45
3.4.4 Ligation von DNS-Fragmenten	45
3.5 Bakterienkulturen und Transformation	45
3.5.1 Herstellung kompetenter, einfrierbarer Bakterien	45
3.5.2 Transformation kompetenter Bakterien mit DNS	46
3.5.3 Anlegen von Glycerinkulturen	46
3.4.5 Induktion einer Bakterienkultur mittels IPTG	46
3.5.5 Herstellung eines Proteinlysates aus einer Bakterienkultur	47
3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
3.6.1 „Overlap Extension“ PCR	48
3.6.2 PCR-Reaktionen	49
3.7 Sequenzierung	54
3.8 Reverse Transkription	54
3.9 Zellkulturtechniken	54
3.9.1 Kultivierung von HM-1-Zellen	55
3.9.2 Beschichtung von Kulturgefäßen mit Gelatine	55
3.9.3 Passagieren von HM-1-Zellen	55
3.9.4 Kultivierung von HeLa, N2A sowie RT4AC-Zellen	55
3.9.5 Passagieren von HeLa, N2A sowie RT4AC-Zellen	55
3.9.6 Lipofection von Zelllinien in Kultur mit Nukleinsäuren	56
3.9.7 Stabile Transfektion von HeLa Zellen mit dem Plasmid pGoraspeYFP_blasto	56
3.9.8 Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen	56
3.10 Proteinanalytik	57
3.113.10.1 Photometrische Bestimmung von Protein	57
3.10.2 Metabolische Markierung von kultivierter Retina	57
3.10.3 Herstellung eines Proteinlysats aus Retina und Herzgewebe	58
3.10.4 Herstellung eines Proteinlysates aus Säugerzellen in Kultur	58

<b>3.10.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)</b>	<b>58</b>
<b>3.10.6 Durchführung der SDS-PAGE</b>	<b>59</b>
<b>3.10.7 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit CoomassieBrilliantBlue</b>	<b>60</b>
<b>3.10.8 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Kaliumchlorid</b>	<b>60</b>
<b>3.10.9 Vorbereitung einer zu untersuchenden Proteinbande für das MS/MS</b>	<b>61</b>
<b>3.11 Vorbereitung einer zu untersuchenden Proteinprobe für das MS/MS (MudPIT)</b>	<b>61</b>
<b>3.12 Durchführung einer Gelfiltration mittels Äkta-FPLC</b>	<b>61</b>
<b>3.13 Immunoblot</b>	<b>62</b>
<b>3.14 Elektroblot und Nachweis der sekundären Antikörper mittels Chemilumineszenz (ECL-Reaktion)</b>	<b>62</b>
<b>3.15 GST-Pulldown-Test zur Vermessung mit MudPIT</b>	<b>63</b>
<b>3.15.1 Äquilibrieren der Glutathion-Agarose-Matrix</b>	<b>64</b>
<b>3.15.2 Blockierung der Agarosematrix</b>	<b>64</b>
<b>3.15.3 Immobilisieren von GST- Fusionsprotein</b>	<b>64</b>
<b>3.16 Konzentrierung von Proteinfractionen</b>	<b>64</b>
<b>3.17 <i>In vitro</i> Phosphorylierungen von immobilisiertem Fusionsprotein bzw. präzipitiertem nativen Protein</b>	<b>65</b>
<b>3.18 Immunpräzipitation von Cx36 aus Retinalysaten</b>	<b>65</b>
<b>3.19 Immunpräzipitation von Cx45 Protein aus Zelllysaten</b>	<b>66</b>
<b>3.20 Induktion von Fusionsproteinen</b>	<b>67</b>
<b>3.21 Präparation von GST-Fusionsproteinen</b>	<b>67</b>
<b>3.22 Aufreinigung von GST Fusionsproteinen über GSTrap-Säulen</b>	<b>68</b>
<b>3.23 <i>In vitro</i>-Translation</b>	<b>68</b>
<b>3.24 GST-Pulldown-Test</b>	<b>69</b>
<b>3.25 GST-Pulldown und Vorbereitung zur MudPIT-Analyse</b>	<b>69</b>
<b>3.26 Elektroelution von rekombinantem Protein aus einem Polyacrylamid-Gel</b>	<b>70</b>
<b>3.27 Proteolytische Spaltung mittels sequenzspezifischer Protease</b>	<b>71</b>
<b>3.28 Sequenzielle Reinigung proteolytischen Produkts über Reaktionsgefäße</b>	<b>71</b>
<b>3.29 Einengung bzw. Umpufferung eines Proteingemisches durch Ultrafiltration</b>	<b>72</b>
<b>3.30 Datenbankanalysen</b>	<b>73</b>
<b>3.31 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse</b>	<b>73</b>
<b>3.31.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Darm-Gefrierschnitten mit Antikörpern gegen SM</b>	

(smooth muscle)-Aktin	73
3.31.2 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten mit Cx36-Antikörpern	74
3.31.3 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse an HeLa Zellen	74
4. Ergebnisse	75
4.1 Phosphorylierungsstudien an Connexin36 und Connexin45	75
4.1.1 PKA-abhängige Phosphorylierung des Connexin36 Proteins bei der Anpassung des Säugerretina an äussere Lichteinflüsse im Zuge der Hell/Dunkel-Adaptation	75
4.1.2 Cx36 ist in der Retina phosphoryliert	76
4.1.3 Die Phosphorylierung des Cx36 wird durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels verstärkt	77
4.1.4 Phosphorylierungsnachweis durch Visualisierung der direkten Phosphorylierung des Cx36 Proteins durch PKA sowie massenspektrometrische Untersuchungen von tryptischen Fragementen von Cx36-GST-Fusionsproteinen	78
4.1.5 Klonierung der punktmutierten GST-Fusionsproteine der zytoplasmatischen Domänen von Cx36	79
4.1.6 <i>in vitro</i> Phosphorylierung der Punktmutanten durch die Protein Kinase A (PKA)	80
4.1.7 PKA-abhängige Farbstoff-Kopplung in Retinaexplantaten	81
4.1.8 Nachweis der <i>in vitro</i> Phosphorylierung des Cx36 Proteins mittels CaMKII	83
4.1.9 Die zytoplasmatischen Domänen von Cx45 sind ebenfalls Substrat für PKA und PKC <i>in vitro</i>	85
4.2 Bindestudien an Connexin45	86
4.2.1 Analyse von Bindeproteinen der zytoplasmatischen Domänen von Cx45 mittels MudPIT (Multidimensionale Protein Identifications Technologie)	86
4.2.2 Klonierung der cytoplasmatischen Domänen des Cx45 in den Expressionsvektor pGEX-6P-1	86
4.2.3 Etablierung der Expression und Reinigung der Fusionsproteine	87
4.2.4 Durchführung des GST-Pulldowns und die Probenvorbereitung für MudPIT	89
4.2.5 Eine Auswahl von Proteinen, die an die cytoplasmatischen Domänen von Connexin45 binden	91
4.2.6 Klonierung und <i>in vitro</i> Translation der cDNS ausgewählter Bindekandidaten	91
4.2.6.1 Klonierung der cDNS von Lin7b	91
4.2.6.2 Klonierung der cDNS von My-L4	92
4.2.6.3 Klonierung der cDNS von Creatine Kinase M	92

4.2.6.4 Klonierung der cDNS von Gorasp2	92
4.2.7 <i>in vitro</i> Translation der klonierten Interaktionskandidaten	93
4.2.8 Erste Studien zur Bindung der Kandidatenproteine an den C-Terminus des Cx45	93
4.2.9 Analyse der Bindung von Gorasp2 an den C-Terminus von Cx45	94
4.2.9.1 Gorasp2 bindet <i>in vitro</i> an des Carboxyterminus des Cx45	94
4.2.9.2 Klonierung der Gorasp2-cDNS als Fusionsprotein mit dem verstärkt gelb fluoreszierenden Protein YFP	95
4.2.9.3 Klonierung der Gorasp2-cDNS als Protein mit N-terminaler und C-terminaler FLAG-Markierung	96
4.2.9.4 Transiente Transfektion des Plasmids pGorasp2eYFP_zeo in HeLa Zellen	97
4.2.9.5 Kolokalisation von Cx45eCFP und Gorasp2eYFP in HeLaCx45eCFP-Zellen	98
4.2.9.6 Kolokalisation von Cx45eCFP und Gorasp2eYFP in N2A-Zellen	98
4.2.9.7 Biochemische Charakterisierung der Interaktion des Gorasp2 mit Cx45 in HeLa-Zellen	99
4.2.9.8 Pulldown aus Gorasp2eYFP transfizierten Lysaten	100
4.2.9.9 Co-Immunopräzipitation von Cx45 und Gorasp2-YFP aus HeLa-Lysaten	101
4.2.9.10 Kolokalisation von Cx45eCFP und Gorasp2eYFP 60 h nach Transfektion	102
4.2.9.11 Stabile Transfektion von HeLa Zellen mit dem Vektor pGorasp2YFP_blasto	103
4.2.9.12 Kolokalisation und Sequestrierung von Cx45eCFP und Gorasp2eYFP in RT4-AC-Zellen	105
4.3 Versuche zur Strukturaufklärung des Carboxyterminus von Cx45 mittels NMR	107
4.3.1 Klonierung, Expression und Gewinnung des GST-Cx45CT Fusionproteins	108
4.3.2 Spaltung des Fusionsproteins mittels sequenzspezifischer Protease	108
4.3.3 Versuche zur Abtrennung des GST-Proteins mittels Glutathion-Affinitäts- Säule	108
4.3.4 Versuche zur Reinigung mittels Gelfiltration	109
4.3.5 Etablierung der Reinigung mittels geblockter Affinitätsmatrix	110
4.3.6 1D-Protonenspektrum: Struktur-Analyse mittels NMR	112
4.3.7 Metabolische Bakterienmarkierung mittels Stickstoff-15	112
4.2.8 Expression des GST-Cx45CT in <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLys	113
4.3.9 Zweidimensionales Resonanzspektrum des Cx45CT-Peptids (2D-NMR)	114
4.4 Teilanalyse einer transgenen Maus (BAC-Cx45eGFP)	116
4.4.1 Lokalisation von Cx45eGFP in adultem Darm der Maus	116
4.4.2 Lokalisation von Cx45eGFP in der adulten Retina	117
4.4.3 Kolokalisation von Cx45eGFP und Cx36 in der adulten Retina	118

4.4.4 Fluoreszenznachweis des Cx45eGFP Proteins in juveniler Retina (P0)	119
<b>5. Diskussion</b>	<b>121</b>
5.1 Protein Kinase A-vermittelte Änderung der homotypischen Cx36-Kopplung in All Amakrinzellen der Mausretina	121
5.2 Kartierung der Phosphorylierungsstellen des Cx36 Proteins für PKA	122
5.3 PKA-abhängige Kopplung in homotypischen gekoppelten All-Amakrin-Zellen	122
5.4 <i>in vitro</i> Phosphorylierung des Connexin45	124
5.5 Phosphorylierung des Cx36 Proteins durch die Calmodulin-abhängigen Kinase (CaMKII)	125
5.6 Interaktionsproteine des Connexin45	127
5.6.1 Interaktionskandidaten des Carboxyterminus des Cx45 Proteins in Herzlysat	129
5.6.2 Interaktionskandidaten der zytoplasmatischen Schleife des Cx45 Proteins in Herzlysat	133
5.6.3 Proteine aus HM-1-Zellysat, die and den C-Terminus des Cx45 binden	134
5.7 Interaktion des Gorasp2-Proteins mit dem Carboxyterminus des Cx45 Proteins	134
5.7.1 Biochemische Interaktion des Gorasp2-Proteins und des C45CT	134
5.7.2 Analyse von terminal FLAG-markierten Gorasp2 Protein in transient transizierte Cx45 HeLa Zellen.	135
5.7.3 GST-Pulldown-Analyse von aus transient Gorasp2-eYFP exprimierenden HeLa- Zellen	136
5.7.4 Immunpräzipitation von Cx45eCFP sowie Co-Immunpräzipitation von Gorasp2eYFP	136
5.7.5 Kofluoreszenz von Gorasp2eYFP und Cx45eCFP in HeLaCx45eCFP Zellen	137
5.7.6 Lokalisation des Gorasp2YFP-Proteins in HeLa-Zellen während des Zellzyklus	137
5.7.7 <i>in situ</i> Hybridisierungen von Gorasp2 in saggitalen Hirnschnitten der adulten Maus (Allen Brain Atlas)	139
5.7.8 Kolokalisation von Cx4eCFP und Gorasp2eYFP in transient doppelt transfizierten RT4-AC Zellen	140
5.8 Untersuchungen zur Struktur des Carboxyterminus mit nukleärer Magnetresonanz-Spektroskopie (NMR)	140
5.9 Untersuchung der Cx45eGFP Expression in der adulten Retina sowie der glatten Muskulatur des Darms der Cx45eGFP-BAC-Maus	144
5.10 Ausblick	146
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>149</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>150</b>
<b>Anhang A (Erzeugte Plasmide)</b>	
<b>Anhang B (Lebenslauf)</b>	



## **1. Einleitung**

### **1.1 Gap Junctions**

Auch auf kleinster Ebene ist Kommunikation ein wichtiger Bestandteil des Lebens, da sowohl innerhalb der Zelle als auch zwischen Zellen eine hochorganisierte Informationsübermittlung effizient und konzertiert stattfindet. Dies ist eine Voraussetzung, dass sich Leben entwickeln kann und so komplexe Strukturen wie Organe während der Embryogenese gebildet werden können. Die direkte interzelluläre Kommunikation zwischen benachbarten Zellen wird von Gap Junction-Kanälen vermittelt. Diese „Spalt“- (engl. *gap*) „Verbindungen“ (engl. *Junctions*) wurden zunächst elektronenmikroskopisch als eine Verengung des interzellulären Spaltes von gewöhnlich 20-30 nm auf etwa 2-5 nm beschrieben (Revel and Karnovsky, 1967), so dass eine direkte Verbindung zwischen den Zytoplasmata benachbarter Zellen hergestellt werden kann.

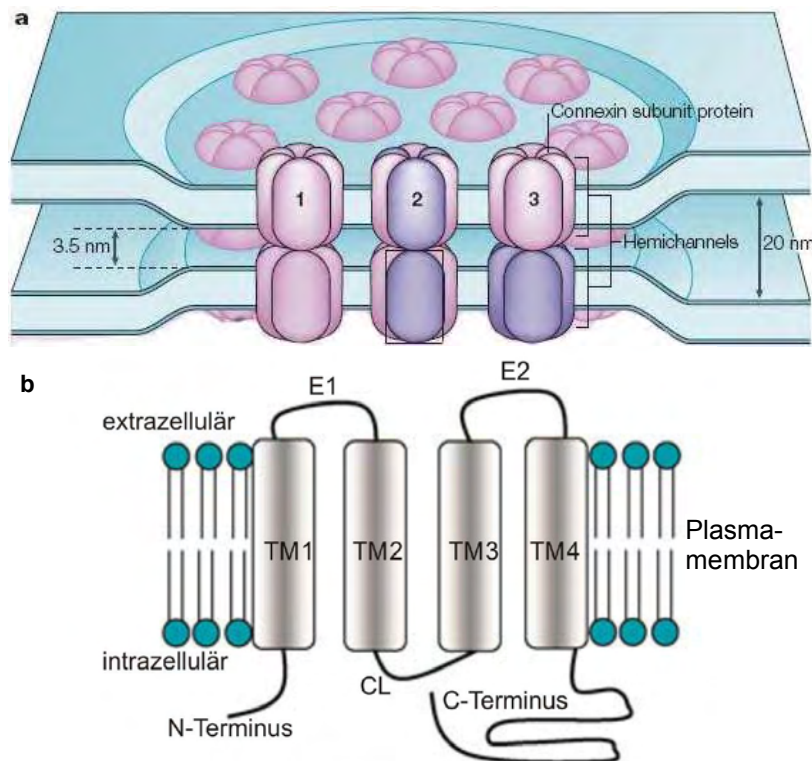
Stoffwechselfvorgänge laufen dabei zum Großteil im Zytoplasma der einzelnen Zellen ab. Um die komplexen Lebensvorgänge zu gewährleisten, die einen Organismus charakterisieren, stehen sie allerdings untereinander in Verbindung, was eine konzertierte Zusammenarbeit der Zellverbände ermöglicht.

### **1.2 Topologie der Gap Junctions**

Man unterscheidet drei Klassen von Zellverbindungen mit unterschiedlicher Funktion: undurchlässige Verbindungen (Tight Junctions), Haftverbindungen (Adherens Junctions) und kommunizierende Verbindungen (Gap Junctions). Außer in Erythrozyten, Thrombozyten, Spermien und im differenzierten Skelettmuskel sind Gap Junctions in allen Säugergeweben vorhanden (Gilula et al., 1987).

Sowohl bei Vertebraten wie auch bei Invertebraten wurden Genfamilien dieser Zellverbindungen nachgewiesen, die wahrscheinlich durch konvergente Evolution entstanden sind. Die Mitglieder der Familien ähneln sich sowohl in ihrer Struktur wie auch in ihrer Funktion. Bei den Invertebraten werden die Gap Junctions von Innexinproteinen gebildet (Bauer et al., 2005; Phelan, 2005), bei den Vertebraten durch Connexinproteine (Söhl & Willecke 2004). Eine weitere Klasse von Gap Junction-bildenden Proteinen bei Vertebraten stellen die Pannexine dar (Bruzzone et al., 2003). Sie sind homolog zu den Innexinen und kommen damit sowohl in Vertebraten wie in Invertebraten vor (griech. *pan*: alles, umfassend).

Gap Junctions sind Kanalstrukturen in der Zellmembran, die einen hydrophilen Kanal bilden. Ansammlungen von einigen bis mehreren tausend Gap Junction Kanälen werden als sogenannte Gap Junction Plaques bezeichnet (siehe Abb.1.1.A).



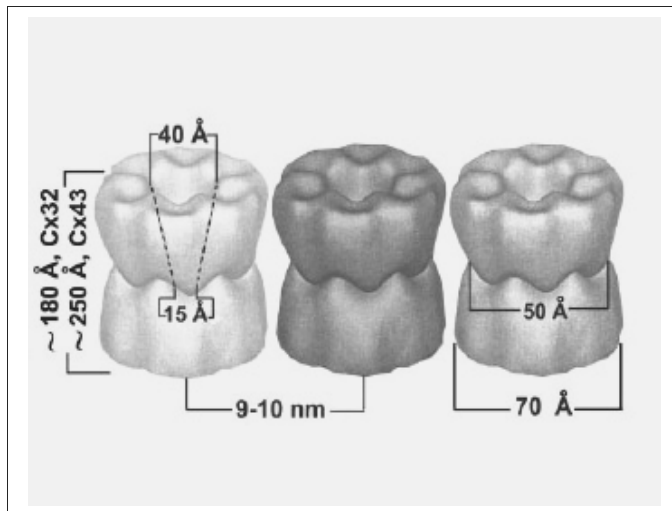
**Abb.1.1: Schematische Darstellung eines Gap Junction Plaques sowie der Topologie eines Connexin-Proteins.**

Dargestellt ist in A der schematische Aufbau eines Gap Junction Plaques sowie mögliche Beteiligungen einzelner unterscheidlicher Connexin-Proteine an einem Vollkanal. So wird der mit (1) markierte Kanal als homotypisch, der mit (2) bezifferte als heteromer homotypisch und der mit (3) bezifferte Kanal als homomer heterotypisch bezeichnet, in B ist die Lage eines Connexin-Proteins in der Zellmembran dargestellt. Das Polypeptid durchdringt mit vier  $\alpha$ -Helices (TM1-TM4) die Zellmembran, die auf extrazellulärer Seite von den beiden extrazellulären Schleifen verbunden werden. Die zytoplasmatische Schleife (CL), der Amino-Terminus (N-Terminus) wie auch der Carboxyterminus (C-Terminus) sind ebenfalls dargestellt, a) modifiziert nach Söhl et al., 2005, b) modifiziert nach Wagner, 2008)

### 1.3 Aufbau der Gap Junctions

Ein Gap Junction Kanal besteht aus zwei Halbkanälen, den sog. Connexonen (Goodenough, 1976). Zwei Halbkanäle, die zu benachbarten Zellen gehören, können zusammen einen vollständigen Gap Junction-Kanal bilden. Ein Connexon wiederum setzt sich aus sechs Connexinen zusammen, die radial zusammengelagert eine hydrophile Kanalpore ausbilden, welche die Zytoplasmata der beiden

beteiligten Zellen verbindet. Der Durchmesser dieser Kanalpore misst 2 nm (Kumar und Gilula, 1996) und kann reversibel geschlossen werden (Simpson et al, 1977), der Außendurchmesser eines Connexons im Extrazellularraum und auf der zytosolischen Seite hingegen beträgt 7-8 nm (Saez et al., 2003), (siehe Abb.1.2).



**Abb.1.2: 3D-Darstellung der Gap Junction-Kanäle**

Darstellung der Dimensionen der aus je zwei Connexonen zusammengesetzten Gap Junction Kanäle und ihrer Orientierung zueinander (modifiziert nach Saez et al., 2003)

Die beiden Halbkanäle sind über nicht-kovalente Wechselwirkungen (Ghoshroy et al., 1995) miteinander verbunden. Dabei werden die extrazellulären Schleifen miteinander verzahnt (White et al., 1994), so dass jeweils ein Connexin eines Connexons mit zwei Connexinen des anderen Connexons interagiert (Yeager und Nicholson, 1996). Diese Bindung bewirkt eine Abdichtung der Kanalpore gegen den extrazellulären Raum.

Es sind derzeit 20 verschiedene Connexine in der Maus und 21 im Menschen beschrieben (Söhl & Willecke, 2003), die daraus gebildeten Connexone können aus unterschiedlichen Connexinen bestehen. Ist am Aufbau eines Connexons lediglich ein Connexin beteiligt, spricht man von einem homomeren Connexon, besteht es aus verschiedenen Connexinen, bezeichnet man es als heteromeres Connexon (Kumar und Gilula, 1996, vgl., Abb 1.1 A). Die Diversität möglicher Gap Junction Kanäle wird noch dadurch erhöht, dass eine Kopplung zwischen unterschiedlichen Connexonen möglich ist. So bezeichnet man einen Vollkanal als heterotypisch, wenn er aus unterschiedlichen Connexonen, und als homotypisch, wenn er aus gleichartigen Connexonen besteht (Elfgang et al., 1995, vergl. Abb 1.1 A). Diese kombinatorische Vielfalt der Zusammensetzung der Gap Junction Kanäle ermöglicht eine komplexe Regulation der interzellulären Kommunikation (Laird, 2006).

N- und C-Termini der Connexine befinden sich im Zytoplasma der Zelle (Abb. 1.1 B). Innerhalb der beiden extrazellulären Schleifen befinden sich drei konservierte Cysteinreste (E1: CX<sub>6</sub>CX<sub>3</sub>C; E2:

CX<sub>4</sub>CX<sub>5</sub>C, wobei die das „X<sub>y</sub>“ hier für eine beliebige Aminosäure X in der Anzahl Y steht). Durch intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den beiden Schleifen eines Connexins wird bei der Kopplung der Connexone aneinander eine stabilisierende Wirkung erreicht (Rahman und Evans, 1991; Foote et al., 1998). Die unterschiedlichen Permeabilitätseigenschaften der Gap Junctions beruhen vermutlich auf Mechanismen wie z.B. van der Waals-Kräften (Skerrett et al., 2002). Die zytoplasmatische Schleife und der C-Terminus der Connexine weisen im Vergleich zu den anderen Proteindomänen die größte Sequenzdiversität auf (Willecke et al., 2002) und sind charakteristisch für die einzelnen Connexine.

#### **1.4 Eigenschaften der Gap Junctions**

Gap Junctions leisten einen wichtigen Beitrag zur Homöostase innerhalb eines Gewebeverbands (Thalman et al., 2003). Die Zellen eines Zellverbandes sind metabolisch und elektrisch gekoppelt. Die metabolische Kopplung wird durch Ionen, Zucker, Aminosäuren und Metabolite vermittelt. (Rieske et al., 1975, Harris, 2007). In schwach durchbluteten Geweben wie der Linse oder im Knorpel dienen sie dem Nährstoffaustausch zwischen den nährstoffversorgten peripheren Zellen und dem unterversorgten Zentrum (DeRosa et al., 2007).

Die Durchlässigkeit der Gap Junctions für Signalmoleküle ermöglicht die synchrone und koordinierte Antwort eines Zellverbandes auf die extrazelluläre Stimulation einer Zelle. Die durch Austausch von Botenstoffen und Stoffwechselprodukten kommunizierenden Zellen sind auf diese Weise zu einem funktionellen Synzytium verbunden. Eine wichtige Rolle spielen Gap Junction-Kanäle in diesem Zusammenhang bei der Weiterleitung von Zweitbotenstoffen wie zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP), Kalzium-Ionen (Ca<sup>2+</sup>), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) oder Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) (Bedner et al., 2006; Goldberg et al., 2004).

Dadurch wird es einem gekoppelten Zellverband ermöglicht, auf extrazelluläre Signale koordiniert zu reagieren, wie es z.B. in der frühen Embryogenese erforderlich ist (Kandler, 1997; Reuss et al., 1997; Kidder und Winterhager, 2001).

Möglicherweise einen Sonderfall stellt die Permeabilität von aus Cx43 bestehenden Halbkanälen für ATP dar, die vor kurzem gezeigt werden konnte (Kang et al., 2008)

In Säugerzellen ist durch Gap Junction Kanäle eine passive Diffusion von Ionen und Molekülen, in einem Spezialfall sogar von Peptiden, bis zu 1800 Dalton möglich (Neijssen et al., 2005).

Die elektrische Kopplung über Gap Junctions ist durch ihre Permeabilität für Ionen bedingt. Dadurch können Gap Junction Kanäle Aktionspotentiale erregbarer Gewebe übertragen und eine Synchronisation dieser Gewebe ermöglichen. Bei Neuronen führt dies zu einer schnellen Reizweiterleitung durch elektrische Synapsen (Bruzzone und Ressot, 1997), im Falle des Myokards zur Koordination des Zellverbandes (Gros und Jongma, 1996), welche bei der synchronen Kontraktion des Herzens benötigt wird (Kreuzberg et al., 2006).

### 1.5 Regulation der Gap Junctions

Die Regulation von Gap Junctions kann über die Verfügbarkeit der Kanäle und über den Öffnungszustand erfolgen.

Der langsamere der beiden Regulationsmechanismen beruht auf der Veränderung der Anzahl der Gap Junction Kanäle. Die Verfügbarkeit der Connexine wird hierbei über die Transkription, die Stabilität des Transkripts, die Verteilung des Proteins in der Zelle und die Lebensdauer des Proteins gesteuert. Die Halbwertszeit von Connexin-Proteinen variiert zwischen 2-5 h (Laird et al., 1996). Der Abbau der Connexine erfolgt lysosomal (Vaughan et al., 1992; Qin et al., 2003), ein Ubiquitin-vermittelter Abbau wird diskutiert (Laing und Beyer, 1995). Posttranslationale Phosphorylierung eines im Carboxy-Terminus von Cx43 enthaltenen Tyrosin-Sortierungssignals führt zu einem vermehrten lysosomalen Abbau des Proteins (Thomas et al., 2003). Die Degradation von Cx45 wird hingegen über die Phosphorylierung von carboxyterminal liegenden Serin-Resten reguliert (Hertlein et al., 1998). Möglicherweise ist das TSG101-Protein hier beteiligt (Auth et al., Manuskript in Vorbereitung). Auf diese Weise können die Halbwertszeit der Connexine und ihre Zusammensetzung zu funktionsfähigen Kanälen reguliert werden (Lampe und Lau, 2000). Weiterhin gibt es den Befund, dass über Autophagie ganze Gap Junction Plaques internalisiert und abgebaut werden können (Haftck et al., 1999).

Der schneller regulierte Öffnungszustand der Kanäle wird durch verschiedene Faktoren kontrolliert. Ein Anstieg der Kalziumkonzentration, wie er bei Verletzung einer Zelle auftritt, führt zum Schließen der Kanäle (Rose und Loewenstein, 1975). Des Weiteren beeinflussen der pH-Wert im zytoplasmatischen und interzellulären Raum (Morley et al., 1997) sowie die Spannung über der Membran (Brink, 2000) den Öffnungszustand der Gap Junction Kanäle.

Die Phosphorylierung von Connexinen im Zuge von Signalkaskaden kann den Öffnungszustand von Kanälen (Yeager und Nicholson, 1996), die Zusammensetzung von Connexinen zu

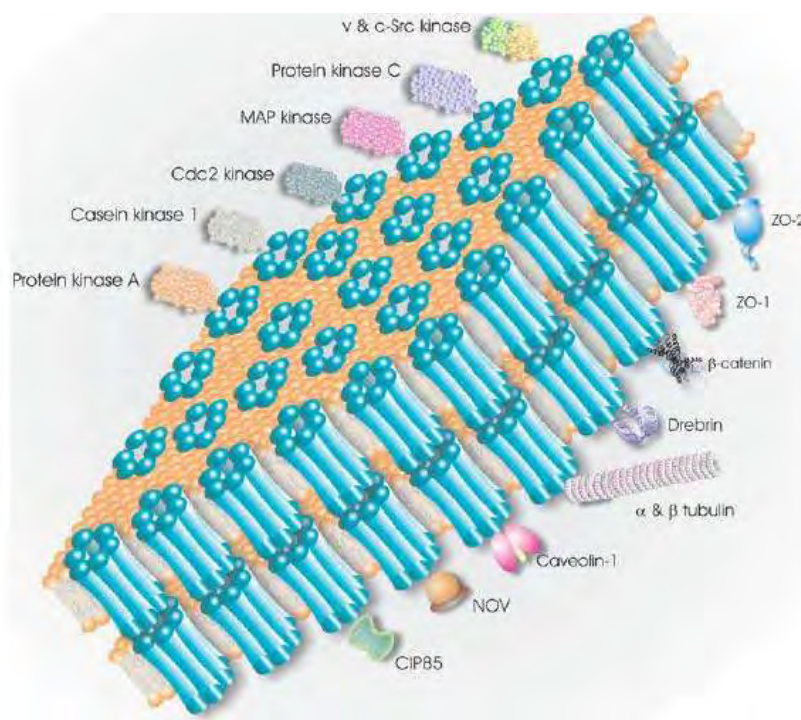
funktionstüchtigen Kanälen und die Halbwertszeit der Connexine positiv und negativ beeinflussen (Lampe und Lau, 2000, Laird, 2006). Am Beispiel von Cx43 wurde gezeigt, dass Phosphorylierungen des C-Terminus durch Proteinkinase C einen Verschluss der Gap Junctions zur Folge haben können (Wagner et al., 2002; Leithe et al. 2003). Die Phosphorylierung von Cx43 durch Casein Kinase I scheint die Zusammensetzung von Cx43 Connexonen zu funktionellen Gap Junction Kanälen zu fördern (Cooper und Lampe, 2002).

### 1.6 Interaktionspartner der Connexinproteine

Ein weiterer Aspekt der Biologie der Gap Junctions sind deren Bindeproteine. So wurden für Cx43 als bestuntersuchtem Connexin Proteinkinasen wie c-src (Kanemitsu et al., 1997), aber auch Zytoskelettbestandteile wie ZO-1 und Tubulin (Giepman et al., 1998), gefunden. Weitere Interaktionspartner von Cx43 sind Lin7b (Singh, Cambridge-Konferenz 2003), NOV (Gellhaus et al., 2004), Drebrin (Butkevich et al. 2004) und Nedd4 (Leithe & Rivedal., 2007)

Die anderen Connexine sind weit weniger gut untersucht: So interagiert Cx26 mit YAF2 (Rodina, Cambridge-Konferenz 2003) und Cx32 mit Occludin (Kojima et al., 1999).

Einige Connexine, unter anderem Cx43, interagieren mit Calveolin-1, einem Strukturprotein, welches in spezialisierten Lipidbereichen vorkommt (Schubert et al., 2002).



**Abb.1.3 Übersicht der Bindeproteine am Beispiel von Cx43**

Schematisch dargestellt ist eine Lipiddoppelschicht mit membrandurchspannenden Gap Junction Kanälen, die einen sog. Gap Junction Plaque darstellen. Weiterhin dargestellt sind die bereits als Bindeproteine beschriebenen Interaktionspartner des Cx43 Proteins. Entnommen aus Laird, 2006

Als Interaktionspartner von Cx45 wurden bislang ZO-1 (Laing et al., 2001), TSG101 (Auth et al., Manuskript in Vorbereitung) und Consortin (Fernando del Castillo, Gap Junction Conference 2005, Whistler) beschrieben.

Aufgrund der bereits bekannten Interaktionspartner der Connexine kann man vermuten, dass die Bildung und Stabilisierung von Gap Junction Plaques durch Interaktion mit Zytoskelett- und Membranproteinen vonstatten gehen. ZO-1 ist einer dieser bereits bekannten Interaktionspartner (Giepmans, 2006), eine Assoziation mit E-Cadherin wird ebenfalls diskutiert (Fujimoto et al., 1997).

Die Interaktion von Connexinen mit ZO-1 konnte bereits für Cx43 (Giepmans et al., 1998), Cx36 (Li et al., 2004) und Cx45 nachgewiesen werden (Laing et al., 2001). ZO-1 ist ein den Tight Junctions zugeordnetes, peripher an der Zellmembran assoziiertes 225 kDa-Protein (Stevenson et al., 1986; Fanning et al., 1998), das unter anderem mit Occludin, Spectrin und Actin interagiert (Furuse et al., 1994; Saez et al., 2003).

Dem C-Terminus der Connexine werden verschiedene Funktionen bei der Zusammensetzung und Regulation des Öffnungszustands von Gap Junctions (King & Lampe, 2005, Urschel et al., 2006) sowie bei der Interaktion mit spezifischen, zellulären Proteinen wie (Giepmans et al., 1998), Tubulin (Giepmans et al., 2001), c-src (Toyofuku et al., 2001), Debrin (Butkevich et al., 2004) oder CIP85 (Lan et al., 2005) zugeschrieben.

### **1.7 Expression und Funktion des Connexin36**

Zwischen Neuronen und anderen elektrisch erregbaren Zellen wie z.B. den Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Serre-Beinier et al., 2000) und den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (Degen et al., 2004) bildet Cx36 elektrische Synapsen aus. Beispielsweise bewirkt ein hoher Glukose-Spiegel eine Verringerung der Cx36-Expression in Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Dabei wird der cAMP-Proteinkinase A (PKA)-Signalweg aktiviert, der in einer verstärkten Bindung des Transkriptionssuppressors CRE-Modulator1 an die CRE (*cAMP response element*)-Sequenz in der Cx36-Promotor-Region resultiert (Allagnat et al., 2005).

Cx36 wurde als erste Connexin-Isoform hauptsächlich in Neuronen des Säugerhirns gefunden (Condorelli et al., 1998, Soehl et al., 1998). Als Orte der Cx36-Ausprägung im Gehirn sind insbesondere die Retina, die inferiore Olive, der *Bulbus olfactorius* (Belluardo et al., 2000; Zhang

und Restrepo, 2003), die Kleinhirnkerne sowie der Hippocampus und der Cortex zu nennen (Teubner et al., 2000), wobei Cx36 insbesondere jeweils in der Plasmamembran der Dendriten zu finden ist. Auf die Expression und Funktion von Cx36 in der Retina wird später besonders eingegangen.

### **1.8 Expression und Funktion des Connexin45**

Die Expression des Cx45 Proteins beginnt bereits in den embryonalen Stammzellen wie durch Immunoblot- und Immunfluoreszenz-Analysen gezeigt werden konnte (Wörsdörfer et al., 2008).

Im adulten Tier ist die Cx45-Expression in der Herzkammer auf das reizleitende System, den Atrioventrikularknoten, die His-Bündel und die Tawara-Schenkel beschränkt (Krüger et al., 2000; van Rijen et al., 2001).

Im neonatalen Gehirn der Maus ist die Cx45-Expression in nahezu allen Gehirnregionen stark ausgeprägt, während das Transkript im adulten Gehirn Cx45 nur in bestimmten Neuronen im Cortex sowie in der CA3/CA4-Region des Hippocampus, dem Thalamus und in der Molekularschicht des Kleinhirns nachgewiesen wurde (Krüger et al., 2000; Maxeiner et al., 2003). Bei der Embryonalentwicklung spielt Cx45 ebenfalls eine große Rolle, da es embryonal sowohl mesodermal als auch ektodermal in einer Vielzahl von Geweben sehr stark exprimiert wird: Haut (Butterweck et al., 1994), Osteoblasten (Steinberg et al., 1994), Herz (Acolea et al., 1999; Krüger et al., 2000), Motorneuronen (Chang et al., 1999), Retina (Güldenagel et al., 2000) und Gehirn (Maxeiner et al., 2003). Neben der Expression des Cx45 in neuronalen Geweben und im Herzen konnte eine Expression in der glatten Muskulatur des Darms und des Uterus gezeigt werden (Döring et al., 2006; Döring et al., 2007). Gegenwärtig diskutiert wird eine Expression im adulten Skelettmuskel (Volker Wulff, persönliche Mitteilung)

In mehreren Organen ist die genaue Lokalisation des Cx45 Proteins noch nicht bestimmt. Hierzu zählen die adulte Niere und die Gefäße. In vaskulären Zellen der Blutgefäße wird ebenfalls Cx45 exprimiert, allerdings ist hier die genaue Lokalisation des Cx45 Proteins nicht bekannt (Wagner, 2008).

Bei Cx45-defizienten Cx45<sup>-/-</sup> Mausembryonen haben Untersuchungen gezeigt, dass Cx45 eine essentielle Funktion bei der Entwicklung des embryonalen Kreislaufsystems inne hat (Krüger et al., 2000), bei den KO-Embryonen ist eine Verzögerung in der Entwicklung ab dem embryonalen Tag 9.0 zu beobachten, sie sterben schließlich im Verlauf des embryonalen Tag 10, da vermutlich eine funktionierende Blutzirkulation für die Versorgung des Embryos mit Nährstoffen und Sauerstoff

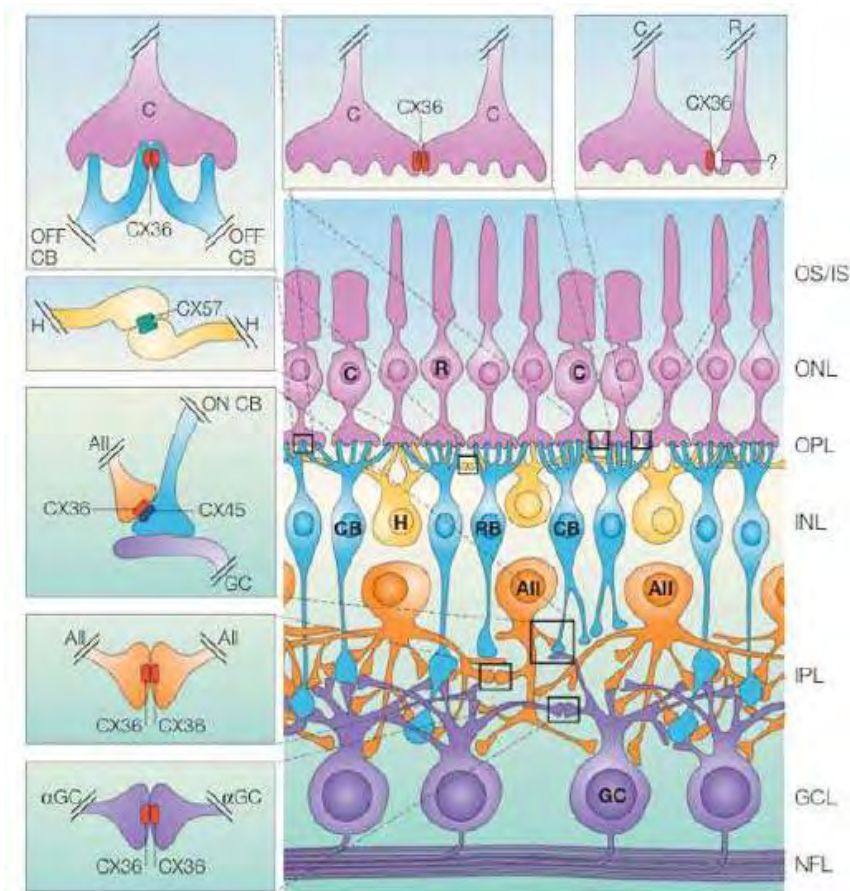


ausbleibt. Die drei sich parallel entwickelnden Blutgefäßsysteme Plazenta, Dottersack und Embryo sind ebenfalls in ihrer Entwicklung gestört. Weiterhin wird eine vermehrte Apoptose im embryonalen Gewebe festgestellt (Krüger et al., 2000) sowie eine fehlerhafte Reizweiterleitung und eine Störung der Endokardkissenbildung (Kumai et al., 2000).

Im embryonalen Gehirn könnte Cx45 an der Bildung elektrischer Synapsen und der Weiterleitung von Aktionspotentialen beteiligt sein bevor diese Aufgabe später von den chemischen Synapsen übernommen wird (Maxeiner et al., 2003). Bei Goldfischen etwa wurden gemischte Synapsen („mixed synapses“) beschrieben, bei denen sich Gap Junction Kanäle in direkter räumlicher Nähe zu chemischen Synapsen befinden (Pereda et al., 2003). Dies konnte für Cx36 und Cx45 auch in Nagern nachgewiesen werden (Rash et al., 2005; Cachepe et al., 2007). Da die Expression im Atrioventrikularknoten, den His-Bündeln und den Tawara-Schenkeln sehr hoch ist, kann eine Beteiligung an der Weiterleitung des elektrischen Impulses im adulten Herzen angenommen werden. Die Rolle der Expression von Cx45 im Arbeitsmyokard und in den Atrien (Bukauskas et al., 2006, Gros et al., 2005) ist noch unklar.

### **1.9 Aufbau der Retina und ihre elektrische Verschaltung**

Die Retina (Netzhaut) stellt ein spezialisiertes sensorisches Nervengewebe an der hinteren Innenseite des Auges dar, das die Lichtinformation, die durch die Linse in das Auge fällt, in elektrische Reize umwandelt, sie prozessiert und über den Sehnerv zu höheren Hirnzentren sendet. Bei Wirbeltieren spricht man von einer inversen Retina, da das Licht zunächst alle Zellschichten durchdringen muss, bis es auf die äußerste Schicht der lichtsensitiven Photorezeptoren fällt. Der Aufbau der Retina ist hochkonserviert (Masland, 2001) und klar geschichtet, sie weist ein hierarchisches, vertikales Verschaltungsschema auf (Abb. 1.4).



**Abb 1. 4 Schematische Darstellung der elektrischen Synapsen in der Retina**

Cx36 bildet homotypische Gap Junction Kanäle zwischen Zapfen (cones, C), AII-Amakrinzellen (AII), OFF-Zapfen-Bipolarzellen (OFF cone bipolar cells, OFF CB) und OFF-alpha-Ganglienzellen (GC). Homotypische Cx36-Gap Junction-Kanäle befinden sich zwischen Zapfen und Stäbchen (rods, R), zwischen AII-Amakrin- und ON-Zapfen-Bipolarzellen sowie zwischen OFF- bzw. ON-alpha-Ganglienzellen und Amakrinzellen (nicht eingezeichnet). Der Kopplungspartner auf der Seite der ON-Zapfen-Bipolarzellen wurde als Cx45 identifiziert. Horizontalzellen sind über Cx57-Gap Junction Kanäle gekoppelt (verändert aus Söhl et al., 2005).

Nach außen hin ist die Retina durch das retinale Pigmentepithel abgegrenzt, das die Netzhaut metabolisch versorgt und sehr eng mit den Photorezeptoren assoziiert ist (Strauss, 2005). Auf die Schicht der Photorezeptoren, die ihrerseits in die Schicht der Photorezeptoraußensegmente und der Äußeren Nukleären Schicht (ÄNL) unterteilt ist, folgt die Äußere Plexiforme Schicht (ÄPL), in der die Photorezeptoren auf die Interneurone projizieren. Die Somata der Interneurone bilden die auf die ÄPL folgende Innere Nukleäre Schicht (INL) und sind mit den Prinzipalneuronen der Retina, den Ganglienzellen, in der Inneren Plexiformen Schicht (IPL) verknüpft. Die Ganglienzellen sind in der innersten Schicht der Retina, der Ganglienzellschicht, organisiert. Ihre Axone bündeln sich zum Sehnerv, der aus der Retina hinausführt und ins Gehirn projiziert. Die Retina der Säugetiere besteht aus ca. 55 morphologisch unterscheidbaren neuronalen Zellen (Masland, 2001), wobei die Interneurone die höchste Diversität erreichen. Sie werden klassifiziert in Bipolar-, Amakrin- und Horizontalzellen. Bipolar- und Amakrinzellen teilen sich in weitere Subtypen auf. Horizontal- und Amakrinzellen ermöglichen eine zusätzliche laterale Verschaltung in der Retina. Die Photorezeptoren sind unterteilt in die Zapfen, verantwortlich für das photopische Farbsehen bei

Tageslicht, und die Stäbchen, verantwortlich für das skotopische Schwarz/Weiß-Sehen unter Sternenlichtbedingungen. Die Retina der nachtaktiven Maus besteht zu ca. 97 % aus Stäbchen (Jeon et al., 1998).

Bei der Zapfen-vermittelten Reizweiterleitung führen die durch die Absorption von Photonen hyperpolarisierten Zapfen zu einer Depolarisation nachgeschalteter ON-Zapfen-Bipolarzellen bzw. zu einer Hyperpolarisation nachgeschalteter OFF-Zapfen-Bipolarzellen.

Die ON- und OFF-Zapfen-Bipolarzellen projizieren ihrerseits auf die ON- und OFF-Ganglienzellen. Bei der Stäbchen-vermittelten Reizweiterleitung führen die hyperpolarisierten Stäbchen zu einer Depolarisation der nachgeschalteten Stäbchen-Bipolarzellen. Diese stehen nicht direkt mit den Ganglienzellen in Verbindung, sondern speisen ihre Informationen über die AII-Amakrinzellen in den Zapfen-Bipolarweg ein, wobei ON-Zapfen-Bipolarzellen depolarisiert und OFF-Zapfen-Bipolarzellen hyperpolarisiert werden. Zwischen AII Amakrinzellen und ON-Zapfen-Bipolarzellen befinden sich elektrische Synapsen. Die Informationsweiterleitung von AII-Amakrinzellen zu den OFF-Zapfen-Bipolarzellen erfolgt über glyzinerge chemische Synapsen.

Die AII-Amakrinzellen ihrerseits sind auch horizontal untereinander über elektrische Synapsen gekoppelt, die aus Cx36 gebildet werden (Xia & Mills, 2004). Diese homotypischen Gap Junction Verbindungen verbinden die AII Amakrinzellen, die so unter scotopischen (Tageslicht) Bedingungen schwach, unter mesopischen (Sternenlicht) Bedingungen stark gekoppelt sind. Die auf diese Weise erreichte Vereinigung der visuellen Signale führt zu einer von den in der Umgebung vorherrschenden Lichtverhältnissen abhängigen erhöhten Sensitivität der AII Amakrinzellen (Bloomfield & Volgyi, 2004). Diese Sensitivität nimmt unter Tageslichtbedingungen wieder ab, wobei das Netzwerk der AII-Amakrinzellen sich wieder weitgehend entkoppelt (Bloomfield et al., 1997).

Weiterhin ist bekannt, dass sich je nach vorherrschenden Lichtverhältnissen der extrazelluläre Dopaminspiegel in der Retina ändert: Bei Stimulation der Retina mit Tageslichtbedingungen erhöht sich dieser, D<sub>1</sub> Rezeptoren auf der Plasmamembran retinaler Neuronen werden aktiviert, was zu einer Erhöhung der Konzentration von intrazellulärem zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in diesen Zellen führt (Witkovsky, 2004). Ein erhöhter cAMP-Spiegel wiederum resultiert in einer verminderten homotypischen Kopplung von AII-Amakrinzellen und führt so zu einem Verschluss der homotypischen aus Cx36 bestehenden Gap Junctions (Hampson et al., 1992, Xia & Mills, 2004).

Denkbar wäre, daß eine solche Regulation über eine direkte Phosphorylierung des Cx36 erfolgt, was

für andere Connexine, z.B. Cx43 bereits gezeigt werden konnte (Lampe & Lau, 2004). Für Cx35, das Ortholog des Cx36 in der Karpfenretina, konnte eine posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung in HeLa Zellen bereits gezeigt werden (Patel et al., 2006), was diese Hypothese unterstützt.

### 1.10 Biologie des Gorasp2-Proteins

Das Gorasp2 Protein der Maus ist ein Protein von 47kDa (siehe Abb 1.5), das in hohem Maße evolutionell konserviert ist (Kinseth et al. 2007). Es wurde zunächst die Isoform aus der Ratte beschrieben (GRASP55), die im mittleren Golgi-Apparat transfizierter menschlicher HeLa Zellen lokalisiert wurde (Shorter et al., 1999).



**Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Domänenstruktur des des Gorasp2 Proteins**

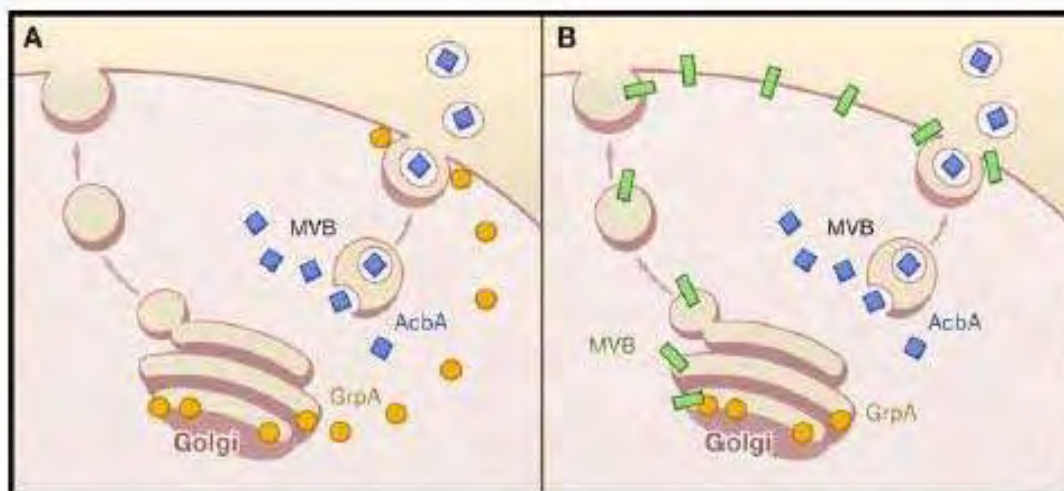
Dargestellt sind die durch Sequenzvergleich zu unterscheidenden und klassifizierenden Bereiche des Gorasp2 Proteins. Das 451 Aminosäurereste lange Protein besitzt eine N-terminale PDZ-Domäne (AS 5-75, in grün dargestellt) sowie eine weitere Domäne mit vermutlich globulärer Struktur (AS 94-180, in grün dargestellt) und wird dann mit vermutlich unstrukturierten Bereichen (in gelb dargestellt) fortgesetzt. Darstellung wurde erstellt mit Hilfe des ELM (Eucaryotic Linear Motive)-Server auf <http://elm.eu.org/>

Weiterhin wurde das Ortholog pfGRASP bereits in Plasmodien nachgewiesen, wo es, carboxyterminal fusioniert mit dem verstärkt fluoreszierenden Protein eGFP, als Markerprotein für den Golgi-Apparat in sämtlichen Lebenszyklen des *Plasmodium falsiparum* genutzt werden kann.

Es enthält eine N-terminale PDZ-Domäne (siehe Abb. 1.5), eine funktionelle N-terminale Myristylierungsstelle (Glyzin an Position 2) (Kuo et al., 2000) sowie mehrere Phosphorylierungsstellen, der Carboxyterminus wird als unstrukturiert, relaxiert und auch spezieübergreifend als am wenigsten konserviert beschrieben (Kinseth et al., 2007)

In der Ratte konnte sowohl das Transkript wie auch das GRASP55 Protein in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden, woraus eine ubiquitäre Expression des Proteins in Säugergeweben gefolgert wurde (Shorter et al., 1999). Weiterhin ist das GRASP55 Protein an der Organisation und Bildung von Golgi-Zisternen *in vitro* beteiligt, wo es rekombinant zu aufgereinigten Golgi-Membranen hinzugegeben in der Lage ist, die Bildung der Golgi-Stapel zu verhindern (Shorter et al., 1999). Bekannte Bindungsproteine des GRASP55 Proteins sind das ebenfalls golgiständige

Protein Golgin45, an dessen C-Terminus GRASP55 bindet, und das zusammen mit GRASP55 einen Rab-Effektorkomplex bildet und in diesem Zusammenhang am vesikulären Transport beteiligt ist (Short et al., 2001). Hingegen ist das menschliche Ortholog p59/GRASP55 in der Lage ist, an den Carboxyterminus des TGF-alpha-Protein zu binden und mit diesem am Golgi-Apparat von HeLa Zellen zu kolokalisieren (Kuo et al., 2000). Während der Mitose wird das humane GRASP55 phosphoryliert (Jesch et al., 2001), was essentiell für eine korrekte Dispersion des Golgi-Apparat zu sein scheint. (Feinstein & Linstedt, 2007)



**Abb. 1.6 Hypothetische Mechanismen der unkonventionellen Sekretion**

In A dargestellt ist eine Möglichkeit der Beteiligung des GRASP Proteins (dargestellt die *D. discoideum* Isoform GrpA in gelb), dessen Anwesenheit an der Plasmamembran notwendig sein könnte, um die unkonventionelle Sekretion von Acetyl-CoA-Bindeprotein (dargestellt in blau) zu ermöglichen. In B dargestellt eine alternative Möglichkeit, in dem das GRASP am Golgi verbleibt, aber für den Transport eines hypothetischen Cofaktors an die Plasmamembran verantwortlich ist, verändert nach Levi & Glick, 2007

Vor kurzem wurde durch Kinseth et al., 2007, (kommentiert durch Levi & Glick, 2007) ein weiterer Aspekt der Charakterisierung der GRASP Proteine hinzugefügt: Sie konnten einen für das Ortholog des Gorasp2 Protein im Schleimpilz (*Dictyostelium discoideum*) defizienten Pilz erzeugen, der vollständig lebensfähig ist, und überdies normale Wachstumsraten sowie eine nicht beeinträchtigte Proteinsekretion aufweist. Lediglich die Sporulation der Schleimpilze war beeinträchtigt, da es ihnen nicht möglich war, den für die Sporulation notwendige acetyl-CoA Bindeprotein (AcbA) zu sezernieren (siehe Abb. 1.6). Die Sporulationsfähigkeit wiederherzustellen war den Autoren durch die erneut induzierte Expression des GRASP-Orthologs in GRASP-defizienten Schleimpilzen möglich. Die Autoren folgern, dass die GRASP Proteine vermutlich auch in höheren Tieren für die unkonventionelle Sekretion von Proteinen verantwortlich sind. Ein eventueller Kandidat ist das

Säuger-Acetyl-CoA Bindeprotein (ACBP), dessen Sekretion noch ungeklärt ist.

### 1.11 Multidimensionale Protein Identifikations Technologie (MudPIT)

Für viele Experimente ist es wichtig, die Anwesenheit eines Proteins in einem Versuchsansatz nachzuweisen. Neben der Möglichkeit, die Anwesenheit eines Proteins mittels herkömmlicher Methoden wie Immunoblot oder Immunfluoreszenz nachzuweisen, ist auch ein massenspektrometrischer Ansatz möglich. Gerade bei der Identifikation neuer bzw. unbekannter Proteine, für die man zunächst keine spezifische Nachweisreagenzien einsetzen kann, können gleichzeitig mehrerer Proteine nachgewiesen werden, indem man sich die Proteomics-Technik MudPIT (Multidimensionale Protein-Identifikations Technologie) zunutze macht (Washburn et al., 2001).

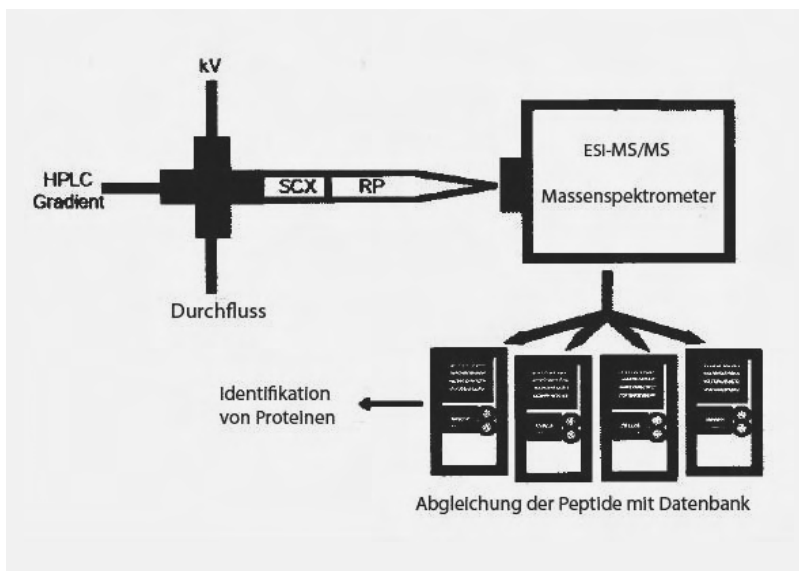


Abb. 1. 7: Schematische Darstellung einer MudPIT-Anlage

Dargestellt ist schematisch der Aufbau einer MudPIT-Anlage, gezeigt ist die zwei Bestandteile (SCX: Ionentauscher RP: reverse phase) enthaltende Säule, deren Kopfstück die Anschlüsse für einen Pipettierroboter, eine Abflusseinrichtung und die Stromzufuhr enthält. Diese Säule wird in einem Elektrospray in das Massenspektrometer eluiert, wo die im elektrischen Feld beschleunigten Peptide in ein Kollisionsgas beschleunigt werden und deren Fragmentmassen anschließend detektiert und in einer Datenbank abgeglichen und ausgewertet werden

Bei dieser Technik wird ein tryptisch verdautes, komplexes Proteingemisch über eine Säule gegeben, aus welcher die auf diese Weise separierten tryptischen Fragmente in einem elektrischen Feld beschleunigt und deren Fragmente nach Interaktion mit einem Kollisionsgas durch ein MS/MS Massenspektrometer direkt nachgewiesen werden können, worauf eine Software auf die Identität des nachgewiesenen Peptids schließen kann (siehe Abb. 1.7). Wird diese Messung kontinuierlich durchgeführt und ausgewertet, können so sämtliche im Laufe des Experiments von der Säule eluierenden Peptide, deren Identität im Massenspektrometer ermittelt werden konnte, automatisch mit einer Datenbank abgeglichen und so deren Ursprungprotein identifiziert werden, so dass man eine Liste der nachgewiesenen Peptide und deren Proteinzuordnung erhält (Wolters et al., 2001, McCoss et al., 2002). Wird eine solche Messung nun mit einer Kontrollmessung, etwa einer

Negativkontrolle im Falle einer Immunpräzipitation oder eines GST-Pulldowns, verglichen (Wolters et al., 2001), ist man in der Lage, Rückschlüsse auf die Identität der Proteine in der Differenzmenge zu ziehen. Die sich in dieser Differenzmenge befindlichen Proteine müssten im jeweilig durchgeführten Experiment als spezifisch positiv erachtet werden, d.h. im Falle eines GST Pulldowns oder einer Immunpräzipitation die Menge der präzipitierten Proteine darstellen. Diese Technik hat den Vorteil, dass so auch Bindungspartner von Proteinen nachgewiesen werden können, wenn sie nur zu einer sehr geringen Menge im Versuchsansatz vorliegen, als dass eine Visualisierung in einem einer Silberfärbung unterzogenem Proteingel gelingen könnte. Ein weiterer Vorteil ist zusätzlich, dass der eventuell bei der Durchführung des Experiments auftretende Hintergrund keine so grosse Rolle spielt wie bei vergleichbaren Experimenten, da dieser durch Bildung der Differenzmenge mit den Kontrollen wegfällt (Sato et al., 2004)

### **1.12 Biomolekulare Nukleäre Magnet Resonanz (NMR)-Spektroskopie**

Wenn man eine Aussage zu der Faltung und räumlichen Anordnung eines Proteins im Raum zu treffen versucht, um so einen Nachweis für eine funktionelle Relevanz und Funktion der Proteinstruktur zu finden, ist man auf zwei Methoden angewiesen. Neben der bereits lange genutzten Technik, über eine Kristallisierung des Proteins eine Charakterisierung der im Proteinkristall ausgebildeten Strukturen mittels Röntgenstrukturanalyse vornehmen zu können (Poulos & Raag, 1992), existiert ebenfalls die Möglichkeit, die räumliche Struktur eines Makromoleküls auch in wässriger Lösung mit Hilfe der NMR (Wüthrich, 1990) zu bestimmen. Dies hat im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse den Vorteil, dass sich das zu untersuchende Molekül in Lösung, also in einer im Vergleich mit der für eine Röntgenanalyse notwendigen kristallisierten Form nativer Umgebung befindet. Auf diese Weise sind auch dynamische Messungen, etwa in Gegenwart unterschiedlicher Ionen- und Metabolit-Konzentrationen oder Interaktionspartnern oder auch bei verschiedenen pH-Werten, möglich. Etwa bei der Entwicklung von medizinisch relevanten Hemmstoffen kommt die biomolekulare NMR so zum Einsatz, um genau die Kinetiken und Konformationsänderungen in der Proteinsekundärstruktur während der Bindung des natürlichen Liganden im Vergleich zu einem möglicherweise entwickelten artifiziellen Liganden, dem Hemmstoff, zu messen (Pellecchia et al., 2002). Die biomolekulare NMR hat den Nachteil, dass sich nur relativ kleine Proteine und Proteindomänen von bis zu 150 Aminosäurereste vermessen lassen (JP Dr. Raphael Stoll, persönliche Mitteilung), bei grösseren Molekülen ist dies nur unter grossen Schwierigkeiten machbar. Weiterhin ist klassischerweise nur die Messung löslicher Proteine möglich, mittlerweile



kann allerdings sogar bereits eine NMR-Messung von kleinen Membranproteinen durchgeführt werden. (Roosild et al., 2005).

Nuklearchemisch ist die Technik so zu verstehen, dass eine möglichst reine und konzentrierte Probe des zu messenden Peptids einem starken Magnetfeld ausgesetzt wird, welches bewirkt, dass sich die Mehrzahl der Atomkerne mit ungeraden Protonenzahlen in Richtung des angelegten Magnetfeldes ausrichten, da unter diesen Bedingungen dieser Zustand energetisch günstiger ist. Wenn nun eine elektromagnetische Strahlung der korrekten Frequenz appliziert wird, die von der Stärke des angelegten Magnetfeldes sowie der Eigenschaften des Nukleus abhängig ist, begeben sich einige Nuklei wieder in eine nicht der Magnetfeldrichtung entsprechende ungeordnete Orientierung, man spricht hier von einem Resonanzzustand, der bei einem gegebenen Nukleus und einer gegebenen Magnetfeldstärke bei konstanter elektromagnetischer Bestrahlung prinzipiell konstant wäre. Allerdings ist diese Resonanz zusätzlich abhängig von der Elektronendichte in der Umgebung der einzelnen Nuklei, die je nach chemischer Verknüpfung stark variiert. So ist es möglich, durch Variation der Frequenz der elektromagnetischen Strahlung sämtliche Umgebungszustände eines gegebenen Nukleus festzustellen und so einen Rückschluss auf deren chemische Umgebung zu ziehen. So ist es nach Anregung unterschiedlicher Nuklei, etwa  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  oder  $^{15}\text{N}$  unter Voraussetzung der Kenntnis der Primärstruktur des Proteins möglich, den einzelnen unterschiedlichen Resonanzzuständen die jeweiligen Identitäten der Nuklei zuzuordnen und aus diesen Daten die räumliche Struktur des Proteins zu bestimmen (Lottspeich & Zorbas, Bioanalytik, 1998).

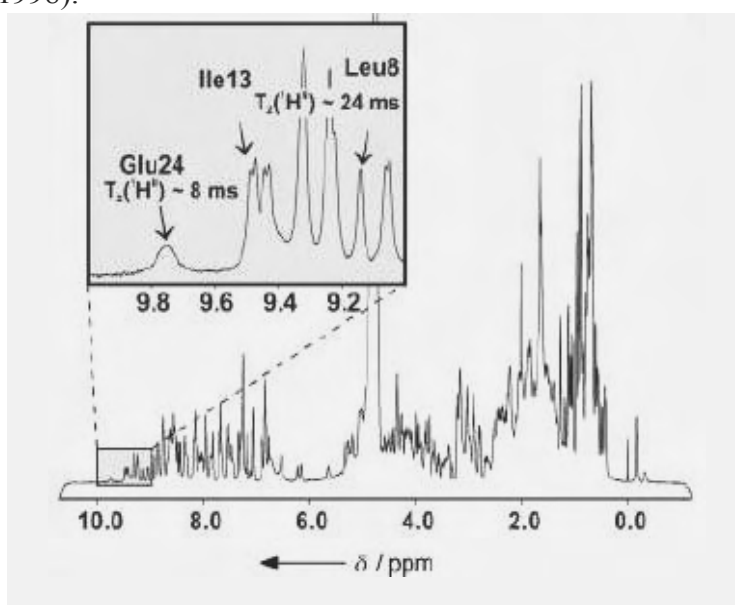


Abb 1. 8. Beispiel eines 1D-Protonenspektrums

Beispielhaft dargestellt ist ein 1D-Protonenspektrum eines Proteins sowie die einzelnen erfolgten Zuordnungen der Nuklei, entnommen aus Schwalbe, 2003



Auch in der Erforschung der Connexine wurde die NMR bereits angewandt, so wurde die räumliche Struktur des C-Terminus des Cx43 von Sorgen et al. (2002) bestimmt, und später in Titrationsexperimenten die zuvor beschriebene Bindung von c-src und ZO-1 charakterisiert (Sorgen et al., 2004). Weiterhin gelang so der Nachweis der pH-abhängigen Bindung der cytoplasmatischen Schleife an den Carboxyterminus des Cx43 (Hirst-Jensen et al., 2004). Ausserdem wurden bereits erste Studien zur Auflösung der NMR-Struktur des C-Terminus von Cx26 begonnen (A. Harris, Gap Junction Konferenz 2007)

Im Carboxyterminus des Cx43 Proteins wurden von Sorgen ausser einigen wenigen alpha-helicalen Bereichen lediglich grösstenteils unstrukturierte, ungeordnete Bereiche gefunden, die sich unter Bindung von ZO-1 nur wenig in ihrer Konformation ändern (Sorgen et al., 2002, Sorgen et al., 2004).

Ein weiteres interessantes Ziel für eine NMR Analyse ist der Carboxyterminus des Cx45 Proteins, da hier mit Hilfe des Lupas- Algorithmus (vergl. Diplomarbeit Thorsten Höher, 2003; Dissertation Stephan Maxeiner 2005) eine coiled-coil Struktur vorausgesagt werden konnte. Strukturen dieser Art sind als proteinbindende Motive beschrieben (Luke et al, 2003) und könnten als solche eine funktionelle Relevanz besitzen.

### **1.13 Zielsetzung der Arbeit**

Da erste Untersuchungen eine Phosphorylierung des Cx36 Proteins in der Retina der adulten Maus zeigen konnten, sollte die Aufklärung der funktionellen Phosphorylierung des Cx36 Proteins in AII-Amakrinzellen der Mausretina durchgeführt werden. Insbesondere der molekulare Mechanismus des Kanalverschlusses sollte herausgearbeitet werden. Ausserdem sollen mögliche Parallelen und Unterschiede in der Phosphorylierung des Cx36 Proteins durch die in einem Interaktionsassay gefundene Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) in der unteren Olive aufgezeigt werden.

Um der Biologie der posttranslationalen Modifikationen und Bindeproteine der Connexine auf den besser zu verstehen, sollten Interaktionsstudien bezüglich der zytoplasmatischen Domänen des Cx45 Proteins durchgeführt werden. Insbesondere sollte die GST-Pulldown-Technik soweit etabliert werden, dass sie im Rahmen einer massenspektrometrischen Analyse (MudPIT) Aufschluss darüber geben kann, welche Proteine an die zytoplasmatische Schleife sowie den Carboxyterminus des Cx45 binden. Darüber hinaus sollte die Bindung des Gorasp2-Proteins, eines Interaktionskandidaten

aus einem Hefe-2-Hybrid-Experiment an den Carboxyterminus des Connexin45 Proteins untersucht werden.

Um die Bindung eventueller Kandidatenproteine an das Cx45 Proteins besser verstehen zu können, sollte in dieser Arbeit ebenfalls die Struktur des Cx45 Carboxyterminus mit Hilfe der nukleären Magnet-Resonanz-Spektroskopie (NMR) untersucht werden. Hierzu wurde die Etablierung der isotopisch markierten Anzucht und die Aufreinigung ausreichender Mengen dieser Domäne notwendig, um ein NMR Spektrum aufnehmen zu können das zu einer Aussage bezüglich der räumlichen Struktur des Cx45 Carboxyterminus führen soll.

Weiterhin sollte eine Analyse einer transgenen Cx45eGFP Mauslinie durchgeführt werden, in die das Cx45eGFP-Transgen unter Benutzung eines BAC (Bacterial Artificial Chromosome) in das Genom der Maus eingebracht worden war. Insbesondere sollte die Fluoreszenz des Cx45eGFP Reporterproteins in der Retina charakterisiert werden.

## 2. Material

Alle verwendeten Chemikalien werden, sofern nicht anders vermerkt, in Analysequalität (p.a.) von den Firmen Difco, Fluka, Gibco BRL, Merck, Pierce, Renner, Riedel-de-Haen, Roth, Serva und Sigma bezogen. Enzyme und Nukleotide stammen von den Firmen Amersham Biosciences, Invitrogen, MWG-Biotech, New England BioLabs, Promega und Roche. Radiochemikalien werden bei Amersham Biosciences erworben, Geräte und Chemikalien für die 2D-Gelelektrophorese von Invitrogen.

### 2.1 Stammlösungen, Puffer und Medien

Falls nicht anders vermerkt, werden Lösungen, Puffer und Medien in sterilem A. bidest angesetzt und bei RT aufbewahrt. Die pH-Werte werden mit 10 N NaOH oder HCl konz. eingestellt.

#### 2.1.1 Allgemeine Lösungen

<b>PBS<sup>-</sup> (pH 7,2)</b>	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> für die Kultur von Hel37-Zellen 20 min autoklavieren.
<b>PBS<sup>+</sup> pH (7,2)</b>	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,7mM CaCl <sub>2</sub> 0,5mM MgCl <sub>2</sub>
<b>SDS-Stammlösung (10 %)</b>	10%ige (w/v) Natriumdodecylsulfatlösung



<b>Natriumacetat (pH 4,8)</b>	3 M Natriumacetat ad 100 ml mit A. bidest, pH 4,8 einstellen und 1 h autoklavieren.
<b>Ethanol (70%)</b>	70% Ethanol (abs) in A. bidest ansetzen
<b>Proteinase K-Lösung (20µg/µl)</b>	20 mg Proteinase K in 1 ml A. bidest lösen; Aliquots bei -20°C lagern.
<b>Lysozym-Stammlösung (10µg/µl)</b>	10 mg Lysozym in 1 ml A. bidest lösen; Aliquots bei -20°C lagern.
<b>RNase 2000</b>	100 mg RNase A 1 ml RNase T (1 x 10 <sup>5</sup> U) 49 ml RNase-Puffer 15 min kochen, langsam abkühlen lassen und in 2 ml-Aliquots bei -20°C lagern.
<b>TBE-Puffer (10 x)</b>	1 M Tris 0,83 M Borsäure 10 mM EDTA
<b>TE-Puffer (pH 8)</b>	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA 20 min autoklavieren

### 2.1.3 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

Sämtliche Medien werden, sofern nicht anders angegeben, im Autoklaven 20 min bei 120°C

sterilisiert. Nach Abkühlen auf 50 - 55°C erfolgt der Zusatz fehlender Komponenten, die hitzelabil sind und daher sterilfiltriert werden (Rotrandfilter; Schleicher & Schüll). Bei der Herstellung von Agarplatten wird den Medien vor der Sterilisation 1,5 % (w/v) Agar (Difco) zugesetzt. Nach Abkühlen des Mediums auf 50°C werden die Agarplatten unter einer Sterilbank gegossen. Im Fall von Selektionsnährböden wird der abgekühlte Agar zuvor mit Selektionsantibiotikum (Ampicillin) versetzt. Sterile Einwegartikel wie Pipetten und Plastikschaalen werden von den Firmen Falcon und Sarstedt bezogen.

**Ampicillin-Stammlösung**                      0,5 g Ampicillin in 5 ml ddH<sub>2</sub>O lösen,  
**(pH 7,4) (100 mg/ml)**                      sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20°C lagern,  
Endkonzentration in Selektionsmedien: 100 µg/ml.

**IPTG-Stammlösung**                      1 M Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid  
sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20°C lagern.

**LB-Medium (pH 7,4)**                      10 g Bacto-Trypton (Difco)  
5 g Hefeextrakt (Difco)  
10 g NaCl  
ad 1 l A. Bidest

### **M9-Medium nach Maniatis**

Medium A (pro Liter)

- 100 ml M9-Medium (10x)
- 10 ml Spurenelementelösung (100x)
- 20 ml 10% (w/v) Glukose (Serva)
- 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>
- 0.3 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>
- 1 ml Biotin (1 mg/ml)
- 1 ml Thiamin (1 mg/ml)

M9 medium (10x), pro Liter einzuwiegen:

60 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
30 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
5 g	NaCl
5 g	NH <sub>4</sub> Cl

Spurenelementelösung (100x), (pro Liter)

5 g	EDTA
0.83 g	FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
84 mg	ZnCl <sub>2</sub>
13 mg	CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
10 mg	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
10 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
10 mg	MnCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O

Zuerst 5 g EDTA in 800 ml Wasser lösen und den pH auf 7.5 einstellen, dann die anderen Komponenten hinzufügen und das Volumen auf 1 l auffüllen, anschliessend über einen 0,22 µm Filter sterilfiltrieren

**<sup>15</sup>N-markiertes Ammoniumchlorid (N<sub>15</sub>H<sub>4</sub>Cl)**

Silantes

**LB-Nährböden**

zu 1 l LB-Medium werden 1,5 % (w/v) Agar gegeben; 20 min autoklavieren,

bei Bedarf Zugabe von Antibiotika,

Nährböden in 10 cm Kulturschalen gießen,

Lagerung lichtgeschützt bei 4°C.

**Lysispuffer zur Bakterienlyse**

PBS<sup>-</sup>

1 mM DTT

1 mM EDTA

0,5 µg/ml Lysozym (50 µl pro ml der Lysozymstammlösung)

1x Complete™ (Roche)

## **2.2 Lösungen für die Kultur embryonaler Stammzellen der Maus**

Alle kommerziell erworbenen Lösungen, Medien und A.bidest sind zellkulturgetestet. Angesetzte Lösungen wurden autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

Die Medien wurden bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch auf 37°C erwärmt. Sterile Ein-wegartikel wie Pipetten und Plastikschalen kommen von den Firmen Falcon, Nunc und Sarstedt.

### **Einfrier-Medium (2 x)**

17,5 ml Normalmedium  
5 ml DMSO  
2,5 ml fötales Kälberserum  
bei -20°C lagern,

### **Gelatine-Stammlösung**

1 % (w/v) Gelatine in A. bidest lösen, zweimal für 1 h autoklavieren; bei 4°C lagern;  
für Zellkulturgebrauch: 0,1 % Lösung in sterilem, destilliertem ES-Kultur-Wasser herstellen.

### **Glutamin (100 x)**

200 mM L-Glutamin  
auf Endvolumen mit A.bidest auffüllen,  
sterilfiltrieren,  
Lagerung bei -20°C.

### **HBS (2 x, pH 7,2)**

50 mM Hepes  
280 mM NaCl  
10mM KCl  
12 mM D-Glucose  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
ad 50 ml mit A. bidest und sterilfiltrieren.



<b>Normalmedium (10 % Serum)</b>	500 ml Glasgow MEM, (Biochrom)
<b>(HM-1-Zellkulturmedium)</b>	5,6 ml Glutamin (10 x) 5,6 ml Natriumpyruvat (10 mM), (Sigma) 5,6 ml nicht-essentielle Aminosäuren (100 x), (Sigma) 28 ml sterilfiltriertes fötales Kälberserum, (Sigma) 28 ml sterilfiltriertes Neugeborenen Kälberserum, (Sigma) 0,57 ml $\beta$ -Mercaptoethanol (0,1 M) 0,57 $\mu$ l humanes LIF (1000 x), (Magin et al., 1992) 5,6 $\mu$ l Penizillin-Streptomycin (100 x) bei 4°C lagern, ca. 1 Monat haltbar.
<b>methioninfreies Mangelmedium</b>	DMEM M <sup>-</sup> (CC Pro)
<b>phosphatfreies Mangelmedium</b>	DMEM P <sup>-</sup> (CCPro)
<b>Penizillin/Streptomycin-Stammlösung (100 x)</b>	0,6 % (w/v) Penizillin (10.000 Einheiten/ml) 1 % (w/v) Streptomyzinsulfat (10.000 Einheiten/ml) in Puck'scher Saline, pH 8,2; sterilfiltrieren bei 4°C lagern.
<b>Puck'sche Saline</b>	8,0 g NaCl 0,4 g KCl 1,0 g D-Glucose 0,35 g Natriumhydrogencarbonat mit A. bidest auf 1 l auffüllen, pH 8,2; sterilfiltrieren, bei -20°C lagern.
<b>Trypsin-Lösung</b>	400 ml autoklaviertes PBS <sup>-</sup> 100 ml autoklavierte EDTA-Lösung (1,85 g/l) 5 ml zellkulturgetestetes Trypsin (10 x) 5 ml zellkulturgetestetes Hühnerserum sterilfiltrieren und Aliquots bei -20°C lagern.

### 2.3 Medien und Lösungen für die Zell-Kultur

Medien und Lösungen für die Zellkultur werden mit A. bidest angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert oder sterilfiltriert. Gleiches gilt für kommerzielle Medien und Lösungen, sofern nicht bereits durch den Hersteller geschehen. Medien werden bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch 15 min in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt. Sterile Einwegartikel wie Pipetten und Plastikschalen kommen von den Firmen Falcon, Nunc und Sarstedt.

<b>DMEM (pH 6,9)</b>	Dulbecco`s Modified Eagle Medium (10 g/l)
<b>D 10-Medium</b>	DMEM 10% (v/v) fötales Kälberserum (56°C, 30 min hitzeinaktiviert) 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung
<b>D 10 M-Medium</b>	DMEM M <sup>-</sup> 10% (v/v) fötales Kälberserum, dialysiert gegen 0,9 % (w/v) NaCl. 5,6 ml Glutamin (10x)
<b>D 10 P-Medium</b>	DMEM P <sup>-</sup> 10% (v/v) fötales Kälberserum, dialysiert gegen 0,9 % (w/v) NaCl. 5,6 ml Glutamin (10x)
<b>Versine-Trypsin-Lösung (pH 7,5)</b>	8,0 g NaCl 0,4 g KCl 1 g Glukose 0,2 g EDTA 16 ml Trypsinlösung (2,5 % in PBS <sup>-</sup> ) , ad 1 l, Lagerung bei -20° C oder angebrochen bei 4°C.

## 2.4 Lösungen zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien

<b>TFB I (pH 5,8)</b>	30 mM KAc 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM RbCl <sub>2</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % (v/v) Glyzerin sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C
<b>TFB II (pH 7,0)</b>	10 mM NaMOPS (Natrium-Morpholino-propansulfonsäure) 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl <sub>2</sub> 15 % (v/v) Glyzerin sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C
<b>YT<sup>++</sup>-Medium (pH 7,5)</b>	8 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l, nach Autoklavieren und Abkühlen 20 ml MgSO <sub>4</sub> (1 M, autoklaviert) 10 ml KCl (1 M, autoklaviert) hinzufügen.

## 2.5 Lösungen für die Protein-Analytik

Sämtliche Lösungen werden, sofern nicht anders vermerkt, mit doppelt destilliertem Wasser ddH<sub>2</sub>O angesetzt,

<b>Ammoniumpersulfat (APS) (10 %)</b>	10 % ige Ammoniumpersulfatlösung herstellen, Lagerung bei 4°C
---	--

<b>Blockierungslösung (Immunoblot)</b>	5% Milchpulver in TBS-T
<b>Complete™-Stammlösung (Gemisch aus Proteasen- Hemmern, 25 x)</b>	1 Tablette Complete™ (Roche, Mannheim) in 2 ml A. bidest lösen, Aliquots bei -20°C lagern.
<b>Coomassie-Entfärbe-Lösung</b>	10 % Essigsäure 30 % Methanol
<b>CoomassieBrilliantBlue™ -Färbelösung</b>	0,25 % Coomassie R250 10 % Essigsäure 50 % Methanol durch Faltenfilter filtrieren, lichtgeschützt bei RT lagern, Lösung kann mehrmals verwendet werden.
<b>Elektrophorese-Puffer (10 x)</b>	0,25 M Tris 1,92 M Glyzin 1 % (w/v) SDS
<b>Fixierlösung für SDS-Gele</b>	50 % Methanol, 15 % Eisessig, 35 % A.bidest
<b>Immunoblot-Transferpuffer (pH 8,1 - 8 ,3)</b>	20 mM Tris 150 mM Glyzin 20 % Methanol
<b>Protein-Sammelgelpuffer (Lösung D, pH 6,8)</b>	0,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS vor Zugabe von SDS Tris in Millipore lösen.
<b>Protein-Trenngelpuffer (Lösung B, pH 8,8)</b>	1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS

vor Zugabe von SDS Tris in Millipore lösen.

<b>SDS-Probenpuffer („Laemmli-Puffer“)</b>	62,5 mM Tris 3% (w/v) SDS 10 % (v/v) Glyzerin 5 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 0,01 % (v/v) Bromphenolblau Lagerung für vier Wochen bei RT
<b>TBS-T</b>	TBS 0,5% (v/v) Tween
<b>RIPA-Lysis-Puffer</b>	10 mM Phosphatpuffer, 0.1% SDS, 1% TritonX-100, 0.1% Natrium-Desoxycholat, 40 mM NaF) mit 1x Complete
<b>RIPA-Waschpuffer</b>	10 mM Phosphatpuffer, 1 M NaCl, 0.2% TritonX-100, 40 mM NaF, 10 mM EDTA mit 1x Complete
<b>Trypsin-Lösung für den tryptischen Verdau</b>	Promega porcine modified Trypsin, angesetzt nach Herstellerangaben
<b>MilliCell CM-Filtereinsätze</b>	Millipore
<b>ProteinG-Sepharose</b>	Gerbu
<b>ProteinA Sepharose</b>	Amersham Biosciences

## 2.6 Lösungen und Chemikalien für den GST-Pulldown

Sämtliche Lösungen werden, sofern nicht anders vermerkt, mit A. bidest angesetzt.

<b>TX-100 Lysispuffer</b>	50 mM TrisHCL 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0,2% Triton X-100 1x Complete™
<b>immobilisiertes Glutathion</b>	50 %ige Suspension (Pierce), Lagerung bei 4°C (an Agarosematrix)
<b>Waschpuffer</b>	PBS <sup>-</sup> 1x Complete™
<b>NP-40-Waschpuffer</b>	20 mM Tris 200 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5% Nonidet P-40
<b>Elutionspuffer 10 mM</b>	PBS <sup>-</sup> 1x Complete™ 10 mM reduziertes Glutathion
<b>Fischgelatine-Lösung</b>	2%ige Fischgelatinelösung in PBS <sup>-</sup>
<b>BSA</b>	5%ige Stammlösung in PBS <sup>-</sup> (bovine serum albumin, Fraktion V)
<b>Lagerungslösung</b>	0,05% Natriumacid

## 2.7 Kommerzielle Reagenziensätze

<b>Name</b>	<b>Referenz</b>
Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit	Sigma
ECL SuperSignal West Pico	Pierce
Jetstar Plasmid Midi Kit 50	Genomed
Perfectprep® Gel Cleanup Kit	Eppendorf
MOM-Kit	Vector Laboratories
TNT(R)-in vitro-Translations-Kit	Promega

**Tabelle 2-1:** Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Reagenziensätze.

## 2.8 Nukleinsäuren

### 2.8.1 Oligonukleotide als Startermoleküle für die Polymerase-Kettenreaktion

<b>Name</b>	<b>5' → 3'-Sequenz</b>	<b>Bindungsstelle</b>	<b>Orientierung</b>
Lin7b_EcoRI_ FOR	5'-GGA AAT CCA CCA TGG CTG CAC TGG TGG AGC CG-3'	5' Ende der Lin7b cDNS	Sinn
Lin7B_EcoRI- REV	5'-CAG AAT TCC TGA GCC TCG AGA CTC CAA G-3'	3' Ende der Lin7b cDNS	Gegen- sinn
MyL4ClaI_US P	5'-CCA TCG ARG GAC CA'T GCC TCC CAA GAA ACC CG-3'	5' Ende der MyL4 cDNS	Sinn
MyL4ClaI_DS P	5'-CCA TCG ATG GTT ACC CAG ACA TGA TGT GCT TG-3'	3' Ende der MyL4 cDNS	Gegen- sinn
CrkM_EcoRI_ FOR	5'-GGA ATT CCA CCA TGC CGT TCG GCA ACA CCC AC-3'	5' Ende der CrkM cDNS	Sinn
CrkM rev	5'-GGA ATT CCC TAC TTC TGC GCG GGG ATC ATG TCG-3'	3' Ende der CrkM cDNS	Gegen- sinn
Gorasp2_BglII _USP	5'-GTA AGA TCT ACC ATG GGC TCC TCG CAG AGC G-3'	5'-Ende der Gorasp2 cDNS	Sinn

## Material

XhoI-G2_DSP	5'-TAC TCG AGT TAA GAA GGC TCT GAA GCA TCT GC-3'	3' Ende der Gorasp2 cDNS	Gegen- sinn
USP- G2inYFPzeo	5'-AGG ATC CAC CAT GGG CTC CTC GCA GAG CG-3'	5'-Ende der Gorasp2 cDNS	Sinn
DSP- G2inYFPzeo	5'-GGA TCC CCA GAA GGC TCT GAA GCA TCT GC-3'	3'-Ende der Gorasp2 cDNS	Gegen- sinn
BglII- FlagG2_USP	5'-GTA AGA TCT CC ACC ATGGAC TAC AAA GAC GAT GAC GAC AAG GGC TCC TCG CAG AGC G-3'	5'-Ende der Gorasp2 cDNS	Sinn
XhoI- G2Flag_DSP	5'-TAC TCG AGT TAC TTG TCG TCA TCG TCT TTG TAG TCA GAA GGC TCT GAA GCA TCT GC	3'-Ende der Gorasp2 cDNS	Gegen- sinn
Cx45CT_EcoR I_USP	5'-GGGATC CCA CTT AGG GTT TGG GAC AAT TC-3'	5'-Ende der Cx45CT cDNS	Sinn
Cx45CT_EcoR I_DSP	5'-GGA ATT CCT TAA ATC CAG ACG GAG GTC-3'	3'-Ende der Cx45CT cDNS	Gegen- sinn
Cx45CLoop for	5'-GGA GAT CTA TGC TAT TCA TAA GAT TGC CAA AAT G-3'	5'-Ende der Cx45CL cDNS	Sinn
Cx45CLoop rev	5'-CCG-ACA GAT CTC ATA AGA TTG CCA AAA TGG AG-3'	3'-Ende der Cx45CL cDNS	Gegen- sinn
Cx36CTsmaI- USP	5'-TCC CCC GGG CTG AAC TTA ACC ATC TGG GATGG-3'	5'-Ende der Cx36CT cDNS	Sinn
Cx36CT-NotI- DSP	5'-ATA AGA ATG CGG CCG CCC TTT CAC ACA TAG GCA GAG-3'	3'-Ende der Cx36CT cDNS	Gegen- sinn
Cx36CL- BamHI-USP	5'-CGG ATC CGC CAA GCA GCG AGA ACG-3'	5'-Ende der Cx36Cl cDNS	Sinn
Cx36CL- EcoRI-DSP	5'-GGA ATT CCT TAG ATA CCT TCC TGT CTT CGG AG-3'	3'-Ende der Cx36Cl cDNS	Gegen- sinn
Cx36S110A- USP	5'-GAG AAC GCC GGT ACG CTA CTG TCT TCC-3'	Bereich für S110 cod. Region, PM	Gegen- sinn



Cx36S110A-DSP	5'-GGA AGA CAG TAG CGT ACC GGC GTT CTC-3'	Bereich für S110 cod. Region, PM	Sinn
Cx36S293A-USP	5'-GCC AAG AGG AAG GCA GTC TAT GAG ATA C-3'	Bereich für S293 cod. Region, PM	Gegensinn
Cx36S293A-DSP	5'-GTA TCT CAT AGA CTG CCT TCC T CTT GGC-3'	Bereich für S293 cod. Region, PM	Sinn
Cx36S306A-USP	5'-CTG CCT CGA GTC GCT GTT CCC AAT TTC-3'	Bereich für S306 cod. Region, PM	Gegensinn
Cx36S306A-DSP	5'-GAAATT GGG AAC AGC GAC TCG AGG CAG-3'	Bereich für S306 cod. Region, PM	Sinn
Cx36S315A-USP	5'-GGC AGG ACT CAG GCC AGT GAC TCT G-3'	Bereich für S315 cod. Region, PM	Gegensinn
Cx36S315A-DSP	5'-CAG AGT CAC TGG CCT GAG TCC TGC C-3'	Bereich für S315 cod. Region, PM	Sinn

**Tabelle 2-2:** Übersicht der in dieser Arbeit als PCR-Startermoleküle verwendeten Oligonukleotide. PM: Molekül codiert für eine Serin zu Alanin-Punktmutation

### 2.8.2 Startermoleküle für Auftragssequenzierungen

Diese Startermoleküle werden direkt von der Firma AGOWA synthetisiert.

Name	5' → 3'-Sequenz	Bindungsstelle	Orientierung
GEX-F	5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG -3'	Codierende Region des GST Proteins in pGEX-Vektoren	Sinn
GEX-R	5'-GGA GCT GCA TGT GTC AG -3'	stromabwärts der MCS in pGEX-Vektoren	Gegensinn
CMV-F	5'-CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG-3'	stromaufwärts der MCS in pBluescript	Sinn

Bluescript R	5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'	stromabwärts der MCS in pBluescript	Gegensinn
EGFP-N1-R	5'-ACT TGT GGC CGT TTA CGT C 3'	Codierende Region des eYFP in pGorasp2eYFP	Gegensinn

**Tabelle 2-3:** Startermoleküle für Auftragssequenzierungen. Die Orientierungen beziehen sich auf die kodierende Region in den jeweiligen Vektoren.

### 2.8.3 Klonierungs-und Expressionsvektoren

Name	Eigenschaften	Referenz
pGEX-5X-3	Prokaryotischer Expressionsvektor; erlaubt die Expression eines Fusionsproteins mit GST, Amp-Resistenz	Amersham
pGEX-6P-1	Prokaryotischer Expressionsvektor; erlaubt die Expression eines Fusionsproteins mit GST, Amp-Resistenz	Amersham
pBluescriptII S/K	Klonierungsvektor, erlaubt zudem Expression unter T7 Promotor	Stratagene
pET23a	Optimierter Vektor zur in vitro Translation	Novagen
pCDNA3.1	Zellkulturexpressionsvektor	Invitrogen
pBlast cmv	Zellkulturexpressionsvektor	P.Kussmann

**Tabelle 2-4:** Übersicht der in dieser Arbeit benutzten Klonierungsvektoren.

### 2.8.4 Rekombinante Plasmide

Name	Vektor	Passagier-DNS	Referenz
pBlueGorasp2	pBluescriptII SK	Gorasp2 cDNS	Diese Arbeit
pET23a_Gorasp2	pET23a	Gorasp2 cDNS	Diese Arbeit
pGEX-6P-1-Cx45CL	pGEX-6P-1	Cytoplasmatische Schleife von Cx45, as94-188	Diese Arbeit
pGEX-6P-1-Cx45CT	pGEX-6P-1	C-terminus von Cx45, as252-397	Diese Arbeit
pGEX-6P-1-Cx36CL	pGEX-6P-1	Zytoplasmatische Schleife von Cx36	Urschel et al., 2006

**Material**

pGEX-5X-3-Cx45concoil (CC)	pGEX-6P-1	Teil des C-terminus von Cx45, as252-361	Stephan Maxeiner, Dissertation
pGEX-5X-3-Cx45coil2term (C2T)	pGEX-6P-1	Teil des C-terminus von Cx45, as331-397	Stephan Maxeiner, Dissertation
pBlueMyL4	pBluescriptII SK	MyL4-cDNS	Diese Arbeit
pBlueCrkM	pBluescriptII SK	CrkM-cDNS	Diese Arbeit
pBlueLin7b	pBluescriptII SK	Lin7b-cDNS	Diese Arbeit
pGEX-Cx36CT	pGEX-5X-3	Carboxyterminus von Cx36	Urschel et al., 2006
pGEX-Cx36S110A	pGEX-6P-1	Cytoplasmatische Schleife von Cx36, punktmutiert S110A	Diese Arbeit
pGEX-Cx36S293A	pGEX-5X-3	Carboxyterminus von Cx36, punktmutiert S293A	Diese Arbeit
pGEX-Cx36S306A	pGEX-5X-3	Carboxyterminus von Cx36, punktmutiert S306A	Diese Arbeit
pGEX-Cx36S315A	pGEX-5X-3	Carboxyterminus von Cx36, punktmutiert S315A	Diese Arbeit
pGorasp2eYFP_blasto	pBlast_cmv	Gorasp2-cDNS in Fusion mit eYFP	Diese Arbeit
pGorasp2eYFP_zeo	pCDNA3.1	Gorasp2-cDNS in Fusion mit eYFP	Diese Arbeit
pFLAG_Gorasp2	pCDNA3.1	FLAG in Fusion mit Gorasp2-cDNS	Diese Arbeit
pGorasp2_FLAG	pCDNA3.1	Gorasp2-cDNS in Fusion mit FLAG	Diese Arbeit
pCx45eCFP_puro	PCDNA3.1	Cx45-cDNS in Fusion mit eCFP	S. Sonntag

**Tabelle 2-5:** Übersicht der in dieser Arbeit benötigten verwendeten und hergestellten Plasmide.

## 2.9 Eukaryontische Zelllinien

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
N2A	murine Neuroblastomzelllinie	Mathews et al., 1976
HeLa	Aneuploide, epitheloide Cervixkarzinom Linie aus menschlichem Gewebe	Jones et al., 1971
HeLa-Cx45	HeLa-Linie, die konstitutiv das Protein Cx45 exprimiert	P. Kußmann
HeLa-Cx45eCFP	HeLa-Linie, die konstitutiv das Protein Cx45eCFP exprimiert	S. Sonntag
HeLa-Gorasp2eYFP	HeLa-Linie, die konstitutiv das Protein Gorasp2eYFP exprimiert	Diese Arbeit
RT4-AC	murine Hirnvorläuferzelllinie	Droms et al., 1987
HM1	Embryonale Stammzellen der Maus, gewonnen aus dem Mausstamm Sv129P2/OlaHsd	Magin et al., 1992

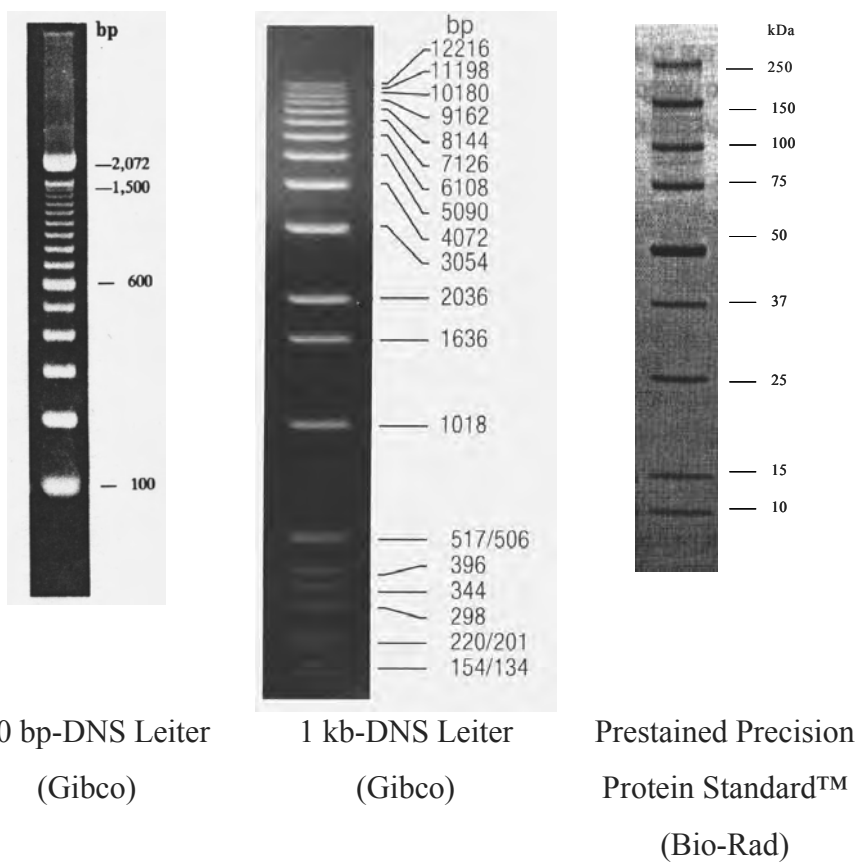
**Tabelle 2-6:** Übersicht der in dieser Arbeit benötigten verwendeten und hergestellten Zelllinien.

## 2.10 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Verwendung/ Eigenschaft	Referenz
XL1-blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, Δ(mcr)A183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, supE44, relA1, lac[F'proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15, Tn10 (Tet <sup>r</sup> 12,5 μg/ml)].	Plasmidvermehrung	Bullock et al., 1987
BL21	B F-, ompT, hsdS (rB-, mB-), gal, dcm.	Expression von GST-Fusionsproteinen	Amersham
ROSETTA (DE3)-pLYS	F' ompT hsdSB (rB- mB-)gal dcm lacY1 (DE3) pLysS(Cm <sup>R</sup> )	Codonoptimierte expression von Fusionsproteinen	Invitrogen

**Tabelle 2-6:** Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

## 2.11 Größenstandards



**Abb. 2.1:** Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Größenstandards für die DNS- und Protein-Analytik.

## 2.12 Allgemeine Labormaterialien

Faltenfilter	Schleicher & Schuell
GSTrap Affinitätssäulen	GE Healthcare
Hybond-C-extra-Nitrozellulosemembran	Amersham
Mikroreaktionsgefäße 0,25 – 2 ml	Sarstedt
Mineral-Öl für PCR	Sigma
Parafilm „M“	American National Can
Permafluor Eindeckelmedium	Beckmann Coulter
Pipettierspitzen	Sarstedt
Röntgenfilme Biomax™/MR	Kodak

Röntgenfilme X-OMAT AR	Kodak
15/50 ml Röhren	Sarstedt
Sterilfilter 0,4 µm und 0,22 µm	Schleicher & Schuell
SuperFrost Objektträger (für Gefrierschnitte)	Menzel-Gläser
Tissue-Tec	Sakura
Whatman 3mm-Papier GB 002	Schleicher & Schuell
Zellkultur-Schalen	Becton Dickinson

### **2.13 Fertige Lösungen und Chemikalien**

(30%, Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung)

Amplify-Lösung	GE Amersham
CHAPS	Sigma
DMSO	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
FCS	Gibco BRL
Glycerin	Sigma
Isopropanol	Merck
Methanol	Riedel-de-Haën
Milchpulver	Sucofin
Nonidet P-40	Serva#
Rotiphorese® Gel 30-Lösung	Roth
Rotiphenol/Chloroform	Roth
SDS, 10%	Fluka
TEMED	Sigma
Triton X-100	Serva
Reduziertes Glutathion	Sigma

### **2.14 Geräte**

Blotting-Chamber Mighty-Small II (Western-Elektroblot)	BIO-RAD
Elektrophoresekammer Mighty Small II,	HOEFER SE250/SE260 mit SE245 (SDS-PAGE)

Elektrophoresekammern Perfect blue™	PeqLab
Feinwaage Kern ABS	Kern&Sohn GmbH
FPLC Äkta	GE Healthcare
Gelfiltrationssäule Sephadex75	GE Amersham
Geltrockner Model 583	Biorad
Heizblock QBT	Grant Instruments
HEROLAB Imager TP1	Herolab
Kolbenhubpipette Pipetman (20; 200; 1000 µl) Gilson	
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf
Kühlzentrifugen Multifuge 3 S-R, 3 L-R	Heraeus
Kühlzentrifuge J2-21 mit Rotor JA10	Beckman
Kryostat HM500 OM	Microm
LSM510Meta	Zeiss
Lyophylle	Seybold
Magnetrührer Combimag RCT	Ika&Kunkel KG
Mikromanipulator	Eppendorf
Mikrowelle MW 800	Continent
PCR-Maschine PTC-200	Biozym
Schüttler Vibrax VXR basic	IKA
Schüttler G25	Heraeus
Schüttler MSI Minishaker	IKA
Spannungsgerät LkB GPS 200/400	Pharmacia
Spannungsgerät Consort E832	Consort
Spektralphotometer DU 640	Beckmann
Ultraschallbad Transonic T460	Elma
Ultraschallspitze Sonifer B-12	Branson
Vakuumpumpe AF 4-8	Leybold-Heraeus
Wasserbad Shake Temp SW22	Julabo
Wasserbad 012T	Lauda
Zentrifuge 5415D	Eppendorf

## 2.15 Antikörper

### 2.15.1 Primärantikörper

Antigen	Herkunft des Antigens	Antikörper-Typ	Herkunft des Antikörpers	Arbeitskonzentration	Bezugsquelle/Referenz
FLAG-Epitop	DYKDDDDK	Monoklonal	Maus	1:2000 im WB, 1:500 in IF	Promega
Cx45	Maus	Monoklonal	Maus	2 µl in IP	Chemikon
Cx45	Maus	Polyklonal	Kaninchen	1:500 in IF	Dedek et al.,2006
Cx36	Maus	Polyklonal	Kaninchen	1:100 in IF	Zymed 51-6300
Cx36	Maus	Polyklonal	Kaninchen	4 µl in IP	Zymed 36-4600
eGFP	<i>A. victoria</i>	Polyklonal	Kaninchen	1:1000 im WB 1:500 in IF	Invitrogen (Molecular Probes)
SM-Aktin	Maus	Monoklonal	Maus	1:250 in IF	Sigma

Tabelle 2-8: Verwendete Primärantikörper (IP: Immunpräzipitation, IF: Immunfluoreszenz, WB: Western Blot)

### 2.15.2 Sekundärantikörper

Herkunft des Antigens	Antigen	Herkunft des Antikörpers	Markierung	Arbeitskonzentration	Bezugsquelle/Referenz
Maus	IgG (H+L)	Ziege	Meerettich-Peroxidase	1:20000	Dianova
Kaninchen	IgG (H+L)	Ziege	Meerettich-Peroxidase	1:20000	Dianova
Kaninchen	IgG (H+L)	Ziege	Alexa488	1:2000	Invitrogen
Maus	IgG (H+L)	Ziege	Alexa594	1:2000	MoBiTec
Kaninchen	IgG (H+L)	Esel	Cy3	1:2000	Dianova

Tabelle 2-9: Verwendete Sekundärantikörper (H+L: Schwere und leichte Kette.)



### **3. Methoden**

#### **3.1 DNS-Präparation**

##### **3.1.1 Präparative Plasmidisolierung (Midipräparation)**

Um größere Mengen Plasmid-DNS (100-200 µg) mit hohem Reinheitsgrad durch Ionenaustausch-Chromatographie nach alkalischer Lyse zu isolieren, wird der Plasmid-Präparationssatz der Firma JETstar verwendet. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben.

##### **3.1.2 Alkalische Plasmidisolierung (Minipräparation)**

Die alkalische Plasmidisolierung wird sowohl für die Gewinnung geringer Mengen von DNS aus 1,5 ml Kultur als auch für die Gewinnung großer Mengen von DNS aus 50 ml Kultur verwendet. Bei diesem Verfahren wird zunächst die Gesamt-DNS alkalisch denaturiert und anschließend die Plasmid-DNS durch Absenkung des pH-Werts renaturiert. Somit lassen sich die gelösten Plasmide durch Zentrifugation von der sedimentierenden genomischen DNS abtrennen.

Das aus 1,5 ml (50 ml) Kultur durch Zentrifugation gewonnene Bakteriensediment wird in 100 µl (1,7 ml) Lösung I resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Dabei werden die Bakterienzellwände zerstört. Durch Zugabe von 200 µl (3,3 ml) der alkalischen Lösung II und 5 minütige Inkubation bei 4 °C wird die Gesamt-DNS denaturiert. Die Plasmid-DNS wird durch die Zugabe von 150 µl (2,5 ml) Lösung III während einer 5 minütigen Inkubation bei 4°C renaturiert und das unlösliche Netzwerk aus genomischer DNS und Zellbestandteilen durch Zentrifugation (6 min, 13.000 rpm) sedimentiert. Der Überstand wird in ein frisches 1,5 ml (50 ml) Gefäß überführt und zur weiteren Präparation verwendet. Die Plasmid-DNS wird durch Zugabe von 500 µl (5 ml) Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation [6 min, 13.000 Upm, Eppendorf Centrifuge 5415D (20 min, 5.850 Upm, 4 °C, Heraeus Multifuge 3 S-R)] sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das DNS Pellet mit 500 µl (5 ml) 70 % (v/v) Ethanol (1 min, 13.000 rpm), gewaschen. Der Überstand wird dekantiert, das Pellet bei RT getrocknet und in 50 µl (200 µl) TE-Puffer aufgenommen.

### **3.1.3 Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen**

DNS-Fragmente verschiedener Länge können mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese größenfraktioniert und aus Agarosegelen isoliert werden. Das gewünschte DNS-Fragment wird mit einem Skalpell unter langwelligem UV-Licht (304 nm) aus dem ethidiumbromid-haltigem Agarosegel ausgeschnitten, da DNS im Bereich ihres Absorptionsmaximums (260 nm) zu stark geschädigt werden würde. Die DNS-Aufreinigung wird bei Fragmenten bis 10 kb mit dem Reagenziensatz der Firma Eppendorf nach Herstellerangaben durchgeführt. Die aufgereinigte DNS ist bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  lagerbar.

### **3.2 RNS-Präparation**

Um den Abbau der RNS durch endogene und exogene RNasen zu vermeiden, müssen besondere Schutzvorkehrungen getroffen werden. So werden vor und während der Präparation alle Geräte, Arbeitsflächen und Handschuhe mit 96 % (v/v) Ethanol gereinigt. Die verwendeten Lösungen werden 1 h autoklaviert, gegebenenfalls mit DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt und die RNS bei allen Arbeitsschritten auf Eis gelagert.

#### **3.2.1 Gewinnung von cDNS aus Embryonen (ED 9.5), sowie adultem Herzgewebe**

Mehrere trächtige Wildtyp C57\BL6 Mäuse wurden zum Zeitpunkt 9.5 ihrer Schwangerschaft durch cervicale Dislokation getötet, die Uteri entnommen und die Embryonen vorsichtig herauspräpariert. Aus der Gesamtheit von 25 so gewonnener Embryonen sowie zweier Herzen erwachsener C57\BL6 Mäuse wurde je unter Benutzung des RothiPhenol-Reagenz (Roth) nach Herstellerangaben die complete RNS extrahiert und unter Benutzung von Oligo-dT Startermolekülen die gesamte polyadenylierte mRNS in cDNS umgeschrieben

#### **3.2.2 Gewinnung von cDNS aus Kulturzellen**

80-100% konfluente Zellen einer 10 cm Kulturschale werden trypsiniert (Abschnitt 3.9.3), in Medium aufgenommen, sedimentiert und der Überstand abgesaugt. Das Sediment ist bis zur Präparation bei  $-70^{\circ}\text{C}$  lagerbar. Die Lysis der Zellen wird durchgeführt, indem die resuspendierten Zellen durch eine Kanüle (18 Gauge) geleitet werden. Anschliessend wird unter Benutzung des RothiPhenol-Reagenz (Roth) nach Herstellerangaben die complete RNS extrahiert und unter Benutzung von Oligo-dT

Startermolekülen die gesamte polyadenylierte mRNA in cDNA umgeschrieben

### **3.3 Gelelektrophorese zur Größenfraktionierung von Nukleinsäuren**

Aufgrund ihres Phosphatesterückgrates sind Nukleinsäuren bei neutralem pH-Wert negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Dies wird bei der Agarose-Gelelektrophorese ausgenutzt, um Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen. Fragmente geringer Größe können viel leichter das feinporige Agarosegel durchdringen als größere Fragmente, die Auftrennung der Nukleinsäuren im Gel ist umgekehrt proportional zu ihrer Masse. Im Agarosegel werden Nukleinsäuren durch interkalierendes Ethidiumbromid detektiert. Ethidiumbromid ist ein aromatischer Fluoreszenzfarbstoff, der bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert. Durch zusätzliches Auftragen eines Größenstandards lässt sich die Größe der aufgetragenen Nukleinsäurefragmente bestimmen.

#### **3.3.1 Native Agarose-Gelelektrophorese**

Dieses Verfahren wird zur analytischen und präparativen Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente verwendet. Die zwischen 1,5 % (Fragmente von 0,15 – 2 kb) und 0,5 % (Fragmente von 0,5 – 20 kb) liegende Agarosekonzentration bestimmt den Größenbereich, in dem die höchste Auflösung erreicht wird.

Abhängig von Probenanzahl und erwünschter Trennstrecke werden kleine (bis zu 11 Proben), mittlere (bis zu 40 Proben) oder große (bis zu 144 Proben) Gelträger ausgewählt. Die Agarose wird im Erlenmeyerkolben abgewogen, die entsprechende Menge Laufpuffer (0,75x TBE) zugegeben und die Lösung so lange in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose komplett gelöst ist. Die auf etwa 50°C abgekühlte gelartige Agarose wird mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von etwa 0,6 µg/µl versetzt und in einen mit Gewebeband abgeklebten, mit Kämmen bestückten Gelträger gegossen. Nach Aushärtung des Gels werden Gewebeband und Kämmen entfernt und das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Kammer gelegt. Die mit 6x DNA-Ladepuffer versetzten Proben werden in die Taschen pipettiert und mit 7–9 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das im Gel enthaltene fluoreszierende Abbild der DNA-Fragmente mit Hilfe des UV-Transilluminator (HEROLAB Imager) dokumentiert.

### **3.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung**

Anhand der Absorption von UV-Licht lassen sich Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren bestimmen. Das Absorptionsmaximum der heterozyklischen Nukleotidbasen liegt bei 260 nm ( $A_{260}$ ) und das der aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm ( $A_{280}$ ).

Im Spektralphotometer (Beckman DU<sup>®</sup>640) wird die Absorption einer Nukleinsäurelösung in einer Quarzküvette 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 für DNS und 40 µg/ml für RNS. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der Lösung und sollte für DNS zwischen 1,8 und 2,0 und bei RNS zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung durch UV-absorbierende Stoffe wie Proteine oder Phenol hin.

## **3.4 Enzymatische Modifikation von DNS**

### **3.4.1 DNS-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen**

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen doppelsträngige, palindromische DNS-Sequenzen zwischen 4 und 8 Basenpaaren und schneiden meist innerhalb dieser Erkennungssequenz. Bei der Spaltung entstehen je nach verwendeter Restriktionsendonuklease glatte Doppelstrangenden oder Einzelstrangenden mit 3'- oder 5'-Überhängen.

### **3.4.2 Vollständige Spaltung von DNS**

Vollständig Spaltungen von Plasmid-DNS werden mit etwa 2 U Restriktionsendonuklease pro µg DNS soweit möglich in einem Restriktionsansatz von 20 µl durchgeführt. Die parallele Spaltung mit mehreren Restriktionsendonukleasen verlangt meist eine Volumenvergrößerung des Ansatzes. Dies ist notwendig, da das eingesetzte Volumen des Enzyms maximal ein Zehntel des Volumens des Restriktionsansatzes betragen darf. Die Spaltung erfolgt für mindestens 1 h, bei großen Mengen an DNS auch üN, bei der angegebenen Arbeitstemperatur des Enzyms. Viele Restriktionsendonukleasen

können gemäß Herstellerangaben hitzeinaktiviert werden.

### 3.4.3 Dephosphorylierung von Vektorenden

Um eine Religation des linearisierten Vektorrückgrats bei der Ligation zu verhindern, werden die freien 5'Phosphatgruppen durch Dephosphorylierung mit einer alkalischen Phosphatase aus Krabben (SAP = shrimp alkaline phosphatase) entfernt. Dazu wird der Restriktionsansatz oder das DNS-Geleluat mit 1,5 µl SAP und 1/10 Vol. 10x Phosphatasepuffer versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Eine zweite 30 minütige Inkubation bei 37 °C mit weiteren 1,5 µl SAP wird mit dem Ansatz durchgeführt. Die SAP wird 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

### 3.4.4 Ligation von DNS-Fragmenten

Mit Hilfe der T4-Ligase lassen sich intra- bzw. intermolekulare Verknüpfungen freier DNS-Enden durchführen. Die Ligation kann zwischen kohäsiven oder glatten DNS-Enden erfolgen. Es werden Vektor- und Passagier-DNS im molaren Verhältnis eins zu drei mit 1 µl T4-DNS-Ligase (NEB) und 1 µl Ligasepuffer (10x) versetzt und der Ansatz auf ein Endvolumen von 10 µl mit A. bidest aufgefüllt. Die Ligationsreaktion erfolgt bei 14°C üN oder bei RT für 1h.

Soweit nicht anders erwähnt werden in dieser Dissertation sowohl Vektor als auch Passagier-DNS über das Gel aufgereinigt eingesetzt und die Vektoren dephosphoryliert.

## 3.5 Bakterienkulturen und Transformation

### 3.5.1 Herstellung kompetenter, einfrierbarer Bakterien

Mit einer Einzelkolonie des erwünschten Bakterienstammes werden 2,5 ml YT<sup>++</sup>-Medium inokuliert und ÜN auf dem Schüttler (225 Upm) bei 37°C inkubiert. 50 µl ÜN-Kultur werden in 5 ml YT<sup>++</sup>-Medium gegeben, 90 min bei 37 °C geschüttelt (225 Upm) und dann als Vorkultur zu 100 ml vorgewärmten YT<sup>++</sup>-Medium gegeben. Die Kultur wird bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,45 bis 0,55 inkubiert, danach auf zwei 50 ml Röhrchen (Falcon) aufgeteilt und 5 min auf Eis abgekühlt. Die Bakterien werden sedimentiert (5.000 Upm, 5 min, 4 °C, Heraeus Multifuge 3 S-R), der Überstand dekantiert und

das Sediment im 4 °C Kühlraum in 10 ml TFB I resuspendiert. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis werden die Bakterien erneut sedimentiert und der Überstand dekantiert. Die Sedimente werden im Kühlraum in je 2 ml TFB II aufgenommen und jeweils 100 µl Bakteriensuspensionen in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Aliquots werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70 °C aufbewahrt.

### 3.5.2 Transformation kompetenter Bakterien mit DNS

Ein Aliquot auf Eis aufgetauter oder frischer kompetenter Bakterien wird auf den Ligationsansatz gegeben und der gesamte Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Zur Transformation wird ein 42°C Hitzeschock für 90 s im Wasserbad durchgeführt und sofort der Ansatz auf Eis abgekühlt. Zum Transformationsansatz werden nun 400 µl LB-0-Medium gegeben und der Ansatz 60 min bei 37°C auf dem Schüttler (225 Upm) inkubiert. Dies ermöglicht die Ausprägung des auf dem Plasmid kodierten Resistenzgens. 100 µl Bakterien werden auf einer LB-Platte mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen. Der restliche Ansatz wird sedimentiert, ein Teil des Überstands dekantiert, das Sediment im Restvolumen resuspendiert und auf einer zweiten Agarplatte mit Antibiotikum ausplattiert. Die Platten werden umgedreht bei 37°C ÜN inkubiert.

### 3.5.3 Anlegen von Glycerinkulturen

850 µl Bakterienkultur werden auf Eis mit 150 µl 87% Glycerin versetzt, vermischt und bei -70 °C eingefroren. Zur Rekultivierung wird etwas gefrorenes Material abgekratzt, auf geeignetem Nährboden ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien sind als Glycerinkultur 1-2 Jahre bei -70°C lagerbar.

### 3.5.4 Induktion einer Bakterienkultur mittels IPTG

1 ml einer 2 ml Übernachtskultur der den gewünschten Vektor enthalten BL21 oder ROSETTA-Kultur wird zu 50-250 ml LB<sub>amp</sub> Medium gegeben und im Schüttler inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 erreicht ist. Die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG, die Endkonzentration in der Kultur beträgt 1 mM IPTG. Die Kultur wird vier Stunden nach der Induktion in ein 50 ml-Sarstedt-Röhrchen dekantiert

und in einer Tischzentrifuge (Hereaus 3S-R) bei 3500 rpm bei 4°C für 15 min sedimentiert. Der Medienüberstand wird sorgfältig entfernt, das Bakterienpellet in 400 µl pro ml Induktionskultur kaltem PBS<sup>-</sup> resuspendiert und abermals wie zuvor sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet wird bei -70°C eingefroren.

Falls eine große Menge Fusionsprotein hergestellt werden muss, verwendet man größere Erlenmeierkolben mit einem Fassungsvermögen von 2 l, hier lassen sich auch bequem Kulturvolumina von jeweils 500 ml kultivieren.

### 3.5.5 Herstellung eines Proteinlysates aus einer Bakterienkultur

Sämtliche folgende Schritte sind bei 4°C oder auf Eis durchzuführen. Die einmal mit PBS<sup>-</sup> gewaschene, sedimentierte, bei -70°C gelagerte Bakterienkultur wird in 400 µl PBS<sup>-</sup> +1xComplete™ pro 1 ml Kulturvolumen aufgenommen und in einer Tischzentrifuge (Hereaus 3S-R) bei 3500 rpm und 4°C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 75 µl Lysispuffer pro 1 ml Kulturvolumen resuspendiert. Es erfolgt eine 30 minütige Inkubation auf Eis, um dem im Lysispuffer enthaltenen Lysozym Zeit zum Wirken zu geben. Nun erfolgt dreimal eine 10 sekündige Behandlung des Lysates mit dem Ultraschallstab (Branson Sonifier), um die bakteriellen Zellwände vollständig zu zerstören und die DNS zu scheren. Zwischen den Ultraschallbehandlungen muss die Probe stets auf Eis abgekühlt werden. Es schließt sich eine weitere 30 minütige Inkubation auf Eis an, um die Lysis zu komplettieren. Die Probe wird anschließend in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Um die lösliche Proteinfraction von der Membranfraction zu trennen, ist eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 4°C bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Sigma 2k15) nötig.

### 3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis und Falona, 1987) ist ein Verfahren zur exponentiellen und selektiven Vervielfältigung von DNS-Fragmenten. Aus einem bekannten DNS-Bereich werden zwei Startermoleküle abgeleitet, die an einer denaturierten, einzelsträngigen Matrizen-DNS in entgegengesetzter Orientierung an die beiden DNS-Stränge binden. Die 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 35-40 fache Wiederholung des Zyklus bestehend aus Denaturierung, Starteranlagerung und DNS-Synthese erfolgt die selektive Vervielfältigung des durch die Startermoleküle flankierten Bereichs. Eine anschließende verlängerte Synthesephase ermöglicht die Verlängerung unvollständig vervielfältigter Stränge. Eine Analyse der amplifizierten DNS-Sequenz kann mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt werden (Abschnitt 3.3.1).

Bei der Etablierung eines PCR-Programms werden  $MgCl_2$ -Konzentration, Starteranlagerungstemperatur, Syntheszeit und Anzahl der Reaktionszyklen optimiert. Gegebenfalls kann es besonders bei hohem GC-Gehalt der Matrizen-DNS notwendig sein, PCR-Verstärker wie Glycerin oder DMSO zu verwenden, welche die Stabilität der Polymerase oder die Löslichkeit der DNS erhöhen.

Bei der Ableitung der Startermoleküle ist darauf zu achten, dass diese mindestens ein Guanin oder Cytosin als 3'-Nukleotid besitzen, keine Sekundärstrukturen ausbilden und nicht miteinander hybridisieren können. Die Schmelztemperatur sollte betragen:

$$T_M[^\circ C] = 69.3^\circ C + 0.41 \times (\text{GC-Gehalt in \%}) - 650 / \text{Startermoleküllänge}$$

Der  $T_M$ -Wert beider Startermoleküle sollte gleich sein.

Die Temperaturen der einzelnen Zyklen werden mittels eines programmierbaren Thermozyklers (Biozym MJ Research PTC-200 oder PTC-100) gesteuert. Bei der PCR-Reaktion wird der Reaktionsansatz wie beschrieben zusammen pipettiert.

### 3.6.1 „Overlap Extension“ PCR

Ein Spezialfall einer PCR kann genutzt werden, um einzelne Punktmutationen in ansonsten bekannte DNS-Sequenzen gezielt einzubringen (Higuchi al., 1988). Hierzu werden vier Oligonukleotidstartermoleküle benötigt, von denen zwei (P1 und P4), vergleichbar der Startermoleküle einer klassischen PCR in gewissen Abstand terminal der zu mutierenden Sequenz gegenläufig binden, und zwei weitere Startermoleküle (P2, P3) die genau an der zu mutierenden Stelle binden, wobei P2 gegenläufig zu P1 und P3 gegenläufig zu P4 sein muss.

P2 und P3 sind so gewählt, dass sie nicht vollständig homolog zu der zu mutierenden Sequenz sind,



sondern vielmehr die gewünschte später mutierte Sequenz tragen. Mit ausreichend langen (>8) Nukleotiden in 5' und 3' Richtung der nicht übereinstimmenden Sequenz kommt es hier unter den richtigen Bedingungen dennoch zu einer korrekten Hybridisierung der Startermolölen mit ihrem Matrize. Wenn man nun in zwei Ansätzen eine PCR mit P1 und P2 respektive P3 und P4 durchführt, erhält man Amplikons, die die gewünschte Mutation jeweils terminal tragen und in diesem Bereich zusätzlich zueinander homolog sind. Wenn diese beiden Amplikons aufgereinigt unter zusätzlicher Zugabe von P1 und P4 zu einer weiteren PCR eingesetzt werden, können die beiden zueinander homologen Bereiche der beiden Moleküle miteinander hybridisieren und zusammen mit P1 und P4 die Matrize für das PCR-Produkt in vollständiger Länge der Sequenz bilden. Dieses so resultierende Amplikon trägt nun die auf diese weise gerichtet eingefügte Mutation und kann weiter verwendet werden.

### 3.6.2 PCR-Reaktionen

#### PCR-Ansatz zur Amplifikation der Gorasp2-cDNS (25 µl):

5 µl	PCR-Puffer (5x)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Schritt</th> <th>Temperatur</th> <th>Zeit</th> <th>Zyklen</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>94°C</td> <td>5 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>94°C</td> <td>1 min</td> <td rowspan="3">} 25</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>55,5°C</td> <td>30 sec</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>72°C</td> <td>1 min</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>72°C</td> <td>10 min</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	1	94°C	5 min	1	2	94°C	1 min	} 25	3	55,5°C	30 sec	4	72°C	1 min	5	72°C	10 min	1
Schritt	Temperatur		Zeit	Zyklen																				
1	94°C		5 min	1																				
2	94°C		1 min	} 25																				
3	55,5°C		30 sec																					
4	72°C		1 min																					
5	72°C		10 min	1																				
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]																							
0,2 µl	G2-for [10 µM]																							
0,2 µl	G2-rev [10 µM]																							
0,2 µl	dNTP's [je 10 mM]																							
1 µl	<i>Phusion</i> -DNS-Polymerase																							
1 µl	DNS (cDNS aus Embryos ED9.5)																							
15,9 µl	A. bidest																							

#### PCR-Ansatz zur Amplifikation der Lin7b-cDNS (25 µl):

5 µl	PCR-Puffer (5x)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Schritt</th> <th>Temperatur</th> <th>Zeit</th> <th>Zyklen</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>94°C</td> <td>5 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>94°C</td> <td>1 min</td> <td rowspan="3">} 25</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>53,5°C</td> <td>30 sec</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>72°C</td> <td>30 sec</td> </tr> <tr> <td></td> <td>72°C</td> <td>10 min</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	1	94°C	5 min	1	2	94°C	1 min	} 25	3	53,5°C	30 sec	4	72°C	30 sec		72°C	10 min	1
Schritt	Temperatur		Zeit	Zyklen																				
1	94°C		5 min	1																				
2	94°C		1 min	} 25																				
3	53,5°C		30 sec																					
4	72°C		30 sec																					
	72°C		10 min	1																				
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]																							
0,2 µl	Lin7-for [10 µM]																							
0,2 µl	Lin7-rev [10 µM]																							
0,2 µl	dNTP's [je 10 mM]																							
1 µl	<i>Phusion</i> -DNS-Polymerase																							
1 µl	DNS (Herz-cDNS)																							
15,9 µl	A. bidest																							

**PCR-Ansatz zur Amplifikation der Creatin Kinase M-cDNS (25 µl):**

5 µl	PCR-Puffer (5x)			
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]			
0,2 µl	CrK-for [10 µM]			
0,2 µl	CrK-rev [10 µM]			
0,2 µl	dNTP's [je 10 mM]			
1 µl	<i>Phusion</i> -DNS-Polymerase			
1 µl	DNS (Herz-cDNS)			
15,9 µl	A. bidest			

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	5 min	1
2	94°C	1 min	} 25
3	58,5°C	30 sec	
4	72°C	1 min	
5	72°C	10 min	1

**PCR-Ansatz zur Amplifikation der My-L4-cDNS (25 µl):**

5 µl	PCR-Puffer (5x)			
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]			
0,2 µl	G2-for [10 µM]			
0,2 µl	G2-rev [10 µM]			
0,2 µl	dNTP's [je 10 mM]			
1 µl	<i>Phusion</i> -DNS-Polymerase			
1 µl	DNS (Herz-cDNS)			
15,9 µl	A. bidest			

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	5 min	1
2	94°C	1 min	} 25
3	64,5°C	40 sec	
4	72°C	30 sec	
5	72°C	10 min	1

**PCR-Ansatz zur Amplifikation der Zytoplasmatischen Schleife von Cx45 (25 µl):**

5 µl	PCR-Puffer (5x)			
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]			
0,2 µl	Cx45CL-for [10 µM]			
0,2 µl	Cx45CL-rev [10 µM]			
0,2 µl	dNTP's [je 10 mM]			
1 µl	<i>Phusion</i> -DNS-Polymerase			
1 µl	DNS (pGEX-5X-3-Cx45CL)			
15,9 µl	A. bidest			

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	5 min	1
2	94°C	1 min	} 25
3	58,5°C	30 sec	
4	72°C	30 sec	
8	72°C	10 min	1

**PCR-Ansatz zur Amplifikation des Carboxyterminus von Cx45 (25 µl):**

5 µl	PCR-Puffer (5x)			
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]			
0,2 µl	Cx45CT-for [10 µM]			
0,2 µl	Cx45CT-rev [10 µM]			
0,2 µl	dNTP's [je 10 mM]			
1 µl	<i>Phusion</i> -DNS-Polymerase			
1 µl	DNS (pGEX-5X-3-Cx45CT)			
15,9 µl	A. bidest			

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	5 min	1
2	94°C	1 min	} 25
3	56,5°C	30 sec	
4	72°C	30 sec	
8	72°C	10 min	1

**PCR-Ansatz zur Amplifikation von der zytoplasmatischen Schleife von Cx36 (25 µl):**

5 µl	PCR-Puffer (5x)			
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]			
0,2 µl	Cx36CL-BamHI-USP [10 µM]			
0,2 µl	Cx36CL-EcoRI-DSP [10 µM]			
0,2 µl	dNTP's [je 10 mM]			
1 µl	<i>Phusion</i> -DNS-Polymerase			
1 µl	DNS (jeweils 1µl der Overlap-Fragmente)			
15,9 µl	A. bidest			

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	5 min	1
2	94°C	1 min	} 25
3	53,5°C	30 sec	
4	72°C	30 sec	
5	72°C	10 min	1

**PCR-Ansatz zur Amplifikation von des Carboxyterminus von Cx36 (25 µl):**

5 µl	PCR-Puffer (5x)			
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]			
0,2 µl	Cx36-SmaI-USP [10 µM]			
0,2 µl	Cx36-NotI-DSP [10 µM]			
0,2 µl	dNTP's [je 10 mM]			
1 µl	<i>Phusion</i> -DNS-Polymerase			
1 µl	DNS (jeweils 1µl der Overlap-Fragmente)			
15,9 µl	A. bidest			

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	5 min	1
2	94°C	1 min	} 25
3	54,5°C	40 sec	
4	72°C	30 sec	
5	72°C	10 min	1

**Overlap Extension- PCR zur Erzeugung von der S110A Cx36-Punktmutante (25 µl):**

5 µl	PCR-Puffer (5x)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Schritt</th> <th>Temperatur</th> <th>Zeit</th> <th>Zyklen</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>94°C</td> <td>5 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>94°C</td> <td>1 min</td> <td rowspan="3">} 25</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>53,5°C</td> <td>40 sec</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>72°C</td> <td>1 min</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>72°C</td> <td>10 min</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	1	94°C	5 min	1	2	94°C	1 min	} 25	3	53,5°C	40 sec	4	72°C	1 min	5	72°C	10 min	1
Schritt	Temperatur		Zeit	Zyklen																				
1	94°C		5 min	1																				
2	94°C		1 min	} 25																				
3	53,5°C		40 sec																					
4	72°C		1 min																					
5	72°C		10 min	1																				
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]																							
0,2 µl	Cx36CT-BamHI-USP bzw. Cx36																							
	S110A-USP [10 µM]																							
0,2 µl	Cx36S110A-DSP bzw. Cx36CT-																							
	EcoRI-DSP [10 µM]																							
0,2 µl	dNTP's [je 10 mM]																							
1 µl	<i>Phusion</i> -DNS-Polymerase																							
1 µl	pmCx36																							
15,9 µl	A. bidest																							

**Overlap Extension-PCR zur Erzeugung von carboxyterminalen Cx36-Punktmutanten (25 µl):**

5 µl	PCR-Puffer (5x)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Schritt</th> <th>Temperatur</th> <th>Zeit</th> <th>Zyklen</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>94°C</td> <td>5 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>94°C</td> <td>1 min</td> <td rowspan="3">} 25</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>53,5°C</td> <td>40 sec</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>72°C</td> <td>1 min</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>72°C</td> <td>10 min</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	1	94°C	5 min	1	2	94°C	1 min	} 25	3	53,5°C	40 sec	4	72°C	1 min	5	72°C	10 min	1
Schritt	Temperatur		Zeit	Zyklen																				
1	94°C		5 min	1																				
2	94°C		1 min	} 25																				
3	53,5°C		40 sec																					
4	72°C		1 min																					
5	72°C		10 min	1																				
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]																							
0,2 µl	Cx36CT-SmaI-USP bzw. Cx36																							
	S"x"A-USP [10 µM]																							
0,2 µl	Cx36S"x"A-DSP bzw. Cx36CT-																							
	NotI-DSP [10 µM]																							
0,2 µl	dNTP's [je 10 mM]																							
1 µl	<i>Phusion</i> -DNS-Polymerase																							
1 µl	pmCx36																							
15,9 µl	A. bidest																							

**Anmerkung:** Die PCR- Programme sind hier identisch für die Erzeugung der Cx36-S292A, S306A und S315A Punktmutanten also wurde in dieser Tabelle die Aminosäureposition mit „x“ abgekürzt.

**PCR-Ansatz zur Amplifikation des N-terminal FLAG markierten Gorasp2 (25 µl):**

5 µl	PCR-Puffer (5x)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Schritt</th> <th>Temperatur</th> <th>Zeit</th> <th>Zyklen</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>94°C</td> <td>5 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>94°C</td> <td>1 min</td> <td rowspan="3">} 25</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>55,5°C</td> <td>30 sec</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>72°C</td> <td>45 sec</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>72°C</td> <td>10 min</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	1	94°C	5 min	1	2	94°C	1 min	} 25	3	55,5°C	30 sec	4	72°C	45 sec	5	72°C	10 min	1
Schritt	Temperatur		Zeit	Zyklen																				
1	94°C		5 min	1																				
2	94°C		1 min	} 25																				
3	55,5°C		30 sec																					
4	72°C		45 sec																					
5	72°C		10 min	1																				
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]																							
0,2 µl	Cx45CT-BamHI-for [10 µM]																							
0,2 µl	Cx45CT-EcoRI-rev [10 µM]																							
0,2 µl	dNTP's [je 10 mM]																							
1 µl	<i>Phusion</i> -DNS-Polymerase																							
1 µl	DNS (cDNS)																							
15,9 µl	A. bidest																							

**PCR-Ansatz zur Amplifikation des C-terminal FLAG markierten Gorasp2 (25 µl):**

5 µl	PCR-Puffer (5x)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Schritt</th> <th>Temperatur</th> <th>Zeit</th> <th>Zyklen</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>94°C</td> <td>5 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>94°C</td> <td>1 min</td> <td rowspan="3">} 25</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>55,5°C</td> <td>30 sec</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>72°C</td> <td>45sec</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>72°C</td> <td>10 min</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	1	94°C	5 min	1	2	94°C	1 min	} 25	3	55,5°C	30 sec	4	72°C	45sec	5	72°C	10 min	1
Schritt	Temperatur		Zeit	Zyklen																				
1	94°C		5 min	1																				
2	94°C		1 min	} 25																				
3	55,5°C		30 sec																					
4	72°C		45sec																					
5	72°C		10 min	1																				
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]																							
0,2 µl	Cx45CT-BamHI-for [10 µM]																							
0,2 µl	Cx45CT-EcoRI-rev [10 µM]																							
0,2 µl	dNTP's [je 10 mM]																							
1 µl	<i>Phusion</i> -DNS-Polymerase																							
1 µl	DNS (cDNS)																							
15,9 µl	A. bidest																							

**PCR-Ansatz zur Amplifikation des C-terminal eYFP markierten Gorasp2 (25 µl):**

5 µl	PCR-Puffer (5x)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Schritt</th> <th>Temperatur</th> <th>Zeit</th> <th>Zyklen</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>94°C</td> <td>5 min</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>94°C</td> <td>1 min</td> <td rowspan="3">} 25</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>55,5°C</td> <td>30 sec</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>72°C</td> <td>45 sec</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>72°C</td> <td>10 min</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	1	94°C	5 min	1	2	94°C	1 min	} 25	3	55,5°C	30 sec	4	72°C	45 sec	5	72°C	10 min	1
Schritt	Temperatur		Zeit	Zyklen																				
1	94°C		5 min	1																				
2	94°C		1 min	} 25																				
3	55,5°C		30 sec																					
4	72°C		45 sec																					
5	72°C		10 min	1																				
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]																							
0,2 µl	G2-BamHI-for [10 µM]																							
0,2 µl	G2-YFP-rev [10 µM]																							
0,2 µl	dNTP's [je 10 mM]																							
1 µl	<i>Phusion</i> -DNS-Polymerase																							
1 µl	DNS (pblueGorasp2)																							
15,9 µl	A. bidest																							

### 3.7 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen werden als Auftragssequenzierungen bei der Firma AGOWA durchgeführt. Die DNS wird hierzu in ddH<sub>2</sub>O gelöst versandt.

### 3.8 Reverse Transkription

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann von einer RNS-Matrize eine cDNS hergestellt werden. Man benutzt als Startermolekül entweder Oligo-dT-Startermoleküle, um unspezifisch alle vorhandenen polyadenylierten mRNA-Moleküle in cDNS umzuschreiben, oder aber ein spezifisches Startermolekül, welches die Transkription nur einer mRNA zur Folge hat.

Die folgenden Arbeiten werden auf Eis durchgeführt. 2 µg aus den Zellen extrahierte mRNA werden mit DEPC-Wasser auf 11 µl aufgefüllt. Anschließend wird 1 µl Oligo-dT-Startermolekül hinzugefügt. Die Anlagerungsphase der Startermoleküle an die mRNA findet im Heizblock statt, bei 70°C beginnend lässt man den Heizblock im Laufe von zehn Minuten auf 66°C abkühlen. Im Anschluss wird der Reaktionsansatz hinzugegeben und die Probe für 50 min im Wasserbad bei 42°C inkubiert. Die reverse Transkription wird schließlich durch Denaturierung des Enzyms für 50 min bei 70°C abgestoppt. Die cDNS kann bei -20°C gelagert werden.

Startermolekül:	-oligo-dT-Startermoleküle	1 µl
Reaktionsansatz:	-5x First-Strand Puffer	4 µl
	-dNTPs (je10mM)	1 µl
	-0,1 M DTT	2 µl
	-RNAsin (Ribonukleaseinhibitor)	1 µl
	-Reverse Transkriptase 200U/µl	1 µl
	(Superscrip II, Invitrogen)	

### 3.9 Zellkulturtechniken

Alle Arbeiten zur Kultivierung der Zellen werden in Sterilbänken mit Laminar-Luftstrom (BDK) unter

sterilen Bedingungen durchgeführt. HM1-Zellen werden in Heraeus-Inkubatoren in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C gehalten.

### **3.9.1 Kultivierung von HM 1-Zellen**

Bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % werden HM1-Zellen in Glasgow-MEM in gelatinisierten Plastikgefäßen kultiviert. Ein Mediumwechsel oder Passagieren der Zellen ist alle 1-2 Tage erforderlich.

### **3.9.2 Beschichtung von Kulturgefäßen mit Gelatine**

Der Boden der Kulturgefäße wurde mit kalter 0,1% (w/v) Gelatinelösung bedeckt. Nach 15-30 min wurde die Gelatine möglichst vollständig abgesaugt und die Zellen ausplattiert.

### **3.9.3 Passagieren von HM-1-Zellen**

HM-1-Zellen werden bei einer Konfluenz von etwa 90 % im Verhältnis 1:3 aufgeteilt. Das Medium wird abgesaugt, die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und 1/10 des Kulturmediums an Trypsin-Lösung zugegeben. Durch Inkubation von 5 min bei 37°C und anschließendes leichtes Klopfen der Kulturschale lösen sich die Zellen ab. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wird das Trypsin inaktiviert, die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, durch auf- und abpipettieren vereinzelt und in der entsprechenden Verdünnung neu ausplattiert. Ist ein Aufteilen der Zellen aufgrund einer zu geringen Konfluenz nach 1-2 Tagen nicht notwendig, so werden die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

### **3.9.4 Kultivierung von HeLa, N2A sowie RT4AC-Zellen**

Bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 10 % werden HeLa, N2a oder RT4AC-Zellen in D10-Medium in nicht-gelatinisierten Plastikgefäßen kultiviert. Ein Mediumwechsel oder Passagieren der Zellen ist alle 3-4 Tage erforderlich.

### **3.9.5 Passagieren von HeLa, N2A sowie RT4AC-Zellen**

HeLa-Zellen werden bei einer Konfluenz von etwa 90 % im Verhältnis 1:2 oder geringer aufgeteilt. Das Medium wird abgesaugt, die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und 1/10 des Kulturvolumens an Trypsin-Lösung zugegeben. Durch Inkubation von 2-5 min bei 37 °C und anschließendes heftiges Klopfen der Kulturschale lösen sich die Zellen ab. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wird das Trypsin inaktiviert, die Zellen werden durch auf- und abpipettieren vereinzelt und in der entsprechenden Verdünnung neu ausplattiert. Ist ein Aufteilen der Zellen aufgrund einer zu geringen Konfluenz nach 3-4 Tagen nicht notwendig, so werden die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

### **3.9.6 Lipofektion von Zelllinien in Kultur mit Nukleinsäuren**

Die Transfektion von Zelllinien in Kultur per Lipofektion wird mittels des Reagenz Lipofectamin2000<sup>TM</sup> nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **3.9.7 Stabile Transfektion von HeLa Zellen mit dem Plasmid pGorasp2eYFP\_blasto**

Es wurden zwei 10 cm Schalen HeLa WT Zellen transfiziert, und einem (500 µg/mg) Blastocidin-Selektionsdruck ausgesetzt, der ein Wachstum der Klone begünstigt, die die für eine Blastocidin-Resistenz codierenden Kassette des Vektors pGorasp2eYFP\_blasto stabil in ihr Genom integriert haben. Nach wenigen Tagen wurden von den heranwachsenden Klonen 120 Klone gepickt und herangezogen, in geeigneten Zellkulturschalen angezogen und im Stadium der 12Well Konfluenz unter einem inversen Fluoreszenzmikroskop analysiert. eYFP Fluoreszenz positive Klone wurden weiter hochgesetzt und in 6 cm Schalen unter dem Laser Scanning Mikroskop (LSM510 meta) auf Leuchtkraft und Homogenität der eYFP Fluoreszenz überprüft.

### **3.9.8 Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen**

Zum Einfrieren werden HM1-, N2A-, RT4AC-, und HeLa-Zellen einer konfluent bewachsenen 10 cm Schale trypsiniert, sedimentiert (10 min, 800 rpm, RT, GPKR, BECKMAN) und in 1,8 ml geeignetem Medium resuspendiert. Jeweils 900 µl werden in Einfrierampullen (NUNC) mit 100 µl vorgelegtem DMSO pipettiert, vermischt und sofort auf Eis gestellt. Die Zellen werden für 1 h bei -20°C,



mindestens ÜN bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert und dann zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Eine Einfrierampulle wird bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut, ihr Inhalt in ein 15 ml Röhrchen mit 9 ml vorgelegtem Medium überführt und die Zellen sedimentiert (5 min, 800 Upm, RT, GPKR, BECKMAN). Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in einer Zellkulturschale mit der entsprechenden Fläche ausgesät.

### 3.10 Proteinanalytik

#### 3.10.1 Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten erfolgt mit Hilfe des Reagenziensatzes Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Sigma). Das Prinzip beruht auf der Fähigkeit von Proteinen, Kupfersulfat zu reduzieren. Indem die Bicinchoninic Acid (BCA) das reduzierte Kupfer komplexiert, bildet sich ein violetter Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Die photometrische Absorption bei 562 nm ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. Der Abgleich mit einer Eichkurve mit Proben bekannter Proteinkonzentration erfolgt gemäß den Herstellerangaben mit Hilfe des Spectralphotometers (Beckmann).

#### 3.10.2 Metabolische Markierung von kultivierter Retina

Die Augen von 6-8 Wochen alten weiblichen Mäusen werden nach Tötung der Tiere mittels cervicaler Dislokation entnommen und unter einem Binokular (Leica) in PBS<sup>-</sup> seziiert. Hierzu werden zum besseren Erhaltung der Retina Pinzetten und Mikroscheren der Firma FST (Fine Science Tools) verwendet. Die so gewonnenen intakten Retinae werden mit der Photorezeptorschicht nach unten auf Millicell-CM Membraneinsätzen ausgebreitet und in einer 35 mm Zellkulturschale mit 1 ml DMEM M<sup>-</sup> respektive DEMEM P<sup>-</sup> (CCPro) Medium für 7 h Stunden kultiviert ( $37^{\circ}\text{C}$ , 10%  $\text{CO}_2$ ). Nach der Zugabe von 200  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{35}\text{S}$ -Methionin bzw. 300  $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat zum Medium erfolgt die Markierung für 4 h unter ständigem Schwenken auf einer Wippe im Brutschrank ( $37^{\circ}\text{C}$ , 10%  $\text{CO}_2$ ). In einigen Experimenten erfolgte die Zugabe von 1 mM membrandurchlässiges cAMP (db-cAMP, Sigma) in den letzten 20 min der Kultivierung. Im Anschluss an die Markierung wurden die Retinae dreimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und einer RIPA-Lyse unterzogen. Das auf diese Weise markierte Lysat kann wurde bei  $-20^{\circ}$

C (radioaktive Proben) oder  $-70^{\circ}\text{C}$  (nicht radioaktive Proben) gelagert.

### **3.10.3 Herstellung eines Proteinlysats aus Retina**

Vor der Lysis wurden die Retinae zweimal mit PBS<sup>-</sup> ( $4^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen und anschliessend in einer geeigneten Menge RIPA-Lysispuffer aufgenommen. Nach kurzer Inkubation auf Eis (10 min), werden die Retinae vorsichtig für dreimal 10 sec sonifiziert (Branson Sonifier) und anschliessend wieder für 30 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wird anschließend für 60 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  (13000 Upm, Sigma 2K15) zentrifugiert, der Überstand in ein neues Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  (radioaktive Proben) oder  $-70^{\circ}\text{C}$  (nicht radioaktive Proben) gelagert.

### **3.10.4 Herstellung eines Proteinlysates aus Säugerzellen in Kultur**

Vor der Lysis wurden die Zellen zweimal mit PBS<sup>-</sup> (RT) gewaschen, auf Eis gestellt und nochmals mit PBS<sup>-</sup> ( $4^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurden die Zellen sorgfältig trockengesaugt und pro einer 10 cm-Schale 300  $\mu\text{l}$  TX-100 Lysispuffer oder ddH<sub>2</sub>O auf den Zellrasen gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit Hilfe eines Gummischabers in ein 1,5 ml Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt. Nun kann im Falle von einer Zellsuspension in ddH<sub>2</sub>O doppelt konzentrierter RIPA-Lysispuffer hinzugegeben werden. Dieser Ansatz wird weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert, während dieser Zeit alle 5 Minuten mit dem Strudelmischer sorgfältig gemischt und ggf. vorsichtig für 10 sec sonifiziert (Branson Sonifier). Das Gemisch wird anschließend für 60 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  (13000 Upm, Sigma 2K15) zentrifugiert, der Überstand in ein neues Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  (radioaktive Proben) oder  $-70^{\circ}\text{C}$  (nicht radioaktive Proben) gelagert.

### **3.10.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Wie DNS-Fragmente können auch SDS-haltige Proteingemische in einer Gelmatrix durch das Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Dabei ist die elektrophoretische Beweglichkeit eines Proteins im Gel abhängig von seiner molekularen Masse. In Kombination mit einem Immunoblot lassen sich so Proteingemische auf das Vorhandensein eines bestimmten Proteins untersuchen.

Proteine sind im Gegensatz zu doppelsträngigen DNS-Molekülen durch verschiedene Parameter

gekennzeichnet: Sie unterscheiden sich nicht nur in ihrer molekularen Masse, sondern auch in ihrer pH-Wert-abhängigen Nettoladung und in ihrer Konformation. Durch Behandlung mit dem anionischen Detergenz SDS (engl. „Sodium Dodecyl Sulfate“), das an hydrophobe Bereiche eines Proteins bindet, erhält der SDS-Protein-Komplex jedoch eine hohe negative Gesamtladung und eine weitgehend denaturierte, stäbchenförmige Gestalt. Inter- und intramolekulare Disulfidbrücken, die eine vollständige Entfaltung eines Proteins verhindern würden, werden durch die Zugabe von Reduktionsmittel, z.B.  $\beta$ -Mercaptoethanol, reduziert. Da pro Masseneinheit Protein eine konstante Menge SDS adsorbiert wird, sind Ladung und Länge eines Proteins proportional zu seiner molekularen Masse. Die Gelmatrix, deren Porengröße sich aus der Konzentration des zugesetzten Acrylamid und dem Quervernetzer Bisacrylamid ergibt, hält große Moleküle stärker zurück als kleine. Somit ist die elektrophoretische Beweglichkeit eines SDS-Protein-Komplexes in einer Gelmatrix auf die Anode zu indirekt proportional zum Logarithmus seiner molekularen Masse.

Die Auftrennung relativ großvolumiger Proteingemische bedarf einer Fokussierung in scharfen Zonen. Dies wird mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Laemmli, 1970) erreicht. Die verwendete Gelmatrix setzt sich aus Sammel- und Trenngel zusammen, die sich in ihrer Porengröße und in den pH-Werten der Gelpuffer unterscheiden. Im großporigen Sammelgel (pH 6,8) ordnen sich die SDS-Protein-Komplexe zwischen den vorauslaufenden Chloridionen (Leitonen) und den Glyzin-Molekülen (Folgeionen) an, die bei diesem pH überwiegend als Zwitterionen mit einer Nettoladung von Null vorliegen. Beim Eintritt in das kleinporige Trenngel (pH 8,8) werden die Proteinproben nochmals stärker zu einer scharfen Bande gestaucht. Glyzin erhält eine negative Gesamtladung und überholt die SDS-Protein-Komplexe, wodurch der Sammeleffekt aufgehoben wird. Die SDS-Protein-Komplexe trennen sich nun nach ihrer aus der molekularen Masse resultierenden Größe auf und können nach der Elektrophorese im Gel durch verschiedene Färbemethoden sichtbar gemacht.

### 3.10.6 Durchführung der SDS-PAGE

Es werden Gelgieß-Vorrichtungen der Firma HOEFER verwendet. Zunächst wird das Trenngel mit einem Polyacrylamid-Gehalt von 12% und einer Dicke von 1,5 mm (siehe Tabelle 3.3) bis 1 cm unterhalb der Auftragetaschen gegossen und mit 0,1 % SDS-Lösung überschichtet. Nach der

Polymerisierung des Trenngels wird die SDS-Lösung entfernt, der Auftragekamm eingesetzt und das Sammelgel (siehe Tabelle 3.3) gegossen. Die fertig polymerisierten Gele werden in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Pufferkammern mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt. Parallel zu den in SDS-Probenpuffer aufgenommenen Proteinlysaten wird ein Molekulargewichtsstandard auf das Gel aufgetragen. Die unter Wasserkühlung durchgeführte Elektrophorese erfolgt bei 20 mA pro Gel, solange sich die Proben im Sammelgel befinden. Sobald sie das Trenngel erreicht haben, wird auf eine Stromstärke von 25 mA pro Gel erhöht. Die Elektrophorese ist beendet, wenn die Bromphenolblau-Lauffront sich der untersten Kante des Gels nähert. Gele mit <sup>35</sup>S-Methionin markierten Proben (siehe 3.9.7) werden zunächst in Fixierlösung (siehe 2.1) fixiert (RT, 20 min), mit Amplify-Lösung (Amersham) inkubiert (RT, 15 min) und dann unter Vakuum getrocknet (80 °C, 1 h, Biorad, Gelrockner). Die Autoradiographie der getrockneten Gele erfolgt in einer Filmkassette mit dem Röntgenfilm BIOMAX™/MR (Kodak,USA) (70 °C, verschiedene Expositionszeiten).

<b>Zusammensetzung</b>	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel 12 %</b>
Lösung A (30 %)	2ml	12 ml
Lösung B (pH 8,8)	-	7,5 ml
Lösung D (pH 6,8)	3,75ml	-
A. bidest	9 ml	10,5 ml
APS (10 %)	90 µl	180 µl
TEMED	20 µl	18 µl

**Tabelle 3.3:** Zusammensetzung von zwei 1,5 mm dicken Gelen für die diskontinuierliche SDS-PAGE

### 3.10.7 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit CoomassieBrilliantBlue™

Das Polyacrylamidgel wird in CoomassieBrilliantBlue™-Lösung (RT, 30 min bis 1 h, Wippe) und danach in Coomassie-Entfärbe-Lösung (RT, üN, Wippe) inkubiert, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Die Nachweisgrenze der Proteine liegt bei etwa 50 ng pro Bande. Anschließend wird das Gel in Klarsichtfolie eingeschweißt und zur Dokumentation fotografiert. Alternativ wird es zur längerfristigen Aufbewahrung auf dem Gelrockner (Biorad) bei 80°C für 1 h vakuumgetrocknet.

### 3.10.8 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Kaliumchlorid

Das Polyacrylamidgel wird in 100 mM Kaliumchloridlösung bei 4°C geschwenkt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Dies hat als Färbemethode, auch wenn nicht so sensitiv wie

CoomassieBrilliantBlue™, den Vorteil daß sich die Proteinbanden reversibel weisslich anfärben, während der Hintergrund unter diesen Umständen nicht oder auch erst später gefärbt wird meist klar bleibt. Nach Ausschneiden der Banden aus dem Gel zum Zweck der anschliessenden Elektroelution ist zusätzlich eine Entfärbung nicht nötig, da sowohl Kalium- als auch Chlorid-Ionen im Zuge der Elektroelution verloren gehen

### **3.10.9 Vorbereitung einer zu untersuchenden Proteinbande für das MS/MS**

Eine durch die Massenspektroskopie zu untersuchende, durch inverse Zink-Färbung (durchgeführt nach Herstellerangaben, GelCode E-Zink Reversible Stain Kit; Pierce), proteinhaltige Bande im SDS-PAGE-Gel wird auf einem Leuchttisch mit Hilfe eines sauberen Skalpells möglichst eng ausgeschnitten, um Kontaminationen und Sensitivitätsverluste durch Gelhintergrund oder schwache, nicht sichtbare Banden zu vermeiden. Die ausgeschnittene Bande wird in 1 mm große Gelwürfel unterteilt und in ein Schraubdeckelreaktionsgefäß mit 100 µl ddH<sub>2</sub>O überführt. Die Probe ist lichtgeschützt bei 4°C lagerbar.

### **3.11 Vorbereitung einer zu untersuchenden Proteinprobe für das MS/MS (MudPIT)**

Eine komplexe Pulldown-Probe, welche aus einem Gewebelysat gewonnen wurde, kann auch ohne Analyse auf einem SDS-Gel mit anschliessender Silberfärbung analysiert werden. Dies ist um so bedeutsamer, wenn der Hintergrund des fraglichen Experiments relativ hoch ist und im Gel eine spezifische Bande schwer ausgemacht werden kann. Hierzu macht man sich die MudPIT-Technologie zunutze, die bisweilen zu einer breiten Analyse von komplexen Proteomen eingesetzt wird.

### **3.12 Durchführung einer Gelfiltration mittels Äkta-FPLC**

Zum Zwecke der Aufreinigung eines Proteins aus einem Gemisch von kontaminierenden Proteinen unterschiedlicher Größe kann man sich das Prinzip der Gelfiltration zu Nutze machen, das auf der Trennung von verschiedenen grossen Molekülen durch eine aus porösen Kügelchen, hier Sepharose, bestehenden Säule besteht. Hierbei wandern größere Moleküle um diese Kügelchen herum, während die kleineren Moleküle den Weg durch die Poren nehmen müssen und so eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen.

In dieser Arbeit benutzt wurde eine Sephadex200 Säule mit einem Volumen von 200 ml genutzt. Nach ordnungsgemäßem luftblasenfreiem Einbau der in 20%igen Ethanol gelagerten Säule in die FPLC-Anlage wurde diese mit dem mindestens fünffachen Säulenvolumen an PBS bei einer Geschwindigkeit von 2 ml/min gewaschen. Anschliessend wird die Ventileinstellung auf „inject“ gestellt und 500 µl der Proteinprobe in die Probenschleife injiziert. Daraufhin wird die Ventileinstellung zurück auf „sampling“ gestellt und die Flußgeschwindigkeit auf 0,5 ml/min gestellt. Der Probensammler wird zugeschaltet und 500 µl Proben werden zur späteren Analyse gesammelt. Über Verfolgung der UV-Kurve, die einen Aufschluss auf die momentane die Säule verlassende Proteinmengen gibt stellt man sicher, dass alle Proteinspezies, die zur Gelfiltration eingesetzt wurden, zur späteren Analyse im Fraktionssammler gesammelt wurden. Dieser wird nun abgeschaltet und die Säule zur Reinigung bei 2 ml/min mit mindestens dem fünffachen Säulenvolumen PBS, auf jeden Fall aber bis zum Erreichen der UV-Nulllinie gewaschen. Nach der Reinigung der Säule wird diese mit mindestens dem zweifachen Säulenvolumen 20%igem Ethanol gewaschen, woraufhin sie bei 4°C aufrecht stehend bis zur nächsten Benutzung gelagert werden kann.

### **3.13 Immunoblot**

Der Immunoblot ermöglicht den empfindlichen Nachweis eines durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteins mit Hilfe von Antikörpern, die das gesuchte Protein spezifisch erkennen. Dazu wird der größte Teil der Proteinbanden nach der SDS-PAGE durch Anlegen eines elektrisches Feldes aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (Sambrook et al., 1989), welche die Proteine sehr fest bindet. Diese Membran wird nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit einer Antikörper-Lösung inkubiert und die gebundenen Antikörper durch Inkubation mit einem sekundären, gegen den primären Antikörper gerichteten Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender ECL-Reaktion sichtbar gemacht.

### **3.14 Elektrobplot und Nachweis der sekundären Antikörper mittels Chemilumineszenz (ECL-Reaktion)**

Verwendet wird die Elektrobplot-Vorrichtung der Firma Bio-Rad, München. Das SDS-Polyacrylamid-Gel wird nach der Elektrophorese in Transferpuffer äquilibriert. Es wird ein „Sandwich“ aus folgenden,

ebenfalls mit Transferpuffer durchnässten Komponenten aufgebaut: Schaumstofflappen, eine Lage 3MM-Papier, Gel, eine in ihrer Orientierung markierte Hybond-ECL-Membran, eine weitere Lage 3MM-Papier, ein zweiter Schaumstofflappen. Dieser „Sandwich“ wird mit Hilfe zweier gelöcherter Plastikplatten zusammengepresst und in die mit Transferpuffer gefüllte Elektroblokkammer gesetzt. Dabei ist die Nitrozellulosemembran zur Anode orientiert. Der Proteintransfer erfolgt in Gegenwart eines gefrorenen Kühlelements und Magnetührstäbchens bei einer Spannung von 100 V auf einem Magnetührer im Kühlraum (4°C, 2 h). Danach wird das Polyacrylamid-Gel angefärbt (siehe 3.10.4) und die Membran entweder direkt oder zunächst zwischen 3MM-Papier getrocknet und dann vor Weiterbehandlung 5 min in A. bidest rehydratisiert für den immunologischen Nachweis eingesetzt. Dazu wird sie in einer Wanne mit Blockierungslösung vorinkubiert (RT, 1h, Wippe) und anschließend zusammen mit den Primärantikörpern, entsprechend verdünnt in 1x Blockierungslösung, in Folie eingeschweißt. Die Inkubation der Membran in der Antikörper-Lösung erfolgt drehend bei 4 °C üN. Am folgenden Tag wird die Membran zur Entfernung von nicht gebundenen Antikörpern dreimal mit TBS-T (RT, jeweils 15 min, Wippe) gewaschen. Die Membranen werden in einem verschließbaren Gefäß mit dem entsprechenden 2. Antikörper (Verdünnung 1:20000) in 10 ml Blockierungslösung versetzt und auf einer Wippe inkubiert (RT, 2 h). Unspezifisch gebundene Antikörper werden anschließend durch dreimaliges Waschen mit TBS-T und einmaliges Waschen mit ddH<sub>2</sub>O (RT, jeweils 15 min, Wippe) entfernt.

Durch tupfen mit 3MM-Papier wird das überschüssige Wasser entfernt und die Membran in einer Wanne luftblasenfrei mit je einem ml der beiden ECL-Reagenzien versetzt, wobei die Proteinseite der Membran nach unten zeigt. Die Inkubationsdauer beträgt 5 min auf der Wippe. Nach einem kurzen Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit auf 3MM-Papier wird die Membran in Folie in eine Filmkassette gelegt und in der Dunkelkammer ein XAR5-Film (Kodak) 60 sec exponiert. Nach Entwicklung des Films wird je nach Signalstärke gegebenenfalls die Expositionsdauer variiert.

### **3.15 GST-Pulldown-Test zur Vermessung mit MudPIT**

Ein GST-Pulldown ermöglicht Feststellung einer Protein-Protein-Wechselwirkung unter nativen Bedingungen. Hierzu muss man das Köderpeptid, hier Teile des Connexin45-Proteins, dessen Interaktionspartner untersucht werden sollen, in Bakterien als GST-Fusionsprotein exprimieren. Der

GST-Anteil des Fusionsprotein ist in der Lage, mit hoher Spezifität an immobilisiertes Glutathion (Pierce) zu binden. Das Glutathion ist über einen zwölf-Atom-Abstandhalter an Agarosekügelchen gebunden, welche sich in einer Tischzentrifuge sedimentieren lassen. Sämtliche Arbeiten werden auf Eis bei 4°C durchgeführt.

### **3.15.1 Äquilibrieren der Glutathion-Agarose-Matrix**

Nach gründlichem Schütteln werden 30 µl der wässrigen Masse der Agarosekügelchen entnommen und wie vorbereitet in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben. Nach Durchmischung beträgt der Anteil der Agarosekügelchen 50%, so dass man ein Gelbettvolumen von 15µl vorliegen hat. Zur Entfernung des 0,05%igen Natriumazids, welches Bestandteil der Lagerungslösung der Agarosekügelchen ist, wird die Gelmatrix dreimal mit 400 µl PBS<sup>-</sup> gewaschen. Hierzu wird das Gelbett durch Zugabe von PBS<sup>-</sup> aufgewirbelt und anschließend in einer Tischzentrifuge (Sigma 2k15) bei 4°C und 5000 rpm für zwei Minuten sedimentiert. Der Überstand wird vorsichtig ohne Verlust von Agarosekügelchen abgenommen.

### **3.15.2 Blockierung der Agarosematrix**

Zur Herabsetzung der unspezifischen Wechselwirkungen werden die proteinbindenden Stellen der Agarosematrix zunächst abgesättigt. Dies geschieht durch Inkubation der Gelmatrix in 2% BSA und 2% Fischgelatine in 400 µl PBS<sup>-</sup> auf dem Sonnenrad bei 4°C für 30 min. Gegebenenfalls wird die so blockierte Agarosematrix viermal mit PBS<sup>-</sup> bzw. dem für die darauffolgenden Experimente geeigneten Puffer gewaschen, um überschüssiges Blockierungsreagenz zu entfernen.

### **3.15.3 Immobilisieren von GST- Fusionsprotein**

Zur equilibrierten und abgesättigten Gelmatrix werden 30 µg auf Eis aufgetautes, das entsprechende GST-Fusionsprotein aufgereinigt hinzugegeben und gut gemischt. Die Immobilisierung wird für 30 Minuten bei 4°C auf den Sonnenrad durchgeführt.

## **3.16 Konzentrierung von Proteinfraktionen**

Mittels Amicon Ultra Zentrifugationsröhren von Millipore läßt sich die Proteinkonzentration in einem



Zelllysat oder eines Pulldown-Eluates erhöhen. Das Prinzip beruht auf einer Filtration der Proteinfraction in einer Tischzentrifuge durch einen Zellulosefilter. Hierbei wird die Flüssigkeit bis zu einem gewissen Volumen abfiltriert. Dieser Filter lässt alle Bestandteile passieren, welche kleiner als 10 kDa sind, während größere Bestandteile im Probenreservoir verbleiben. Der Nachteil dieser Methode besteht in dem Verlust aller niedermolekularen Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner als 10 kDa.

Die aufzukonzentrierenden Proteinfractionen werden in den oberen Behälter des Zentrifugationsröhrchens gegeben. Die Zentrifugation erfolgt bei 8°C und 4000 Upm in einer Tischzentrifuge (Heraeus, 3 l-r) erst in fünfminütigen Schritten, dann in Minutenschritten, um das gewünschte Volumen, meist ein zehntel der eingesetzten Probe, nicht zu unterschreiten. Danach wird die konzentrierte Proteinfraction vorsichtig entnommen und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, auf Eis gestellt und weiter verwendet.

### **3.17 *In vitro* Phosphorylierungen von immobilisiertem Fusionsprotein bzw. präzipitiertem nativen Protein**

Es besteht die Möglichkeit, immobilisiertes Fusionsprotein oder aber auch das präzipitierte Connexin *in vitro* mit einer Kinase seiner Wahl zu phosphorylieren. Hierzu werden 15 µg immobilisiertes GST-Fusionsprotein bzw. das präzipitierte Connexin36 aus dem Lysat von vier Retinae dreimal mit PBS<sup>-</sup> und zweimal mit dem vom Hersteller empfohlenen Kinasepuffer gewaschen, mit der entsprechenden Menge ATP versetzt, die vorgeschriebene Menge rekombinant vorliegender Kinase hinzugegeben, und die Phosphorylierung für 30 min in einem Heizblock bei 30°C inkubiert. Im Anschluss werden die Versuchsansätze fünfmal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und nach dem letzten Waschen das Gelbett mit einer fein ausgezogenen Pipette trockengesaugt. Das Gelbett wird nun in 20 µl Lämmli-Probenpuffer aufgenommen für 10 min bei 70°C erhitzt und anschliessend zu einer SDS-PAGE mit anschliessender Autoradiographie eingesetzt.

Die *in vitro*-Phosphorylierung durch rekombinante CaMKII hat zusätzlich noch die Besonderheit, dass die Kinase zunächst in Gegenwart von ATP autophosphoryliert werden muss (30°C, 20 15 min), um anschliessend ihre katalytische Aktivität an einem angebotenen Substrat zu entwickeln. Das ungebundene ATP und dessen Produkte werden nach Autophosphorylierung mit dreimaligem Waschen

mit PBS<sup>-</sup> und einmaligem Waschen mit Kinasepuffer entfernt, bevor Teile des Ansatzes zu immobilisiertem Fusionsprotein mit erneuter ATP- Zugabe gegeben werden kann.

### 3.18 Immunpräzipitation von Cx36 aus Retinalysaten

RIPA-Lysat aus gleichen Mengen unmarkierten oder mit <sup>32</sup>P-Orthophosphat respektive <sup>35</sup>S-Methionin radioaktiv markierten Retinae wird mittels Zugabe von 60 µl Sepharose und anschließender Inkubation für 30 min bei 4°C von unspezifisch an Sepharose bindenden Proteinen befreit und dem Überstand anschliessend 4 µl gegen Cx36 gerichtete an 30 µl ProteinA-Sepharose immobilisierte Antikörper (Zymed 516300) hinzugefügt. Daraufhin wird werden die so behandelten Lysate ün bei 4°C drehend inkubiert. Anschliessend erfolgt dreimaliges Waschen mit RIPA-Waschpuffer gefolgt von einmaligem Waschen mit ddH<sub>2</sub>O. Das Gelbett wird mit einer fein ausgezogenen Pipette trocken gesaugt, und anschliessend nach Zugabe von 20 µl Lämmli-Probenpuffer bei 65°C für 10 min erhitzt. Der Überstand wird für eine SDS-PAGE mit anschliessender Autoradiographie eingesetzt.

ProteinA -Sepharose ist allerdings nur zur Immobilisierung von Antikörpern aus Kaninchen geeignet, für monoklonale Maus-Antikörper wird ProteinG-Sepharose verwendet.

### 3.19 Immunpräzipitation von Cx45 Protein aus Zelllysaten

1500 µg in RIPA-Probenpuffer gelöstes Protein werden in einem Arbeitsvolumen von 300-1000 µl RIPA-Probenpuffer zu 50 µl ProteinG-Sepharose Suspension pipettiert (1:1 in TBS, Amersham Biosciences) und 30 min bis 2 h auf einem Drehrad bei 4°C rotierend inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen an die Sepharose-Matrix abzusättigen. Zwischenzeitlich werden 20 µl einer ProteinG-Sepharose- Suspension (1:1 in TBS) mit 2 µg Antikörper versetzt und zur Ausbildung der ProteinG Antikörper- Bindung 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Nach einer Sedimentation der mit Proteinlysat präinkubierten Sepharosekügelchen (4°C, 6000 Upm, 2 min) wird der Überstand zum Antikörper/ProteinG-Sepharose-Gemisch pipettiert und ün auf einem Drehrad rotierend zur Ausbildung der Antigen/Antikörper-Bindung inkubiert. Am folgenden Tag werden die Sepharosekügelchen mit den Immunpräzipitaten sedimentiert und dreimal mit je 500 µl RIPA-Waschpuffer und einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und das Gelbett mit einer fein ausgezogenen Glaspasteurpipette trocken gesaugt. Zur Vorbereitung der gelelektrophoretischen Auftrennung wird das

Gelbett in 20 µl einfach Lämmli- Puffer resuspendiert und 10 min bei 70°C denaturiert, so dass die Immunpräzipitate in einfach Lämmli-Puffer gelöst vorliegen. Die Sepharosekügelchen im Probenansatz werden nun bei 13.000 Upm RT für 1 min sedimentiert, der Überstand abgenommen und eine gelelektrophoretische Auftrennung im SDS-Gel und eine anschließende Immunoblotanalyse durchgeführt.

### 3.20 Induktion von Fusionsproteinen

Zur Herstellung und Aufreinigung verschiedener Fusionsproteine müssen die Plasmide in solche Bakterienstämme transformiert werden, die eine Induktion der bakteriellen Expression des Fusionsproteins zulassen. Zu diesem Zwecke wurden die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide in den *E.coli*-Stamm BL21 transformiert, auf Ampizillin-haltigem LB-Agarplatten ausgestrichen, angezogen und Einzelkolonien zur Inokulation von Vorkulturen verwendet. Ein 500 µl Aliquot einer 2 ml-Vorkultur wird am Tag des Experiments in 50 ml Ampizillin-haltigen LB-Mediums überimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD 600nm) von 0,6 kultiviert. Entsprechend des Kulturvolumens in ml wird die entsprechende Menge in µl einer 1 M IPTG-Stamm-Lösung hinzugefügt und für 3-4 h weiter kultiviert.

### 3.21 Präparation von GST-Fusionsproteinen

Im Falle der Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen wird die Bakterienkultur durch Zentrifugation in einem (oder mehreren) 50 ml-Plastikreaktionsgefäßen bei 4°C 5000 Upm für 5 min sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in der Hälfte des eingesetzten Kulturvolumens in PBS<sup>-</sup> resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen sedimentiert. Nach sorgfältigem Entfernen des gesamten Überstandes kann das Bakterienpellet bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert werden. Das Pellet wird erneut mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und sedimentiert. Zur Bakterienlyse werden pro ml Kulturvolumen 75 µl Bakterien-Lysispuffer und 3,75 µl Lysozym-Lösung eingesetzt. Das Bakterienpellet wird vorsichtig im fertigen Lysispuffer resuspendiert, 30 min bei 4°C inkubiert, bevor es dreimal für 10 sec mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier) sonifiziert wird. Anschliessend wird es wieder 30 min bei 4°C inkubiert, im Anschluss in 1,5 ml- Reaktionsgefäße überführt und bei 13.000 Upm (4°C, 15 min) von unlöslichen Anteilen getrennt, so dass schließlich der Überstand für

Folgeexperimente in neue Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -70°C eingefroren werden kann.

### **3.22 Aufreinigung von GST Fusionsproteinen über GSTrap-Säulen**

Um GST-Fusionsproteine aus Bakterienlysaten im grossen Maßstab abtrennen zu können, werden 1 ml GSTrap-Säulen (GE Amersham) in einem System bestehend aus einer peristaltischen Pumpe P-1 (Pharmacia), sowie eines UV-Detektors (LKB Bromma 2138 UVcord S) mit angeschlossenem Plotter (LKB Bromma 2210 Recorder) und eines Fraktionssammlers (LKB Bromma 2211 SuperRac) bei 4°C eingesetzt. Nach ordnungsgemässen Einbau der Säule wird diese zunächst mit einem Waschvorgang (2 ml/min, 20 ml PBS<sup>-</sup>) von der Lagerungslösung (20% Ethanol) befreit. Anschliessend werden 10 ml aus induzierten Bakterien gewonnenes Bakterienlysat über die Säule gepumpt (0,5 ml/min) und anschliessend bis zum Wiedererreichen der Nulllinie des Plotters mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Im Anschluss findet die Elution mit 10 ml Elutionspuffer (50 mM Tris HCL, 150 mM NaCl, 100 mM Glutathion, pH 8.3) statt, ein Volumen, mit dem sich meist ebenfalls wieder die Nulllinie erreichen lässt. Das Eluat wird im Fraktionssammler in 1 ml Fraktionen gesammelt, die im Anschluss auf ihren Inhalt mittels SDS-PAGE mit anschliessender Coomassie-Färbung überprüft werden können. Fusionsprotein enthaltende Fraktionen werden mit Hilfe von mehrmaliger Ultrafiltration von ihrem hohen Glutathionanteil befreit, auf zumeist 1ml eingeeingt, proteinbestimmt und bei -70 °C gelagert.

### **3.23 *In vitro*-Translation**

In insgesamt 8 µl werden 1-3 µg Plasmid-DNS mit sterilem A.bidest verdünnt und 1 µl TNT-Reaktionspuffer, 0,5 µl Aminosäuremix (ohne Methionin), 12,5 µl Hasen-Retikulozytenlysat, 0,5 µl RNasin und 0,5 µl T7-oder T3-Polymerase hinzupipettiert (alle Bestandteile stammen aus dem TNT-Reagensatz von Promega). Im Isotopenlabor werden dem Versuchsansatz 2 µl [35S]-Methionin hinzugefügt und die Reaktion bei 30°C für 90 min inkubiert. Zur qualitativen Beurteilung der *in vitro*-Translation werden 2 µl des Ansatzes mit ddH<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt, 4 µl 4xLaemmli hinzugegeben, 10 min bei 70°C denaturiert, und schliesslich einer SDS-PAGE mit anschliessender Autoradiographie des Gels unterzogen. Die restliche Probe sowie der ursprüngliche Translations-Ansatz werden bis zum Folgeexperiment bei -20°C gelagert.

### **3.24 GST-Pulldown-Test**

60 µl einer Suspension immobilisierter Glutathionmatrix werden in ein 1,5 ml- Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt und insgesamt fünfmal mit jeweils 300 µl PBS+ gewaschen (Sedimentation: 2 min, 4°C, 5000 Upm). Anschließend werden 200-300 µl gereinigtes GST-Fusionsprotein hinzupipettiert, der Ansatz resuspendiert und 45 min auf einem Drehrad (20 Upm, 4°C) inkubiert. Das gleiche Volumen einer zweifach konzentrierten Blockierungslösung (2% Fischgelatine, 2% BSA in PBS+) wird zum Ansatz hinzugefügt und erneut 45 min rotiert, bevor die Agarosekügelchen in fünf Waschschritten mit einfach konzentrierter Blockierungslösung behandelt wird. Im Isotopenlabor werden 2 µl eines *in vitro*-Translationsansatzes (siehe 3.4.5) in 400 µl Blockierungslösung verdünnt und zur bereits blockierten Glutathionmatrix pipettiert. Dieser GST-Pulldown-Ansatz wird unter Rotation für 90 min (20 Upm, 4°C) inkubiert, bevor er schließlich fünfmal mit PBS+ gewaschen wird, um ungebundenes Translations-Produkt zu entfernen. Die Stringenz einer möglichen Interaktion kann durch weitere Waschschrritte mit Puffern unterschiedlicher Detergenz- oder Salzkonzentration überprüft werden, z.B. eine Mischung aus PLP/Puffer J (3:1 oder 1:1). Die Elution des GST-Fusionsproteins und dessen möglichen Interaktionspartners, dem IVT-Produkt, erfolgt durch zwei kurze Waschschrritte und eine einmalige Inkubation unter Rotation bei 4°C mit jeweils 400 µl Ellutionspuffer. Die insgesamt etwa 1,2 ml Elutionsvolumen werden in einem Centricon-Röhrchen (Millipore) auf 50 µl eingengt (Dauer: ca. 30 min, 8°C, 4500 Upm).

Wird eine GST-Pulldown-Analyse mit [<sup>35</sup>S]-radioaktiv markiertem *in vitro*-Translationsprodukt durchgeführt, werden eine geeignete Menge des eingengten Eluats mit 4fach Lämmli-Puffer versetzt und in einer denaturierenden Polyacrylamid- Gelelektrophorese aufgetrennt. Das fertige Gel wird 15 min in Gel-Fixierungslösung denaturiert und 30 bis 45 min in Amplify-Lösung inkubiert, um die [35S]-Signale zu verstärken. Schließlich wird das feuchte Gel in einem Gel Trocknungsautomaten (Biorad 538) auf Filterpapier getrocknet (1:45h), bevor es zusammen mit einem beschichteten Röntgenfilm (Kodak BMR) bei RT in einer lichtdichten Kassette eingeschlossen wird. Die Expositionszeit für die Autoradiographie kann bis 14 Tage dauern.

### **3.25 GST-Pulldown und Vorbereitung zur MudPIT-Analyse**

Eine 50 µl Suspension aus immobilisiertem Glutathion wird dreimal mit je 500 µl PBS+ gewaschen

(4000 upm, 3 min, 4°C) und 30 min rotierend mit 50 µg Fusionsprotein in 500 µl MudPit-Lysispuffer inkubiert (4°C). Anschließend werden die Agarosekügelchen dreimal mit PBS<sup>+</sup> und einmal mit MudPIT-Lysispuffer gewaschen. Insgesamt werden pro Ansatz 2 mg Gewebeprotein eingesetzt und das Volumen auf 0,5-1 ml pro 1,5 ml- Reaktionsgefäß eingestellt. Der Pulldown erfolgt über Nacht bei 4°C unter rotierender Bewegung auf einem Drehrad. Am folgenden Tag werden die Agarosekügelchen einmal mit Lysispuffer und dreimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, dem zusätzlich 1 mM EDTA, 1mM PMSF und Complete (Roche) zugesetzt worden sind. Nach dem letzten Waschschrift werden die Agarosekügelchen mit einer fein ausgezogenen Glaspasteurpipette trocken gesaugt. Die Elution erfolgt mit 100 µl MudPIT-Elutionspuffer (5 min auf Eis, kurzes Anschnappen des Reaktionsgefäßes). Der Elutionsansatz wird zentrifugiert und vorsichtig der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem sich eine Microcon-Säule befindet, mit deren Hilfe sich das Eluat konzentrieren lässt. Dabei bleiben nur die Proteine >10 kDa erhalten (2 h, 4°C, 10.000 Upm), kleinere sind im Durchfluss. Ist eine Reduktion des Volumens auf 10 µl erreicht, werden die Säulchen umgedreht und die restliche Flüssigkeit in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Die Proben werden in einer Lyophilie getrocknet, so dass nur getrocknete Proteinproben vorliegen, die schließlich in 50 mM Natriumbicarbonat (pH 8.0) aufgenommen, mit Trypsin nach Herstellerangaben gespalten und einer massenspektroskopischen Analyse (MudPIT-Verfahren) unterzogen werden. Diese Untersuchung wurde von Cantas Alev, AG Prof. Rolf Dermietzel, Bochum, im Labor von Dr. Dirk Wolters, Bochum, durchgeführt.

### **3.26 Elektroelution von rekombinantem Protein aus einem Polyacryamid-Gel**

Wenn sich ein rekombinant exprimiertes Protein trotz aller Solubilisierungsmaßnahmen als unlöslich herausstellt und somit bei der Bakterienlyse in Einschlusskörperchen verbleibt, bleibt dem Experimentator dennoch ein letzter Ausweg, falls das Protein keine besonders komplexe und versatile Sekundärstruktur erwarten läßt, was z. B. bei den zytoplasmatischen Domänen der Connexinproteine der Fall ist. Es ist möglich, das induzierte Bakterienlysate mit enthaltendem unlöslichen Fusionsprotein durch Behandlung mit Laemmli-Puffer komplett denaturierend zu solubilisieren und vollständig auf eine SDS-PAGE aufzutragen. Nach Gellauf wird mittels Kaliumchlorid-Gegenfärbung (siehe 3. 10.8) die induzierte Bande visualisiert und möglichst präzise aus dem Gel ausgeschnitten. Die nun

hauptsächlich das gewünschte Protein enthaltenden Gelstücke werden in ca. 1 mm große Würfel unterteilt und in einen vorbereiteten Dialyseschlauch gegeben, der 2 ml SDS-Laufpuffer enthält. Dieser Dialyseschlauch wird nun in eine mit SDS-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben und für 2 h bei 100 V einer Elektroelution unterzogen. Im Anschluss wird für 1 min die Polarität umgekehrt. Das sich vorher in den Gelstückchen enthaltende Protein sollte sich nun vollständig in Laufpuffer gelöst im Dialyseschlauch befinden.

### **3.27 Proteolytische Spaltung mittels sequenzspezifischer Protease**

Der Vektor pGEX-6P-1 enthält direkt C-terminal der für die Glutathion-S-transferase codierende Sequenz und N-terminal der multiplen Konierungstelle eine für eine Aminosäuresequenz codierende Sequenz, die von der PrescissionProtease™ spezifisch gespalten werden kann, so dass die Möglichkeit besteht, dass man die der GST entsprechenden Sequenz proteolytisch abspalten kann. Die Prescission Protease (GE Amersham) selbst ist ein Fusionsprotein aus GST und des die Proteaseaktivität besitzenden Proteinfragments, so dass prinzipiell die Möglichkeit besteht, das von dem zu reinigenden Protein das abgespaltene GST als auch die nun kontaminierende Protease per GLT-Affinitätssäule abzutrennen. Die proteolytische Spaltung wird für 4 h bei 4°C nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **3.28 Sequenzielle Reinigung proteolytischen Produkts über Reaktionsgefäße**

Wenn ein standardmäßiger Einsatz von Affinitätssäulen aufgrund von problematisch in Lösung zu haltendem oder an Oberflächen stark adherierendem Peptid nicht dem gewünschtem Ergebnis entspricht, besteht die Möglichkeit, die angebotenen Oberflächen zu reduzieren und zusätzlich im Vorfeld zu blocken. Hierzu wird eine Reihe von 15 ml Falcon Reaktionsgefäßen vorbereitet, in denen jeweils 200 µl an Agarose immobilisiertes Glutathion vorgegt ist. Diese werden üN mit 4 ml Pulldown-Blockierungspuffer (2% Fischgelatine, 2% BSA ind PBS<sup>-</sup>) überkopf inkubiert, so dass davon ausgegangen werden kann, dass alle unspezifischen Proteinbindestellen der Glutathion-Matrix und der Gefäßwandungen abgesättigt sind. Nun werden diese Gefäße mindestens fünfmal mit dem die zu reinigende Proteinprobe enthaltenden Puffer equilibriert und gewaschen, auf dass sich die unter diesen Bedingungen wieder lösenden Bestandteile des Blockierungspuffers wieder lösen können und später nicht die kostbare Probe kontaminieren. Nach der so durchgeführten Blockierung der Gefäße wird die

zu reinigende, proteolytisch gespaltene Proteinprobe in das erste von überschüssiger Flüssigkeit befreite Gefäß gegeben und für 1 h bei 4°C im Taumelschüttler inkubiert. Der daraus resultierende Überstand sollte nun die vorherige Menge an abgespaltenem zu reinigendem Protein und eine geringere Menge an GST-beihaltendem Protein enthalten, also weniger Protease und abgespaltenes GST. Es werden 12 µl dieses Überstandes für eine analytische SDS-PAGE verwahrt. Dieser Überstand wird nun in das nächste Gefäß gegeben und der Vorgang wiederholt. Auf diese Weise ist man in der Lage, unter minimalem Verlust des eigentlich leicht adherierenden gewünschten Peptids auch einen Überschuss kontaminierendes GST zu entfernen.

### **3.29 Einengung bzw. Umpufferung eines Proteingemisches durch Ultrafiltration**

Eine Möglichkeit der Volumenänderung oder der Abtrennung von niedermolekularen Molekülen aus einem Proteingemisch besteht in der Ultrafiltration der entsprechenden Gemische durch einen Zellulosefilter, dessen Porengröße eine Ausschlussgrenze besitzt, die nach Kilodalton (kDa) benennbar ist. In dieser Arbeit hat diese Technik einen wichtigen Bestandteil in der Volumenreduzierung der GST-Pulldown-Fraktionen für MudPIT, aber vor allem in der Abtrennung des Glutathion aus dem gereinigten GST-Fusionsprotein nach Aufreinigung im grossen Maßstab.

Im Falle der Pulldown-Fraktionen für MudPIT werden die vereinigten Fraktionen jeweils in einem Microcon Röhrchen mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa von einem Gesamtvolumen von bis zu 500 µl bei 16°C und 4000 UPM in einer Beckmann Tischzentrifuge auf ein Endvolumen von 10 µl eingeeengt und anschliessend lyophilisiert (Seybold Lyophylle).

Im Falle der Abtrennung des GLT nach Aufreinigung von GST-Fusionsprotein im grossen Maßstab werden die das Fusionsprotein enthaltende Fraktionen vereinigt und bei 16 °C und 4500 Upm in einer Tischzentrifuge (Hereaus 3-L-R Multifuge) in AmiconUltra Röhrchen mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa auf ca. einen ml eingeeengt. Nun wird das Ultrazentrifugationsröhrchen mit dem bereits für die Elution des Fusionsprotein benutzten Elutionspuffer auf 10 ml aufgefüllt und erneut eine Eineingung auf 1 ml durchgeführt. Dies wird zumindest dreimal wiederholt, um das sich in hoher Konzentration in den Elutionsfraktion befindliche Glutathion möglichst quantitativ zu entfernen, um eine spätere erneute Bindung des Fusionsproteins zu ermöglichen und darüberhinaus eine Verfälschung der Konzentration des Fusionsproteins durch sich noch im Eluat befindlichen Glutathion zu verhindern. Das aus dieser



Prozedur resultierende hochreine, hochkonzentrierte GST-Fusionsprotein kann nun proteinbestimmt werden und wird bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.30 Datenbankanalysen

Die Datenbankanalysen werden mit den Programmen des NCBI (National Center for Biotechnology Information; an anderer Stelle auch mit der Internetseite <http://elm.eu.org/> und die unter <http://harvester.fzk.de/harvester/> zugänglichen Internetseiten. Ebenso wurden die Analysemethoden der Internetseite „<http://www.expasy.org>“ genutzt. Im Besonderen wurden hier Funktionen des Unterpunktes „proteomic and sequence analysis tools“ genutzt.

### 3.31 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

#### 3.31.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Darm-Gefrierschnitten mit Antikörpern gegen SM(smooth muscle)-Aktin

Die adulten Mäuse werden durch zervikale Dislokation getötet, der Darm und in ca. 1 cm langen Stücken in Tissue-Tec (Sakura) eingebettet. Mit einem Kryotom werden  $10\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt. Nach der einstündigen Trocknung vor einem Ventilator werden die Schnitte zur weiteren Verwendung bei  $-70\ ^{\circ}\text{C}$  gelagert oder direkt in absolutem EtOH fixiert (Küvette,  $-20^{\circ}\text{C}$ , 15 min), dreimal in  $\text{PBS}^{-}$  gewaschen (Küvette, jeweils 5 min, RT) und in  $150\ \mu\text{l}$  Mouse on Mouse (MOM)-Kit-Blockierungslösung pro Objektträger (feuchte Kammer, RT, 30 min) abgesättigt. Der primäre Antikörper anti-SM-Aktin (Sigma) wird 1:250 in MOM-Blockierungslösung verdünnt und  $100\ \mu\text{l}$  Antikörper-Lösung pro Objektträger in einer feuchten Kammer inkubiert (RT, 1 h). Nach dreimaligem Waschen in  $\text{PBS}^{-}$  (Küvette, RT, jeweils 5 min) erfolgt lichtgeschützt die Inkubation mit  $300\ \mu\text{l}$  pro Objektträger Alexa594 gekoppelten Sekundärantikörpern (Ziege anti-Maus 1:2000) verdünnt in MOM-Blockierungslösung (feuchte Kammer, RT, 45 min). Nach drei Waschsritten in  $\text{PBS}^{-}$  (abgedunkelte Küvette, RT, jeweils 5 min) werden die Objektträger kurz in  $\text{ddH}_2\text{O}$  geschwenkt und trockengetupft, die Schnitte in Permafluor<sup>®</sup> (Beckman) eingedeckelt und bis zur Analyse am Laser Scan-Mikroskop (Zeiss) bei  $4\ ^{\circ}\text{C}$  ausgehärtet. Die Lagerung erfolgt lichtgeschützt maximal für eine Woche.

### 3.31.2 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten mit Cx36-Antikörpern

Die adulten Mäuse werden durch zervikale Dislokation getötet, die Augen entnommen und in Tissue-Tec (Sakura) eingebettet. Mit einem Kryotom werden 14 µm dicke sagittale Schnitte angefertigt. Nach der einstündigen Trocknung vor einem Ventilator werden die Schnitte zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert oder direkt in absolutem EtOH fixiert (Küvette, -20°C, 15 min), dreimal in PBS<sup>-</sup> gewaschen (Küvette, jeweils 5 min, RT) und in 150 µl Blockierungslösung pro Objektträger (feuchte Kammer, RT, 30 min) abgesättigt. Der primäre Antikörper anti-Cx36 46-3600 (Zymed) wird 1:100 in Blockierungslösung verdünnt und 100 µl Antikörper-Lösung pro Objektträger in einer feuchten Kammer inkubiert (RT, 1 h). Nach dreimaligem Waschen in PBS<sup>-</sup> (Küvette, RT, jeweils 5 min) erfolgt lichtgeschützt die Inkubation mit 300 µl pro Objektträger Cy5 gekoppelten Sekundärantikörpern (Esel anti-Kaninchen 1:2000) verdünnt in Blockierungslösung (feuchte Kammer, RT, 45 min). Im Anschluss werden die Schnitte wie bereits bei 3.31.1 beschreiben weiter behandelt und analysiert.

### 3.31. Indirekte Immunfluoreszenzanalyse an HeLa Zellen

Auf Deckgläschen ausgesähte HeLa Zellen werden bei 90%iger Konfluenz zunächst dreimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, dann für 5 min bei -20°C in absolutem Ethanol fixiert, wieder dreimal in PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschliessend in 150 µl Blockierungslösung pro Deckgläschen auf Objektträgern aufgebracht und auf diese Weise abgesättigt. Die primären Antikörper (anti-FLAG, Promega, 1:2000 bzw. anti Cx45, Oldenburg, 1:500) werden in Blockierungslösung verdünnt und 100 µl Antikörper-Lösung pro Deckgläschen in einer feuchten Kammer inkubiert (RT, 1 h). Nach dreimaligem Waschen in PBS<sup>-</sup> (Küvette, RT, jeweils 5 min) erfolgt Inkubation mit 200 µl pro Objektträger Sekundärantikörpern (Alexa488 anti-Kaninchen 1:2000 bzw. Alexa594 anti Maus, 1:2000) verdünnt in Blockierungslösung (feuchte Kammer, RT, 45 min). Nach drei Waschsritten in PBS<sup>-</sup> (RT, jeweils 5 min) werden die Deckgläschen kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und trockengetupft, anschliessend in Permafluor<sup>®</sup> (Beckman) eingedeckelt und bis zur Analyse am Laser Scan-Mikroskop (Zeiss) bei 4 °C ausgehärtet. Die Lagerung erfolgt lichtgeschützt maximal für eine Woche.

## 4.1 Phosphorylierungsstudien an Connexin36 und Connexin45

### 4.1.1 PKA-abhängige Phosphorylierung des Connexin36 Proteins bei der Anpassung des Säugerretina an äussere Lichteinflüsse im Verlauf der Hell/Dunkel-Adaptation

Schon länger sind Regelkreisläufe zur Amplifikation von Signalen durch Querverschaltung von Interneuronen im Säugerauge bekannt. So ist es möglich, dass der visuelle Stimulus von einem einzigen Stabphotorezeptor zunächst auf mehrere retinale Interneuronen, dann auf größere Anzahl in den visuellen Cortex projizierende Ganglionzellen übertragen wird, um auf diese Weise eine Signalverstärkung zu erreichen (Bloomfield & Volgyi, 2004).

Diese sogenannte Adaptation funktioniert durch die Modulation der horizontalen Verschaltung retinaler Interneuronen, den AII-Amakrin-Zellen. Diese horizontale Verschaltung wird durch eine direkte elektrische Kopplung vermittelt, im Falle der Maus durch das Connexin36 Protein wie bereits gezeigt werden konnte (Feigenspan et al., 2001)

Länger schon gab war die in der Kaninchenretina gemachte Beobachtung publiziert, dass dieses Maß an homotypischer Kopplung bei Lichteinfall abnimmt (Bloomfield & Volgyi, 2004), was mit einer steigenden extrazellulären Dopaminkonzentration und auch einem daraus über D1-Rezeptor-vermitteltem resultierenden intrazellulären Anstieg des Levels an zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) in den beteiligten AII-Amakrinzellen einhergeht.

In Anbetracht der Tatsache, dass die Aktivität der cAMP-abhängigen Kinase (PKA), wie die Namensgebung bereits impliziert cAMP abhängig ist und sich Konsensustellen für eine mögliche Phosphorylierung des Connexin36 Proteins durch PKA in dessen cytoplasmatischen Domänen befinden (siehe Urschel et al., 2006), wurde folgende Arbeitshypothese aufgestellt:

Die zur Lichtanpassung notwendigen Änderung in der homotypischen Kopplung könnte direkt durch PKA-vermittelter Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domänen des Cx36 vermittelt werden.

Dieser Hypothese sollte mit biochemischen Analysemethoden nachgegangen werden. So wurde in diesem Teil dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Dr. Stephanie Urschel Bestätigung dieser Fragestellung vorangetrieben.

#### 4.1.2 Cx36 ist in der Retina phosphoryliert

Zunächst wurde der Nachweis durchgeführt, die Phosphorylierung des Connexin36 Proteins in der Retina direkt nachzuweisen. Im Gegensatz zu einer vorhergehenden Studie (Sitaramayya et al., 2003), die zu dem Schluss kamen, dass Connexin36 in der Rinderretina kein Phosphoprotein sei, gelang uns der Nachweis des Cx36 Phosphoproteins in sowohl mittels  $^{35}\text{S}$  Methionin wie auch  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat metabolisch markierten Retinaexplantaten der Maus (Siehe Abb. 4.30). Hierzu wurden die Retinae adulter Mäuse kultiviert, metabolisch mit den entsprechenden Isotopen markiert und daraus ein Proteinlysate hergestellt, das für eine IP gegen Cx36 eingesetzt wurde. (siehe auch 3.18)

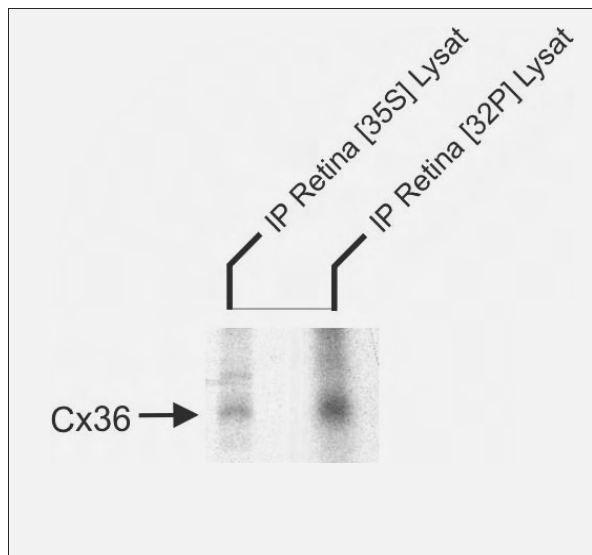


Abb. 4.1.: **Autoradiographie einer Cx36 IP von  $^{35}\text{S}$  und  $^{32}\text{P}$  markierter, kultivierter Retina**

Dargestellt ist die Autoradiographie von Immunpräzipitationen von Cx36 aus Lysaten entweder  $^{35}\text{S}$  und  $^{32}\text{P}$  metabolisch markierten adulten Mäuseretinae. Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Stephanie Urschel zur Verfügung gestellt

In den obigen Immunpräzipitationen (Abb 4.1) ist die erfolgreiche Präzipitation von  $^{35}\text{S}$  markiertem Cx36 Protein, als auch von  $^{32}\text{P}$  markiertem Phosphoprotein zu erkennen. Wir haben daraus gefolgert, daß das Cx36 Protein in der kultivierten murinen Retina phosphoryliert vorliegen kann.

Von biologischem sowie funktionellem Interesse ist nun die Frage, welche Kinase für diese Phosphorylierung verantwortlich sein könnte. In diesem Zusammenhang sei auf Abb 5.2 hingewiesen, in der sind die potentiellen Phosphorylierungsstellen des Cx36 Proteins dargestellt sind. Die Arbeitsgruppe um John O'Brien (Patel et al. 2006) zeigte eine cAMP-abhängige Regulation der Kopplung von Cx35, dem Fisch-Ortholog des Cx36 Proteins unter anderem durch PKA, also wurde der Einfluss der PKA auf die Phosphorylierung des Cx36-Proteins untersucht.

### 4.1.3 Die Phosphorylierung des Cx36 wird durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels verstärkt

Da bereits bekannt war, dass bei der Anpassung der Kaninchenretina an Licht (Hampson et al., 1992) sich vermittelt über D<sub>1</sub> Rezeptoren der AII Amakrinzellen deren intrazellulärer cAMP-Spiegel erhöht, was mit einer Abnahme der Cx36-vermittelten Kopplung einhergeht, liegt der Schluss nahe, dass die ProteinkinaseA an der Phosphorylierung des Cx36 Proteins beteiligt sein könnte.

So wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Stephanie Urschel Versuche unternommen, die Aktivität der cAMP-abhängigen Kinase PKA in der Retinakultur zu stimulieren und in dieser Konsequenz eine Verstärkung der Phosphorylierung des Cx36 Proteins zu beobachten. Hierzu wurde das membrangängige cAMP Analogon dbc-cAMP in das Kulturmedium gegeben und das Cx36 Protein aus den so stimulierten Retinae präzipitiert und auf Einbau radioaktiven Phosphats untersucht.

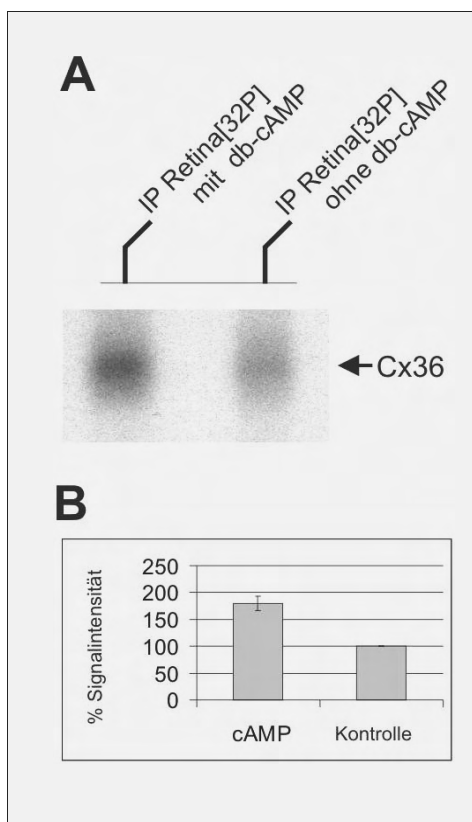


Abb. 4.2.: **Autoradiographie einer Cx36 IP von <sup>32</sup>P markierter, kultivierter Retina in Abhängigkeit von Stimulation mit cAMP**

Dargestellt ist in A die Autoradiographie von Immunpräzipitationen von Cx36 aus Lysaten von <sup>32</sup>P metabolisch markierten adulten Mäuseretinae, mit Behandlung mit db-cAMP (links) und ohne Behandlung mit db-cAMP (rechts), in B ist die densitometrische Quantifizierung dieser Experimente gezeigt (n=3).

Da in diesem Versuchsansatz eine signifikante Erhöhung der Inkorporation des radioaktiven <sup>32</sup>P-Orthophosphats in der Menge an immunpräzipitiertem Cx36 Protein zu messen ist, stellt dieser Befund den ersten Hinweis auf einen direkten oder indirekten Zusammenhang der intrazellulären cAMP-Konzentration der entsprechenden Interneuronen und des Phosphorylierungsstatus des Connexins dar, was wiederum auf die cAMP-abhängige Kinase PKA hindeutet. (siehe Abb. 4.2)

#### 4.1.4 Phosphorylierungsnachweis durch Visualisierung der direkten Phosphorylierung des Cx36 Proteins durch PKA sowie massenspektrometrische Untersuchungen von tryptischen Fragmenten von Cx36-GST-Fusionsproteinen

Um den Nachweis zu erbringen, dass die PKA die zytoplasmatischen Domänen des Cx36 Proteins direkt phosphorylieren kann, wurden rekombinant exprimierte GST-Fusionsproteine der intrazellulären zytoplasmatischen Schleife (GSTCx36CL) und des Carboxyterminus (GSTCx36CT) des Cx36 Proteins kloniert und rekombinant exprimiert. Die Proteine wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt und an GLT-Beads immobilisiert zu Phosphorylierungsstudien eingesetzt. Hierzu wurden sie mit rekombinant vorliegender PKA unter optimalen Pufferbedingungen in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ -gamma-ATP phosphoryliert. Ein starker Einbau des radioaktiven Phosphats in die GST-Fusionsproteine konnte so nachgewiesen werden (Abb. 4.3 A)

Im Kontext des mechanistischen Verständnisses einer phosphorylierungsabhängigen Änderung der Funktionalität eines Proteins ist die genaue Lokalisation der Phosphorylierungsstelle von großer Bedeutung. So wurde grössere Mengen des Fusionsproteins in Gegenwart von nichtradioaktivem ATP mittels PKA phosphoryliert (siehe 3.17), auf eine SDS-PAGE aufgetragen, nach inverser Färbung mittels Kaliumchlorid aus dem Proteingel ausgeschnitten, nach Kobe, Japan, verschickt und von Cantas Alev den weiteren Vorbereitungen zur Massenspektrometrie (tryptischer Verdau, Gelextraktion) unterzogen. Die resultierenden Phosphopeptide wurden per MS/MS Spektroskopie vermessen und die Spektren mittels geeigneter Software auf an die Aminosäureseitenketten angehängten Phosphatreste untersucht. So konnten auf diese Weise Phosphorylierungen an den Aminosäureresten S110, S293 und S306 nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.3 sowie Urschel et al., 2006, supplemental material)

Darüber hinaus wurden in Arbeiten von Dr. Stephanie Urschel am Zentrum für Molekulare Medizin in Köln MALDI-ToF Studien in Auftrag gegeben, wo ebenfalls die Serine S110, S306 sowie S315 in Phosphopeptiden nachgewiesen werden konnten (siehe Urschel et al., 2006 supplemental material).

So wurden in den zytoplasmatischen Domänen des Connexin36 insgesamt vier Serine identifiziert, die möglicherweise von der Protein Kinase A phosphoryliert werden.

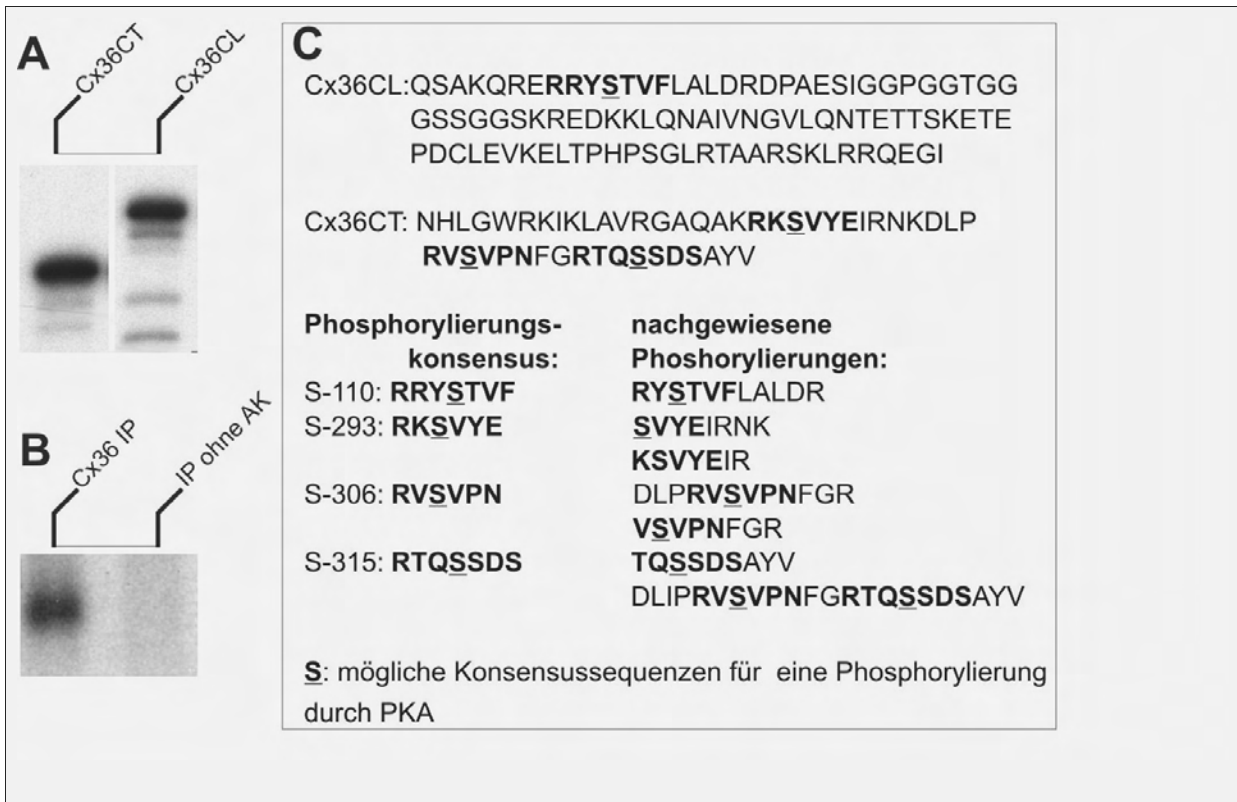


Abb. 4.3.: PKA-vermittelte *in-vitro* Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen der zytoplasmatischen Domänen des Cx36 Proteins sowie immunpräzipitiertem Cx36 aus Retina

Dargestellt ist in A: Autoradiographie von immobilisiertem GST-Cx36CL und GST-Cx36CT Fusionsprotein, das in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP mit PKA *in vitro* phosphoryliert wurde; B: Autoradiographie von immunpräzipitiertem Cx36 Protein aus Retinalysat, das in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP mit PKA *in vitro* phosphoryliert wurde; C: Darstellung der cytoplasmatischen Domänen des durch die Fusionsproteine repräsentierten Cx36-Proteins (oben), tatsächlich massenspektrometrisch nachgewiesene phosphorylierte Peptide (unten), PKA-Konsensussequenzen fett, putativ phosphorylierte Serine unterstrichen dargestellt.

#### 4.1.5 Klonierung der punktmutierten GST-Fusionsproteine der zytoplasmatischen Domänen von Cx36

Um die tatsächliche Verwendung der Serinreste genauer einzugrenzen, wurden punktmutierte GST-Fusionsproteine hergestellt, in denen die einzelnen im vorausgehenden Experiment phosphorylierten Serinreste zu Alanineresten mutiert wurden. Dies hat das Ziel, den phosphorylierbaren Serin-Rest mit einem strukturell möglichst ähnlichen Rest zu ersetzen, der im Gegensatz zum Serin nicht mehr phosphoryliert werden kann.

Mittels „Overlap Extension PCR“ wurden für GST-Fusionsproteine codierende Plasmide hergestellt, deren Produkte sich von den bereits benutzten Fusionsproteinen durch jeweils lediglich eine Aminosäure, einer Serin zu Alanin Konversion, unterscheidet, sodass die Plasmide pGEX-Cx36S110A, pGEX-Cx36S293A, pGEX-Cx36S306A und pGEX-Cx36S315A hergestellt werden

konnten.

Die terminalen Enden der aus der Overlap Extension PCR resultierenden PCR-Fragmente wurden mit den selben Oligonukleotidstartermolekülen erzeugt, die auch bereits für die Vektoren pGEX-5X-3-Cx36CT replektive pGEX-6P-1-Cx36CL benutzt wurden (vgl. Urschel et al., 2006). Die resultierenden PCR-Fragmente wurden mit *Sma*I und *Not*I (Cx36CT Mutanten) oder *Bam*HI und *Eco*RI (Cx36C Mutanten) gespalten um kohäsive Enden zu erzeugen und in auf gleiche Art gespaltenen entsprechende Vektorrückgrate inkloniert. Die inklonierten Bereiche wurden durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin bestätigt und in *E.coli* BL21 Bakterien transformiert. Nach Testinduktionen und Löslichkeitstests (nicht gezeigt) wurde die Expression des jeweiligen Fusionsproteins im grossen Maßstab durchgeführt und das resultierende Protein mittels Affinitätschromatographie aus den Bakterienlysaten herausgereinigt (siehe 3. 22) Von den aufgereinigten Proteinen wurden jeweils 15 µg an 25 µl GLT-Agarose-Matrix immobilisiert (siehe 3.15.3).

#### 4.1.6 *in vitro* Phosphorylierung der Punktmutanten durch die Protein Kinase A (PKA)

Die resultierenden Fusionsproteine wurde analog zu Abb. 4.3A *in vitro* einer PKA-Phosphorylierung unterzogen (siehe 3.17), auf einer SDS-Page aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht:

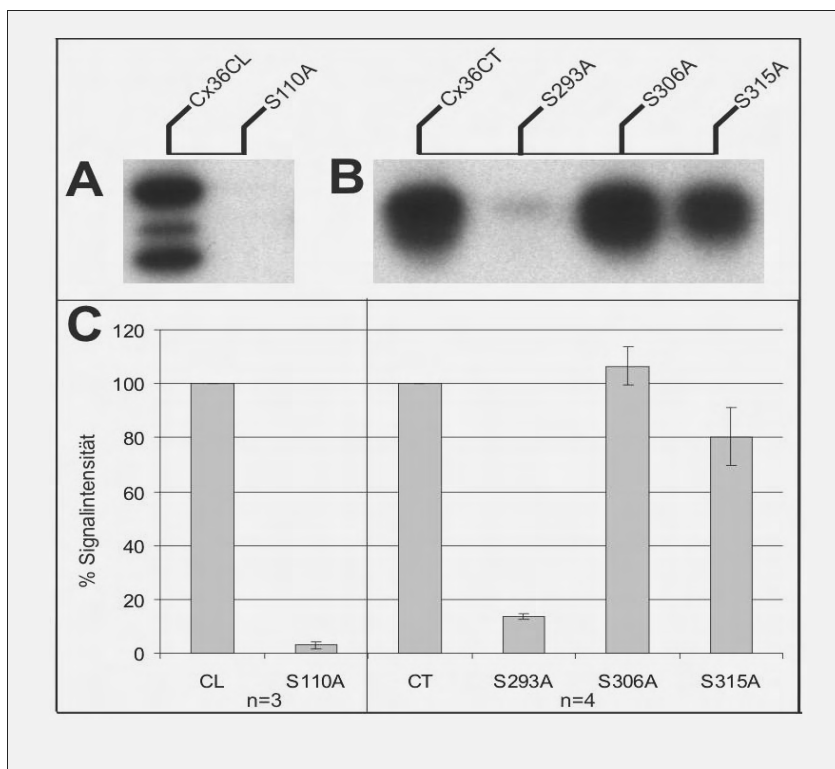


Abb. 4.4.: PKA-vermittelte *in-vitro* Phosphorylierung von GST-Fusionproteinen der punktmutierten zytoplasmatische Domänen des Cx36 Proteins

Dargestellt ist in A: Autoradiographie von jeweils 15 µg immobilisiertem unmutiertem und mutiertem GST-Cx36CL Fusionsprotein, das in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP mit PKA *in vitro* phosphoryliert wurde; B: Autoradiographie von mutiertem und unmutiertem GST-Cx36CT Fusionsprotein, das in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP mit PKA *in vitro* phosphoryliert wurde; C: Darstellung der densitometrischen Quantifizierung des PKA-vermittelten Einbaus von  $^{32}\text{P}$ -gamma-ATP in die mutierten und unmutierten GST-Fusionsproteine.



Festzustellen ist in Abb. 4.4 das fast komplette Fehlen des Einbaus von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP in der S110A-Punktmutante sowie eine starke Reduktion in der S293A-Punktmutante, so daß die beiden hauptsächlich für eine Phosphorylierung durch PKA verantwortlichen Stellen hier nachgewiesen worden sind. Ein Trend in einer leichten Reduktion der Phosphorylierung der S315A Mutante ist ebenfalls festzustellen.

#### **4.1.7 PKA-abhängige Farbstoff-Kopplung in Retinaexplantaten**

Um die physiologische Relevanz der biochemisch eindeutig festzustellenden cAMP stimulierten, PKA-abhängigen Phosphorylierung nachzuweisen, wurden nun von Dr. Timm Schubert (Oldenburg) Neurobiotininjektionen in AII Amakrin Zellen von adulten, explantierten Retinae unternommen, jeweils in An- und Abwesenheit von db-cAMP, dem PKA-Blocker H-89 und dem D1-Antagonisten SCH29300, sowie Kombinationen dieser Stoffe, und das Ausmaß der Kopplung zu benachbarten AII Amakrin Zellen als auch Bipolarzellen quantifiziert:

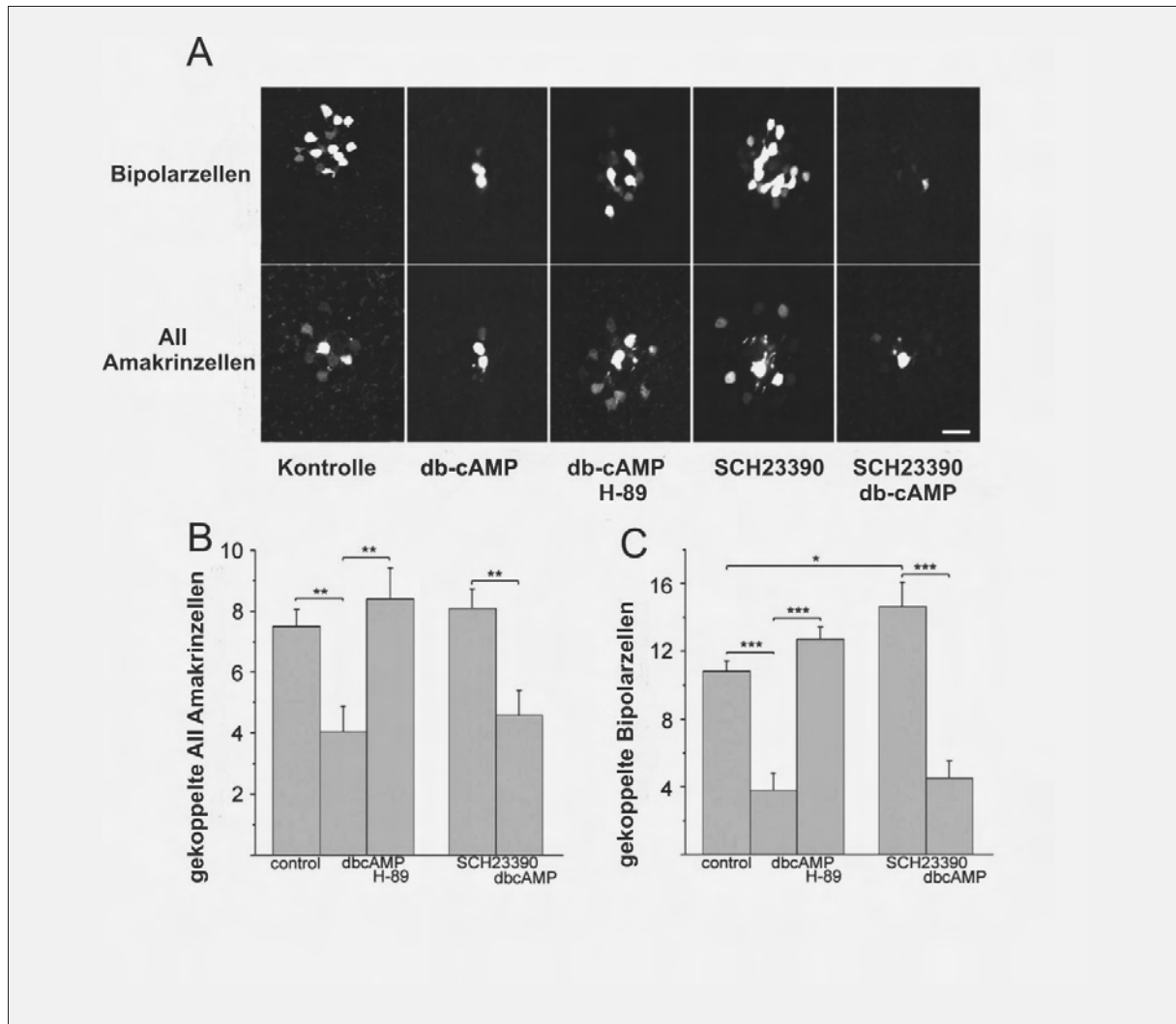


Abb. 4.5.: Farbstoffkopplung von AII Amakrin Zellen in der adulten Mausretina in Abhängigkeit der Abhängigkeit der endogenen PKA

Dargestellt ist A: die Farbstoffkopplung einzelner mit Neurobiotin injektierter AII Amakrinzellen zu entweder benachbarten Amakrinzellen (unten) oder Bipolarzellen (oben), jeweils in An- oder Abwesenheit von db-cAMP, dem PKA-Inhibitor H-89 und dem D<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten SCH23390, Visualisierung des Neurobiotin wurde mit Cy3-Streptavidin durchgeführt, Grössenbalken 20 µm B: die Quantifizierung der Anzahl der gekoppelten AII Amakrin Zellen in A (unten), C: die Quantifizierung der Anzahl der gekoppelten Bipolarzellen in A (oben)

Zu sehen ist in Abb. 4.5 eine starke Reduktion sowohl an AII Amakrin homotypischer Kopplung als auch heterotypischer Kopplung zwischen der jeweils injizierten AII Amakrin Zelle und benachbarten Bipolarzellen nach Inkubation mit membrangängigem db-cAMP. Diese Reduktion an gekoppelten Zellen konnte in beiden Fällen mit zusätzlicher Inkubation mit dem PKA-Blocker H-89 verhindert werden, was auf die direkte Beteiligung der PKA an der Änderung des Kopplungsverhaltens hinweist. Die Inkubation mit SCH23900 zeigte hingegen nur eine leichte Erhöhung, die nicht signifikant ist.

Mit Hilfe dieser Experimente konnte die Protein Kinase A als direkt verantwortlich für die Kopplungsänderung zwischen AII Amakrinzellen in Abhängigkeit von Veränderungen der Botenstoffkonzentrationen (hier cAMP) in der Säugerretina wie sie bei sich verändernden Lichtbedingungen auftreten, identifiziert werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass das Connexin36 Protein in der Retina der Maus als Phosphoprotein vorliegt. Ausserdem konnten die durch die PKA phosphorylierten Aminosäurereste durch Erzeugung von phosphorylierungsdefizienten Punktmutanten direkt nachgewiesen werden.

#### **4.1.8 Nachweis der *in vitro* Phosphorylierung des Cx36 Proteins mittels CaMKII**

Weiterhin wurden in Zusammenarbeit mit Cantas Alev (Bochum) und Stephan Sonntag (Bonn) Untersuchungen zur Phosphorylierung des Cx36 Proteins durch die Calmodulin abhängige Kinase II (CaMKII) vorgenommen, die von Cantas Alev in einem Mud-PIT vermessenem GST-Pulldown Experiment als möglicher Bindepartner von Connexin36 gefunden wurde (Alev et al., 2008, Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht). Sowohl die biochemische Bindung als auch eine Rekrutierung von CaMKII-eYFP zu Cx36-eCFP enthaltenden Gap Junctions in doppelt transfizierten Glutamat/Glyzin stimulierten primären Neuronen konnte gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die offenbar zusätzlich zur direkten Bindung der CaMKII an das Cx36 Protein stattfindende Phosphorylierung des Cx36 Proteins nachvollzogen. So wurden, wie bereits in 4.1.5 beschrieben, punktmutierte GST-Fusionsproteine hergestellt und einem CaMKII-Phosphorylierungsassay (siehe 3.17) unterzogen. Hierzu konnten wegen der grossen Ähnlichkeiten der Konsensussequenzen für CaMKII und PKA Phosphorylierungen die bereits vorhandenen punktmutierten Fusionsproteine (siehe oben) genutzt werden. Lediglich eine einzige Punktmutante (T111A) war nicht vorhanden und wurde von Stephan Sonntag (Bonn) im Rahmen seiner sonstigen biochemischen Arbeiten zu dem Thema der Bindungsstudien der CaMKII an Cx36 kloniert, exprimiert und zur Verfügung gestellt:

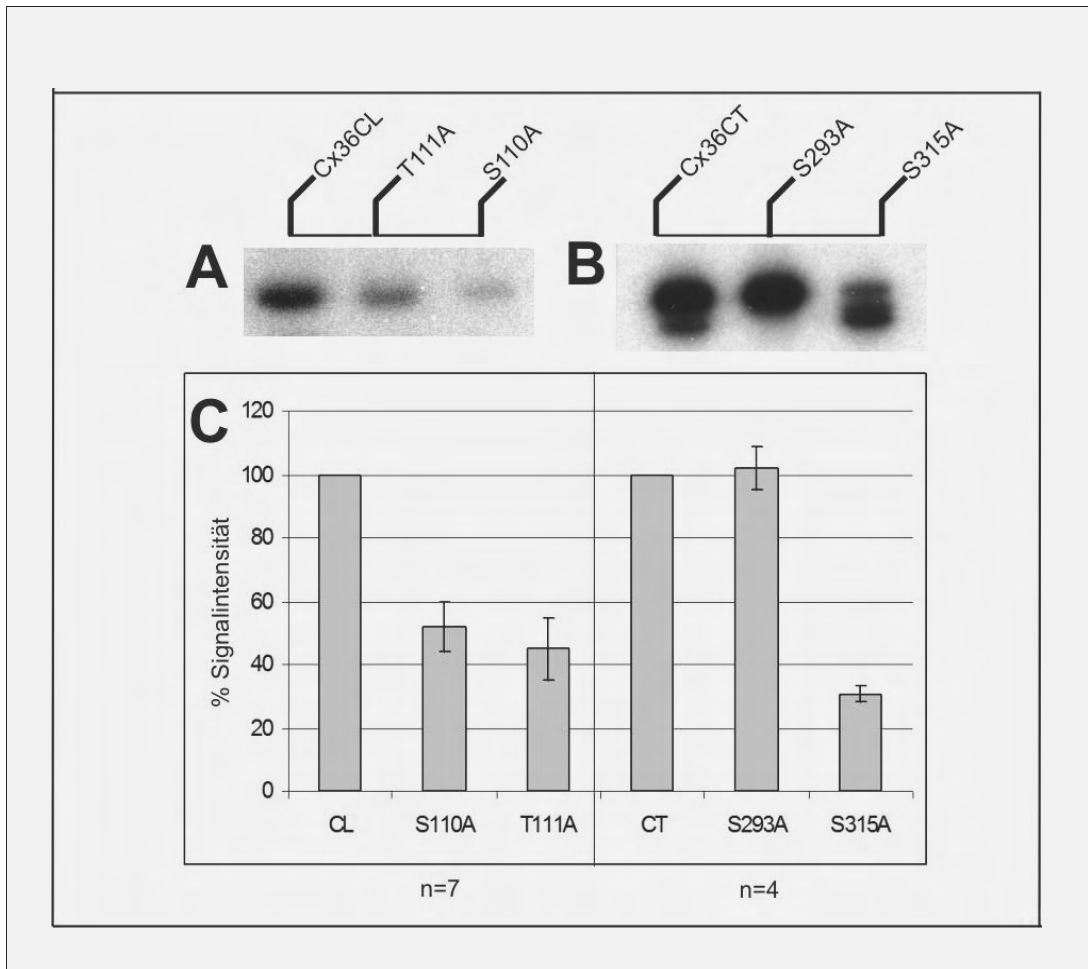


Abb. 4.6.:CaMKII-vermittelte *in-vitro* Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen der punktmutierten zytoplasmatischen Domänen des Cx36 Proteins

Dargestellt ist A: Autoradiographie von jeweils 15 µg immobilisiertem unmutiertem und mutiertem GST-Cx36CL Fusionsprotein, das in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP mit CaMKII *in vitro* phosphoryliert wurde; B: Autoradiographie von mutiertem und unmutiertem GST-Cx36CT Fusionsprotein, das in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP mit CaMKII *in vitro* phosphoryliert wurde; C: Darstellung der densitometrischen Quantifizierung des PKA-vermittelten Einbaus von  $^{32}\text{P}$ -gamma-ATP in die mutierten und unmutierten GST-Fusionsproteine.

Anhand der punktmutierten Fusionsproteine konnte gezeigt werden dass die CaMKII Phosphorylierungsstellen sich mit den PKA Phosphorylierungsstellen überschneiden.

Die CaMKII scheint in der Lage zu sein, sowohl S110 als auch T111 zu phosphorylieren (Abb. 4.6). Der Serinrest an Position 110 in der zytoplasmatischen Schleife des Connexins kann offenbar von beiden Kinasen genutzt werden, während der Serinrest im C-Terminus an Position 293 lediglich von der PKA (siehe 4.1.6) phosphoryliert werden kann, nicht aber von der CaMKII, die im C-Terminus offenbar hauptsächlich den Serinrest an Position 315 phosphoryliert.

#### 4.1.9 Die zytoplasmatischen Domänen von Cx45 sind ebenfalls Substrat für PKA und PKC *in vitro*

Neben dem Connexin36 ist auch das Connexin45 möglicherweise Ziel von Kinasen und wird eventuell durch diese reguliert, wurde doch bereits beschrieben (Hertlein et. al., 1998), dass der Carboxyterminus des Connexin45 Proteins in HeLa Zellen phosphoryliert vorliegen kann und dass der Austausch der terminalen Serine bzw. der Verkürzung des Proteins zu einer Verringerung der Halbwertszeit des Connexins und einer Abnahme der Phosphorylierung führt. Die für diese Phosphorylierung verantwortliche Kinase konnte hier allerdings nicht identifiziert werden. Vor diesem Hintergrund und der Möglichkeit der Phosphorylierung des Cx45 Proteins in der Retina bei heterotypischer AII-Amakrin-Bipolarzell-Kopplung, die nach Inkubation mit db-cAMP in einem noch stärkeren Maße sinkt als die AII Amakrinzell-homotypische Kopplung (siehe Abb. 4.5), und so die Aktivität von einer cAMP -abhängigen Kinase auf der Seite der Bipolarzellen denkbar macht.

Um Evidenzen für diese Hypothese zu finden, wurden analog zu der *in vitro* Phosphorylierung von Cx36 durch PKA entsprechende Experimente, wie auch Phosphorylierungsexperimente mit der Proteinkinase C (PKC) durchgeführt, da das Connexin45 Protein im Gegensatz zu dem Connexin36 Protein Konsensussequenzen für PKA wie auch für PKC (siehe Dissertation Stephan Maxeiner, 2005) enthält.

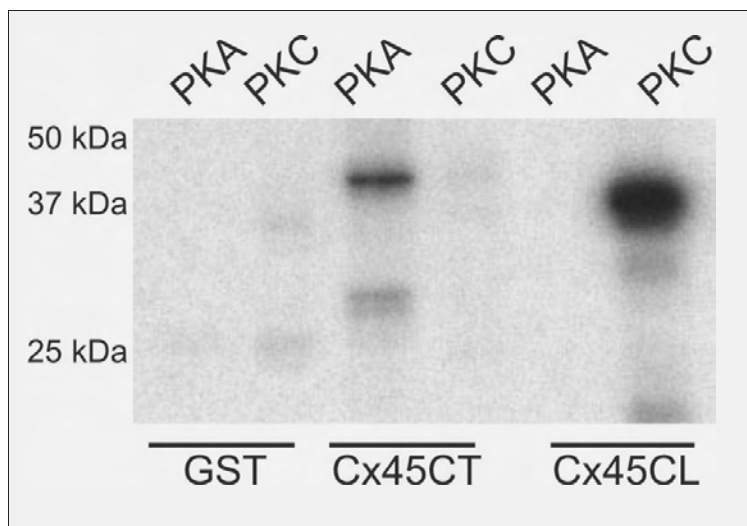


Abb. 4.7.: PKA-und PKC vermittelte *in-vitro* Phosphorylierung von GST-Fusionsproteinen der zytoplasmatische Domänen des Cx45 Proteins

Dargestellt ist die Autoradiographie von je 15 µg immobilisiertem GST, GST-Cx45CL und GST-Cx45CT Fusionsprotein, das in Gegenwart von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP mit PKA und PKC *in vitro* phosphoryliert wurde

Hier konnte gezeigt werden, dass das Connexin45 Protein ein Substrat für Kinasen wie PKA und PKC sein kann, wobei die PKA ausschliesslich den C-Terminus und die PKC ausschliesslich die cytoplasmatische Schleife des Proteins phosphorylieren kann.

## 4.2 Bindestudien an Connexin45

Um die biologische Funktion der Connexinproteine besser verstehen zu können sollten Experimente zur Identifikation der mit ihnen interagierenden Proteinen durchgeführt werden.

Diese Interaktionen mit anderen Proteinen oder Nukleinsäuren könnten modulierenden Einfluss auf die Funktion (Permeabilität für unterschiedliche Stoffe, Lebensdauer) der Connexine besitzen oder aber weitere Faktoren in einen möglichen Proteinkomplex rekrutieren, die dann ihrerseits eventuelle Funktionen ausüben könnten. Die Identifikation der entsprechenden Faktoren würde somit die Biologie der Gap Junction Proteine selber besser verständlich machen.

Hierzu sind Experimente notwendig, die entsprechende Interaktionspartner identifizieren und analysieren können, beispielsweise das Hefe-2-Hybrid-System oder biochemische Interaktionsassays wie sogenannte Pulldown-Systeme.

Hierzu wurde in dieser Arbeit ein MudPIT-vermessener GST-Pulldown (siehe 1.6 dieser Arbeit sowie Diplomarbeit Thorsten Höher, 2003) verwendet, um so das Proteingemisch, das in den entsprechenden Proben vorhanden ist, direkt zu analysieren und die Bestandteile identifizieren zu können.

Darüber hinaus wurden Interaktionskandidaten, die aus einem am Institut durchgeführten Hefe-2-Hybrid-System stammen (siehe S. Schlüter, Diplomarbeit 2003) auf ihre funktionelle Interaktion bzw. biologische Relevanz hin untersucht.

### 4.2.1 Analyse von Bindeproteinen der zytoplasmatischen Domänen von Cx45 mittels MudPIT (Multidimensionale Protein Identifikations Technologie)

### 4.2.2 Klonierung der cytoplasmatischen Domänen des Cx45 in den Expressionsvektor pGEX-6P-1

Um eine ausreichende Menge des GSTCx45CT bzw. GSTCx45CL Fusionproteins herstellen zu können, und später ggf. wieder das GST abzuspalten, erfolgte zunächst die Klonierung der beiden cytoplasmatischen Domänen des Connexin45(Cx45) in den bakteriellen, induzierbaren Expressionsvektor pGEX-6P-1.

Dieser Vektor wurde gewählt, um eine zwischen dem für das GST-Protein kodierenden Bereich und der multiplen Klonierungsstelle gelegene für spätere Experimente essentielle Sequenz nutzen zu können. Diese kodiert für eine Proteaseschnittstelle, wobei als eingesetzte Protease eine als GST-

Fusionprotein erhältlich verwendet wurde.

Nach erfolgter *Bam*HI/*Eco*RI Spaltung des Ausgangsplasmids pGEX-6P-1 wurden die entsprechenden Fragmente der mittels PCR über die Plasmide pGEX-5X-3Cx45CT sowie pGEX-5X-3Cx45CL (siehe Thorsten Höher, Diplomarbeit 2003) hergestellten und mit Schnittstellen versehenen für die cytoplasmatischen Bereiche des Connexins codierenden Regionen *Bam*HI/*Eco*RI gespalten und die so entstehenden klebrigen Enden in das Plasmid einligiert. Nach erfolgter Transformation in *E.coli* XL1 blue wurden Plasmid-DNS positiv geteste Klone in den proteasedefizienten und so zur Expression von Proteinen geeigneten Stamm *E.coli* BL21 retransformiert.

#### **4.2.3 Etablierung der Expression und Reinigung der Fusionsproteine**

Die genannten positiven BL21- Klone wurden einer Testinduktion unterzogen, wie bereits für andere GST-Expressionvektoren an anderer Stelle (Diplomarbeit von Thorsten Höher, 2003) eingehend beschrieben.

Das GST-Cx45CT-Fusionsprotein erwies sich als im Bateriaenlysispuffer löslich, das GST-Cx45CL-Fusionsprotein erwies sich als unter Standardbedingungen (siehe 3.5.5) unlöslich (nicht gezeigt).

Um die nötigen Proteinmengen für einen analytischen GST-Pulldown zu erhalten, wurde die Etablierung der Aufreinigung in einem größeren Maßstab notwendig. Es wurde eine induzierte 500 ml Kultur des GST-Cx45CT exprimierenden Klons präperativ aufgearbeitet. Hierzu wurde nach nativem Aufschluss der Bakterien und der Klärung des Lysats dieses über GSTrap-Säulen gegeben und nach ausgiebigem Waschen mittels eines Überschusses an Glutathion eluiert. Das so erhaltene hochreine Fusionsprotein wurde dann schliesslich zur Entfernung des Glutathion und zur Volumenreduzierung mittels Ultrafiltration eingengt, Exemplarisch für alle per GSTrap durchgeführten Präparationen löslicher GST-Fusionsproteine wird im Folgenden die Aufreinigung des GST-Cx45CT Fusionsproteins.

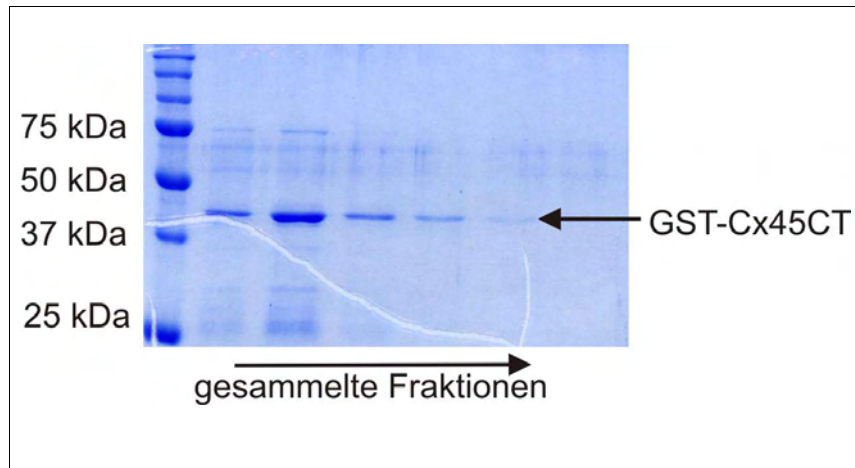


Abb 4.8.: **Reinigung der GST-Fusionsproteine über GSTrap-Säulen** Dargestellt ist eine coomassiegefärbte 12%ige SDS-PAGE, auf der je 12  $\mu$ l der 1 ml Elutionsfraktionen 1-6 des GST-Cx45CT Fusionsproteins aufgetragen sind. In der ersten Spur ist ein Proteinstandard aufgetragen.

Das GST-Cx45CL-Fusionsprotein erwies sich wie bereits oben erwähnt als unter Standardbedingungen als unlöslich (Abb. 4.8). Deswegen erfolgte zunächst die Abtrennung des sonstigen Bakterienproteoms per SDS-PAGE, dann eine inverse Färbung mittels Kaliumchlorid, in dessen Folge die induzierten Banden ausgeschnitten und einer Elektroelution unterzogen wurden (siehe 3.26).

Der resultierenden protein-und-detergentienhaltigen Lösung wurde anschließend das Detergenz sukzessive per Ultrafiltration soweit entzogen (siehe 3.29), so dass das Fusionprotein schliesslich wieder in der Lage war, an immobilisiertes Glutathion zu binden und so mit einer Rückfaltung des GST-Anteils und somit auch des Cx45CL-Anteils gerechnet werden kann. Das eng umgrenzte Ausschneiden aus dem Gel hat bei sorgfältiger Ausführung den positiven Nebeneffekt, dass das Protein nach erfolgter Rückfaltung bereits hochrein ist, was eine Affinitätsreinigung zur Abtrennung des Bakterienproteoms unnötig macht.

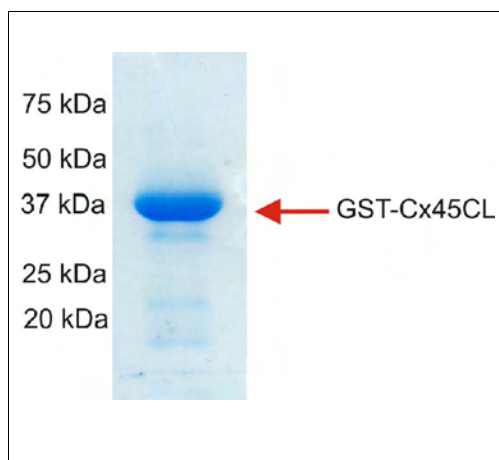


Abb. 4.9.: **Darstellung des rückgefalteten GST-Cx45CL Fusionsproteins.**

Dargestellt ist eine einzelne Spur einer coomassiegefärbten SDS-PAGE, auf der 21  $\mu$ l einer rückgefalteten Präparation des GST-Cx45CL Fusionsproteins aufgetragen sind. Das Fusionsprotein besitzt wie vorberechnet eine molekulare Masse von 37 kDa

Das so solubilisierte und renaturierte Protein wurde anschliessend auf seine Bindefähigkeit an eine Glutathion-Matrix getestet (nicht gezeigt) und kann nun für einen GST-Pulldown eingesetzt werden.



#### **4.2.4 Durchführung des GST-Pulldowns und die Probenvorbereitung für MudPIT**

Adulten Mäusen wurden nach Tötung durch cervikale Dislokation die Herzen entnommen, gründlich von Blut und Geweberesten mittels PBS gereinigt, in flüssigem Stickstoff zerklopft und lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden in TX-100-Puffer aufgenommen, sonifiziert und die nichtlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (siehe 3.10.3).

Ebenso wurde das Lysat von HM-1 Zellen für einen Pulldown gegen den C-Terminus von Cx45 eingesetzt, um hier ein Korrelat zu den Hefe-Zwei-Hybrid-Daten aus der Diplomarbeit von Shahrazhad Schüter (2003) zu schaffen, hier wurde die Zellyse und die Aufbereitung der Proben wie für Proteinlysate üblich durchgeführt (siehe 3.10.4.). Für die Pulldownexperimente wurden pro Ansatz 2 mg Protein des Lysates eingesetzt. Es wurden stets Zweifach- oder Dreifachproben pro Experiment durchgeführt, die Pulldownexperimente wurden am Institut für Genetik in Bonn durchgeführt, der tryptische Verdau wurde in Zusammenarbeit mit Cantas Alev im Labor von Dr. Dirk Wolters (Bochum) oder am Institut für Genetik (Bonn), die massenpektrometrische Analyse von Cantas Alev oder Dr. Dirk Wolters in dessen Labor (Bochum) durchgeführt.

Die Ergebnisse der GST-Pulldown-Experimente wurden zunächst mittels manuellem Abgleich der daraus resultierenden Excel-Listen ausgewertet (Cx45CT Pulldown gegen Herzlysate), später wurde die Auswertung selbst vorgenommen (Cx45CT Pulldown gegen HM-1) Lysat. Wiederum später wurde die Auswertung von Dr. Wolters persönlich mit Hilfe einer speziellen Software (DTAselect v1.9) vorgenommen, die eine computerunterstützte Auswertung der Listen ermöglicht.

Im Folgenden wird lediglich auf die Ergebnisse und ausgewählte, möglicherweise interessante Bindungspartner eingegangen.

Beispielhaft wird hier ein Auszug aus einer typischen Tabelle nach Auswertung der Ergebnisse dargestellt:

	A	B	C	D	E	F	G	Ac
1		Reference					Score	
2		Scan(s)	Sequence	MH+	Charge	XC	Delta Cn	
3	#274	opticin [Mus musculus]					12,13	169
4		875	L.QDLILPENQL.A	1183,34	1	2,07	0,11	
5		990	L.QDLILPENQL.A	1183,34	1	1,79	0,02	
6		1042	L.QDLILPENQL.A	1183,34	1	1,86	0,04	
7	#275	NMN adenylyltransferase; nicotinamide					12,13	200
8		1211	N.DISSTKIR.R	920,05	1	1,74	0,03	
9		1264	N.DISSTKIR.R	920,05	1	1,52	0,11	
10	#276	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral					12,08	67
11		271	G.NPQGAFLIR.E	1016,18	1	1,61	0,13	
12		322	G.NPQGAFLIR.E	1016,18	1	1,59	0,26	
13	#277	S26062 nonhistone chromosomal prote					10,71	74
14		1648	N.YVSPKGDK.K	894,01	1	1,61	0,07	
15		2106	K.KLGEMWSEQSAKEKQPYEQKAAKL.K	2809,19	3	3,96	0,53	
16	#278	I49729 HD protein - mouse					10,57	21
17		128	L.TILAR.A	573,71	1	1,73	0,00	
18	#279	treacle [Mus musculus]					10,57	67
19		256	S.QVRAASAPAK.E	999,15	1	1,53	0,12	
20	#280	PIGO_MOUSE Phosphatidylinositol-gl					10,54	222
21		2167	H.ALWLIGILLFTRLAGLF.H	1975,45	2	2,89	0,07	
22	#281	T13650 zinc finger protein 95B7.6 - fruit					10,52	75
23		2666	E.EEHQLAQSGDQEEHITMES.V	2327,39	2	2,66	0,04	
24	#282	similar to alpha-interferon - mouse [Mu					10,50	208
25		60	S.AHAVALR.K	737,87	1	1,58	0,05	
26	#283	ACHD_MOUSE Acetylcholine receptor					10,46	1
27		1998	V.ALSLTLNLSLKE.V	1502,78	2	2,93	0,00	
28	#284	DREB_MOUSE Drebrin (Development					10,43	204
29		1180	V.EDIDAGAIGQRLSNGLAR.L	1857,02	2	2,53	0,49	
30		2120	E.VTSSQPPPPPPPTQE.A	1851,05	2	2,73	0,53	
31	#285	interleukin 7 [Mus musculus]					10,43	66
32		2242	S.QGTQLVNCTKE.E	1409,55	1	1,61	0,05	

Abb. 4.10.: Beispiel einer MudPIT-Liste, in der tryptischen Fragmenten Proteine zugeordnet werden

*Scan*: Proteinzuordnung aufgrund der SEQUEST-Analyse. *Sequence*: tryptisches Fragment. *MH+*: theoretisches Molekulargewicht des tryptischen Fragments. *Charge*: Ladung. *XC*: X-Correlation-Wert. Beispielfhaft dargestellt ist eine Liste stammend aus einem Pulldown von Cx45CT aus Herzlysate von WT Mäusen

Durch die MudPIT-Analyse mittels SEQUEST werden Excel-Listen erstellt, in denen tryptische Fragmente, deren Ladung und eine Vielzahl weiterer Parameter bestimmten bekannten Proteinen zugeordnet sind (alle entsprechenden Tabellen finden sich im elektronischen Anhang). Abb. 4.3 stellt einen Ausschnitt einer solchen Tabelle exemplarisch dar. Um nun aus dieser Informationsvielfalt den Kreis möglicher Interaktionspartner einzuengen, ist es notwendig, bestimmte Kriterien anzulegen. Zwei dieser Kriterien haben ausschließenden Charakter: (a) Alle Proteine, die in den Listen der GST-Kontrolle aufgeführt sind, sind als „falsch-positiv“ zu werten, auch wenn sie nur in einem von drei Experimenten vorliegen. (b) Nur diejenigen Proteine, die in mehr als zumindest zwei von drei Ansätzen aufgelistet werden, sind als Kandidaten in Betracht zu ziehen. Zwei weitere Kriterien ergeben sich aufgrund der Algorithmen des Programmes, was die Zuordnung veranlasst und ein Maß über die Qualität des gemessenen Spektrums darstellt: (c) Bei geladenen Proteinen sollte der X-correlation-Wert 1,5 bei einfach geladenen, 2,5 bei zweifach und 3 bei dreifachgeladenen Proteinen überschreiten. (d) Sollte einem Kandidatenprotein mehrere tryptische Fragmente zugeordnet werden, erhöht dies die Wahrscheinlichkeit, dass ein Protein richtig zugeordnet worden ist.

#### 4.2.5 Eine Auswahl von Proteinen, die an die zytoplasmatischen Domänen von Connexin45 binden

<i>Bezeichnung</i>	<i>Gefunden in [Domäne, Lysat]</i>	<i>Referenz</i>
<b>Endothelin I</b>	Cx45CT, Herzlysat	Reisner et al., 2008
<b>Lin7b</b>	Cx45CT, Herzlysat	Sudo et al., 2006
<b>MyL4</b>	Cx45CT, Herzlysat	Arnold et al., 1988
<b>CreatineKinaseM</b>	Cx45CT, Herzlysat	Lygate et al., 2007
<b>Praja1</b>	Cx45CL, Herzlysat	Saha et al., 2006
<b>Carbonyl-Reduktase 1</b>	Cx45CL, Herzlysat	Jiang et al., 2003
<b>CateninD2</b>	Cx45CT, HM-1-Lysat	Jones et al., 2002
<b>A kinase anchor protein 1 (AKAP1)</b>	Cx45CT, HM-1-Lysat	Chen et al., 2007

Tab 4.1 Tabellarische Auflistung ausgewählter putativer Interaktionspartner

#### 4.2.6 Klonierung und *in vitro* Translation der cDNS ausgewählter Bindekandidaten

Aus der Menge an möglichen Interaktionsproteinen wurden einige ausgewählt, deren Bearbeitung biologisch topologisch sinnvoll und darüber hinaus methodisch durchführbar ist (siehe 5.6). So wurden sich hier für die an den Carboxyterminus des Cx45 bindenden Proteine Lin7b, CreatinKinaseM, MyL4 und dem aus dem aus früheren Versuchen (S.Schlüter, 2003) stammenden Kandidat Gorasp2 (Shorter et al., 1999) entschieden.

##### 4.2.6.1 Klonierung der cDNS von Lin7b

Das vollständige offene Leseraster des Lin7B Proteins wurde mit Hilfe der Primer Lin7\_EcoRI\_for und Lin7b\_EcoRI\_rev erfolgreich aus cDNS von adulten Mäuseherzen amplifiziert, und nach *EcoRI*- Spaltung in den gleichfalls *EcoRI* gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pBluescriptII S/K inkloniert und mittels Testspaltungen und Sequenzierung auf Richtigkeit hin überprüft.

#### 4.2.6.2 Klonierung der cDNS von My-L4

Mit Hilfe der Primer MyL4ClaI\_USP und MyL4ClaI\_DSP wurde das vollständige offene Leseraster des My-L4 Protein aus der cDNS von adultem Mäuseherzen amplifiziert und nach *ClaI*-Spaltung in den gleichfalls *ClaI* gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pBluescriptII S/K inkloniert und mit Hilfe von Testspaltungen und Sequenzierung auf Richtigkeit hin getestet.

#### 4.2.6.3 Klonierung der cDNS von Creatine Kinase M

Das vollständige offene Leseraster des CreatineKinase M Proteins wurde mit Hilfe der Primer CrkM\_EcoRI\_for und CrkM\_EcoRI\_rev aus der cDNS von adulten Mäuseherzen amplifiziert und nach *EcoRI*-Spaltung in den gleichfalls *EcoRI* gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pBluescriptII S/K inkloniert und mittels Testspaltungen und Sequenzierung auf Richtigkeit hin überprüft.

#### 4.2.6.4 Klonierung der cDNS von Gorasp2

Über die Analyse der funktionellen Bindung der mittels Mud-PIT Analyse gewonnen Proteine hinaus sollte zusätzlich die Bindung des Gorasp2 Proteins untersucht werden (siehe 1.5) . Dessen erste Evidenz für eine Bindung stammt aus einer Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung (siehe Diplomarbeit S. Schlüter, 2003), bei der eine cDNS Bank benutzt wurde, die aus Embryonen des Tages 9.5 der embryonalen Entwicklung hergestellt wurde. Um die Biologie der Bindung des Gorasp2 Proteins an den Carboxyterminus des Connexin45 Proteins zu untersuchen, sollte zunächst die Gorasp2-cDNS isoliert und kloniert werden. Das vollständige offene Leseraster des Gorasp2 Proteins wurde mit Hilfe der Primer Gorasp2BglII\_USP und Gorasp2XhoI\_DSP aus der cDNS von ED9.5 Embryonen amplifiziert und nach *BglII/XhoI* Spaltung in den gleichfalls *BglII/XhoI* gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pBluescriptII S/K inkloniert und mittels Testspaltungen und Sequenzierung auf Richtigkeit hin überprüft.

Da der Vektor pBluescript-Gorasp2 in der *in vitro*-Translation (siehe 4.2.7) nur ein schwaches Signal lieferte, wurde die Gorasp2-cDNS in den für die *in vitro*-Translation optimierten Vektor pET23a kloniert.

Das per *EcoRI* gespaltene 1389 bp große Fragment, welches das offene Leseraster des Gorasp2 Protein repräsentiert, wurde in ebenfalls *EcoRI* gespaltenen und dephosphorylierten zur *in-vitro* Translation optimierten Vektor pET23a unter Kontrolle eines T7 Promotors kloniert und in Gegenwart von <sup>35</sup>S Methionin translatiert. Das so gewonnene, radioaktiv markierte Protein wiederum

wurde zu einem GST-Pulldown eingesetzt.

#### 4.2.7 *in vitro* Translation der klonierten Interaktionskandidaten

Die in den Vektor pBluescript II S/K bzw. pET23a unter Kontrolle des T7-Promotors klonierten offenen Leseraster der Interaktionskandidaten wurden zunächst in Gegenwart von  $^{35}\text{S}$ -Methionin als einzige Methioninquelle in Kaninchen Retikulozytenlysat *in vitro* translatiert (siehe 3.23) und auf die korrekte Wandergeschwindigkeit in einer SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie hin untersucht.

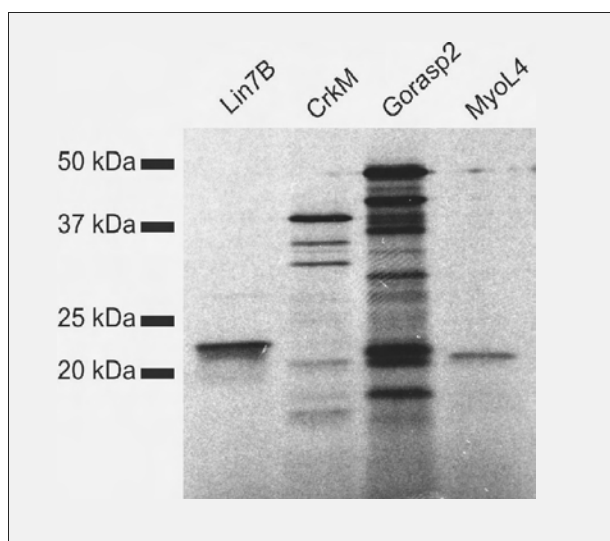


Abb. 4.11.: *in vitro* Translation der cDNS der Proteine Lin7B, CrkM, Gorasp2 und MyoL4

Dargestellt ist die Autoradiographie einer 12%igen SDS-PAGE, auf der die Translatate über das in ihnen eingebaute  $^{35}\text{S}$  Methionin sichtbar gemacht wurden. Die Masse der Proteine ist wie vorherberechnet 23 kDa, 43 kDa, 47 kDa und 21 kDa, respektive, von links nach rechts. Unterhalb der jeweiligen Höhe der vollständigen Produkte zu sehende Banden stellen entweder Degradation oder aber wahrscheinlicher Syntheseabbruchprodukte dar. Einsatz des Translationsansatzes jeweils 2  $\mu\text{l}$ , Autoradiographie für 3 Tage exponiert

Alle vier hier untersuchten Proteine liefen auf der vorherberechneten Höhe (Abb 4.11), es kann also davon ausgegangen werden, daß sie in voller Länge translatiert wurden und somit für eine GST-Pulldown-Analyse eingesetzt werden können.

#### 4.2.8 Erste Studien zur Bindung der Kandidatenproteine an den C-Terminus des Cx45

Die entsprechenden GST-Pulldown Analysen wiesen in zwei Fällen (Gorasp2, CreatinkinaseM) eine Bindung zu den immobilisierten Proteinen auf, im Falle des Proteins Lin7B und des Proteins MyoL4 konnte in keinem Fall unabhängig von der Waschstringenz eine Bindung beobachtet werden (nicht gezeigt). Diese beiden putativen Interaktionspartner wurden daraufhin als falschpositiv verworfen.

Das Protein CreatinekinaseM (CrkM) hingegen war in der Autoradiographie der GST-Pulldown-Experimente stets nachweisbar:

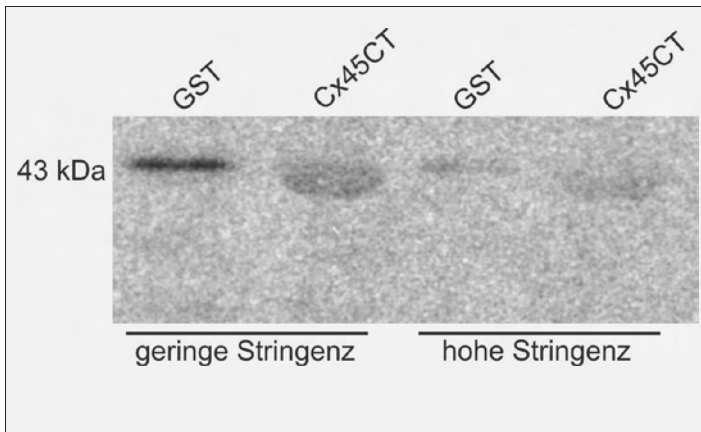


Abb. 4.12.: **Pulldown von *in vitro* translaterter CreatinKinaseM mit den immobilisierten Proteinen GST und GST-Cx45CT**

Dargestellt ist die Autoradiographie einer SDS-PAGE, auf der die Translatate des CrkM Proteins über das in ihnen eingebaute  $^{35}\text{S}$  Methionin sichtbar gemacht wurden. CrkM läuft wie erwartet auf 43 kDa. Als Waschpuffer benutzt wurden PLP-Puffer (geringe Stringenz) und 1:1 PLP zu Puffer J gemischten Puffer (hohe Stringenz), Einsatz des Translationsansatzes betrug jeweils 10  $\mu\text{l}$  für Pulldownproben, Autoradiographie für 3 Tage exponiert.

Unabhängig von der gewählten Waschstringenz und der Blockierungsmethode ist stets eine Bindung des Proteins CrkM sowohl an das GST-Cx45CT Fusionsprotein als auch an die GST Kontrolle zu beobachten (Abb. 4.12). Bemerkenswert allerdings ist die ungewöhnliche Form der CrkM-Bande in den GST-Cx45CT-Fusionsprotein enthaltenden Proben. Sie ist augenscheinlich wolkiger und nicht so prägnant fokussiert wie die in der GST-Kontrolle zu sehende Bande. Zu beachten ist, dass das koeluierte Fusionsprotein im Falle des GST-Cx45CT auf genau der gleichen Höhe wie das CrkM Protein läuft. Klassischerweise wäre hier im denaturierendem SDS-Gel eine Verdrängung des radioaktiv markierten CrkM Proteins durch das unmarkierte, in der Autoradiographie nicht nachweisbare GST-Cx45CT Fusionsproteins zu erwarten. Im Gegensatz dazu scheint hier eher das Fusionsprotein die radioaktive Markierung zu tragen. Da dieses Experiment hinsichtlich einer Bindung der CrkM an GST-Cx45CT nicht aussagekräftig war, wurde dieser mögliche Interaktionspartner nicht weiter verfolgt.

#### 4.2.9 Analyse der Bindung von Gorasp2 an den C-Terminus von Cx45

##### 4.2.9.1 Gorasp2 bindet *in vitro* an des Carboxyterminus des Cx45

Mit dem  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierten Gorasp2 Protein wurde ebenfalls ein GST-Pulldown durchgeführt, wobei Waschpuffer mit verschiedenen Stringenzen eingesetzt wurden:

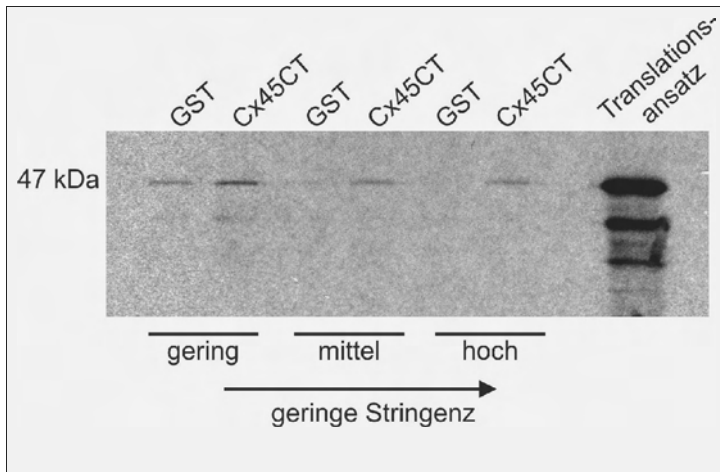


Abb. 4.13.: **Pulldown von *in vitro* translatiertem Gorasp2 mit den immobilisierten Proteinen GST und GST-Cx45CT**

Dargestellt ist die Autoradiographie einer SDS-PAGE, auf der die Translatate des Gorasp2 Proteins über das in ihnen eingebaute  $^{35}\text{S}$  Methionin sichtbar gemacht wurden. Gorasp2 läuft wie vorherberechnet auf 47 kDa. Als Waschpuffer benutzt wurden in diesen Pulldownexperimenten  $\text{PBS}^+$ , (geringe Stringenz), PLP-Puffer (mittlere Stringenz) und 1:1 PLP zu Puffer J gemischten Puffer (hohe Stringenz), von links nach rechts aufgetragen. Einsatz des Translationsansatzes: 10  $\mu\text{l}$  für Pulldownexperimente, 2  $\mu\text{l}$  für die Kontrolle, Autoradiographie für 5 Tage exponiert

In der Autoradiographie (Abb. 4.13) klar nachweisbar ist eine Bindung des Gorasp2 Proteins an das GST-Cx45CT Fusionsprotein.

Hier konnte also die im Hefekern (Hefe-2-Hybrid Assay, S. Schlüter Diplomarbeit, 2003) gemessene Interaktion auch mit einer weiteren unabhängigen biochemischen Methode *in vitro* gezeigt werden.

Um die Assoziation der beiden Proteine in Zellkultur testen zu können, wurde das Gorasp2 Protein als Fusionkonstrukt mit dem verstärkt gelb fluoreszierenden Protein eYFP kloniert und im Folgenden in verschiedene Zelllinien transfiziert.

#### 4.2.9.2 Klonierung der Gorasp2-cDNS als Fusionsprotein mit dem verstärkt gelb fluoreszierenden Protein YFP

Mittels PCR über den Vektor pBluescriptII\_S/K\_Gorasp2 unter Benutzung der Oligonukleotidstartermoleküle USP-G2inYFPzeo und DSP-G2inYFPzeo und anschließender Spaltung mittels *Bam*HI wurde die codierende Region des Gorasp2 Proteins in den zuvor *Bam*HI gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pCaMKII-YFP (erhalten von Stephan Sonntag) einkloniert, einer Testspaltung unterzogen und sequenziert. Besonders stand hier die Möglichkeit im Vordergrund, aufgrund der Fluoreszenz der YFP-Markierung und des Vorhandenseins einer Cx45-eCFP exprimierenden HeLa Zelllinie Beobachtungen der beiden Proteine an lebenden Zellen durchführen zu können.

#### 4.2.9.3 Klonierung der Gorasp2-cDNS als Protein mit N-terminaler und C-terminaler FLAG-Markierung

Weiterhin wurde die Klonierung des offenen Leserasters des Gorasp2 in den Vektor pCDNA\_zeo durchgeführt, um ein weiteres mit Immuno-Blot und Immunfluoreszenz nutzbares Werkzeug zu erhalten. Hierzu wurde mittels PCR über den Vektor pBluescriptII\_S/K\_Gorasp2 unter Benutzung der Oligonukleotidstartermoleküle BglII-FlagG2\_USP und XhoI-G2Flag\_DSP mit anschließender Spaltung mittels *Bam*HI/*Xho*I die codierende Sequenz des Gorasp2 Proteins einmal N-Terminal und einmal C-Terminal mit einem Flag-tag versehen in den mit *Bam*HI und *Xho*I verdauten Vektor pCDNA\_zeo einkloniert und sequenziert.

Die so erhaltenen Vektoren wurden in Cx45 exprimierende HeLa Zellen (Klon 19, von Petra Kußmann) transfiziert. Um die erfolgreiche Transfektion nachzuweisen, wurden mittels eines Flag-Antikörpers Immunfluoreszenzanalysen und Immuno-Blot Analysen durchgeführt:

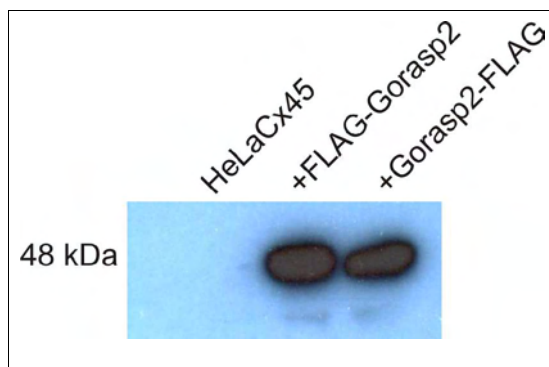


Abb. 4.14.: Immunoblot zum Nachweis von FLAG-markiertem Gorasp2 in transient transfizierten Lysaten

Immunoblot gegen das FLAG-Epitop, Verdünnung 1:2000, aufgetragen wurden HeLaCx45 Lysate, die z.T. transient mit den FLAG-Konstrukten transfiziert waren. Zweiter Antikörper aus Ziege, peroxidasegekoppelt anti Maus, 1:20000, nach ECL-Reaktion 5 min exponiert.

In der Immunoblotanalyse (Abb. 4.14) zu erkennen ist eine für das FLAG-fusionierte Gorasp2 Protein spezifische Bande bei 48 kDa, die Expression des FLAG-getagten Gorasp2 Proteins konnte so biochemisch nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde die Lokalisation des FLAG-Gorasp2 und des Gorasp2-FLAG Proteins in Cx45 stabil exprimierenden HeLa Zellen mittels Immunfluoreszenz untersucht:



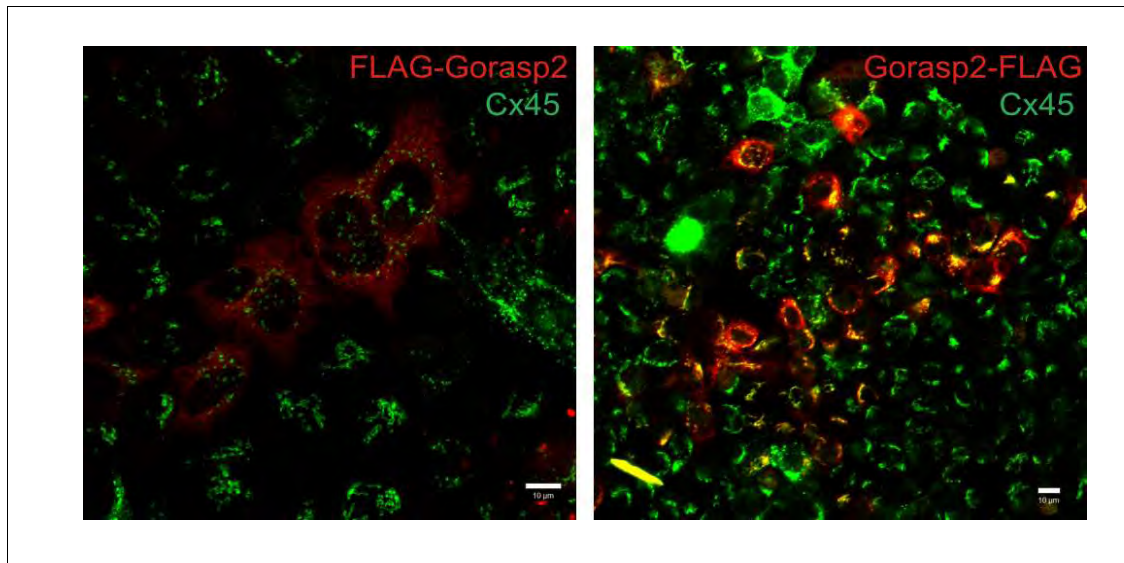


Abb. 4.15.: Immunfluoreszenznachweis von FLAG-markiertem Gorasp2 sowie Cx45 in HeLaCx45- Zellen

Dargestellt nach einer Ethanolfixierung (100%, 5 min) die Immunfärbung gegen das Cx45 Proteins in grün dargestellt und das FLAG-Epitop in rot dargestellt, HeLaCx45, Grössenbalken: 10 µm

Zu erkennen ist in Abb. 4.15 die Lokalisation des FLAG-markierten Gorasp2 Proteins (in rot dargestellt) und die Lokalisation des Cx45 Proteins (in grün dargestellt). Überlappende Bereiche, in denen die beiden Proteine kolokalisiert sind, erscheinen als Mischfarbe in gelb. Zu bemerken ist die bei beiden Konstrukten sehr unterschiedliche Lokalisation des Gorasp2 Proteins: In den mit FLAG-Gorasp2 transfizierten Zellen ist die Lokalisation zytoplasmatisch-vesikulär, während die Lokalisation in mit Gorasp2-FLAG transfizierten Zellen (wie bei Shorter et al., 1999 für die Gorasp2 Isoform der Ratte als Golgi-ständig beschrieben) monopolar-perinukleär, als auch schwächer zytoplasmatisch zu beobachten ist. Ob diese Kolokalisation eventuell eine funktionelle Bedeutung besitzt und somit biochemisch nachweisbare Assoziation vorliegt, wird in 4.3.7 untersucht.

#### 4.2.9.4 Transiente Transfektion des Plasmids pGorasp2eYFP\_zeo in HeLa Zellen

Um die Lokalisation des Gorasp2-YFP Proteins auch in lebenden Zellen verfolgen zu können, wurde das Plasmid pGorasp2eYFP\_zeo in Cx45eCFP stabil exprimierende HeLa Zellen (Klon 157, hergestellt von S. Sonntag) transfiziert. Dieser Klon ist ebenfalls besser für die Analyse der Biologie der Interaktion von Cx45 und Gorasp2 geeignet, da bei den HeLaCx45eCFP (Klon 157)-Zellen das Cx45eCFP zu einem grossen Teil in der Plasmamembran lokalisiert ist.

#### 4.2.9.5 Kolokalisation von Cx45eCFP und Gorasp2eYFP in HeLaCx45eCFP-Zellen

Die so zwei fluoreszierende Proteine exprimierenden Zellen wurden 48 h nach der transienten Transfektion unter dem Laser Scanning Mikroskop analysiert:

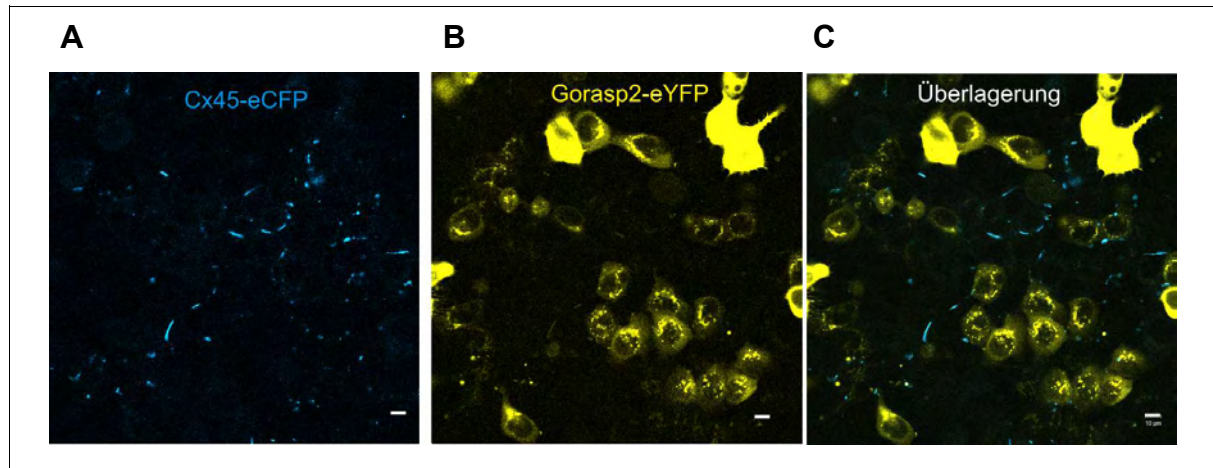


Abb. 4.16.: Fluoreszenzanalyse von Cx45eCFP und Gorasp2eYFP in HeLa Zellen

Dargestellt sind unfixiert transient mit pGorasp2eYFP\_zeo transfizierte stabile HeLaCx45eCFP Zellen (Klon 157), eCFP-Fluoreszenz in blau (A), eYFP-Fluoreszenz in gelb (B) dargestellt, Grössenbalken: 10 µm

Zu erkennen ( Abb. 4.16) ist daß Gap Junction Plaques ausbildende Cx45eCFP Protein wie auch das eher Golgi ständige Gorasp2-eYFP Protein. Eine offensichtliche Kolokalisation wurde nicht nachgewiesen, d. h. das fluoreszenzmarkierte Gorasp2-Protein kommt nicht in den Gap Junction Plaques vor. Es scheint in diesem Falle keine Evidenz für eine funktionelle Bindung in HeLa Zellen zu gegeben.

#### 4.2.9.6 Kolokalisation von Cx45eCFP und Gorasp2eYFP in N2A-Zellen

Um nicht nur das stark artifizielle System der ursprünglich aus einem humanem Cervixcarcinom stammenden HeLa Zellen zu nutzen, wurde eine Doppeltransfektion der Vektoren pCx45eCFP\_puro (S. Sonntag) und pGorasp2eYFP\_zeo in die murine Neurblastomzelllinie N2A durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden 48 h nach Transfektion unter dem Laser Scanning Mikroskop analysiert:

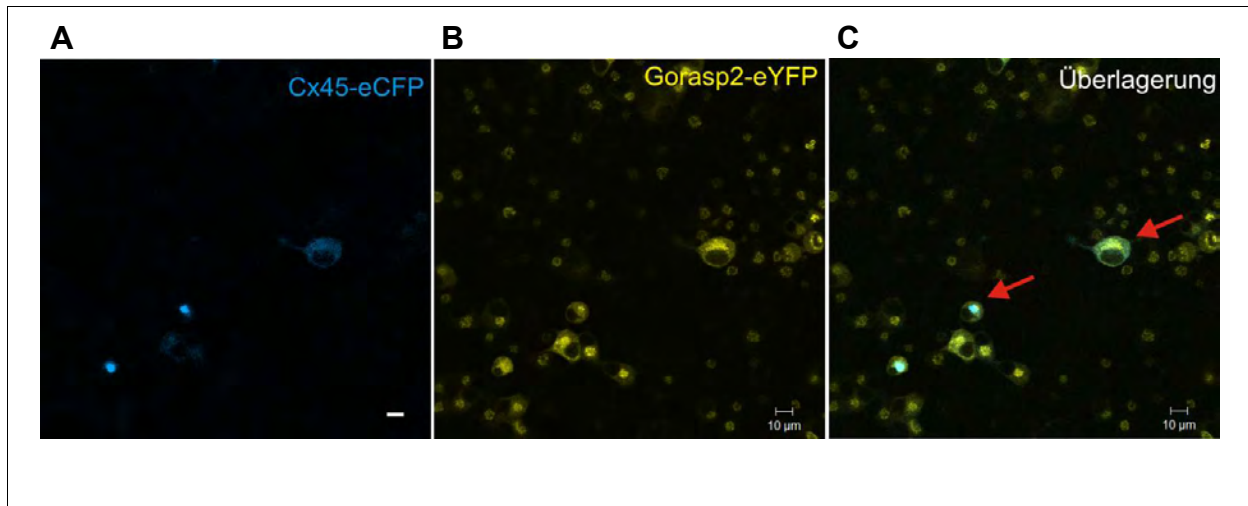


Abb. 4.17.: **Fluoreszenzanalyse von Cx45eCFP und Gorasp2eYFP in N2A Zellen**

Dargestellt sind unfixiert transient mit pGorasp2eYFP\_zeo und pCx45eCFP\_puro doppelt transfizierte N2A-Wildtyp-Zellen, eCFP-Fluoreszenz in blau, eYFP-Fluoreszenz in gelb dargestellt, Pfeile markieren eine Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle, Grössenbalken: 10 µm

In Abb. 4.17 zu sehen ist eine cytoplasmatische Lokalisation des Cx45eCFP Proteins, nur höchst selten ist eine plasmamembranständige Lokalisation zu beobachten. Dies war auch in einzeln mit dem pCx45eGFP\_puro transfizierten N2A Zellen der Fall (nicht gezeigt). Es wurde bereits zuvor beschrieben, dass Cx45 in N2A Zellen die Plasmamembran im Normalfall nicht erreicht (Friso Postma, persönliche Mitteilung). Die Expression des Gorasp2eYFP Proteins hingegen ist wiederum (wie bei Shorter et al. 1999) monopolar-perinuklär. Auch wenn in diesen Zellen das Cx45eCFP Protein und das Gorasp2eYFP Protein kolokalisieren, ist zu vermuten, dass diese Kolokalisation auch ohne die Anwesenheit des Gorasp2eYFP durch die Akkumulation des Cx45eCFP Proteins zustande kommt, da dieses in einzeln transfizierten Zellen auch der Fall ist.

Die gleichzeitige Transfektion von N2A Zellen mit dem Plasmid pGorasp2YFP\_zeo und dem Plasmid pCx45eCFP\_puro zeigt eine gute Transfektionsrate des Gorasp2eYFP Proteins, während das Cx45eCFP Protein von viel weniger Zellen exprimiert zu werden scheint.

#### 4.2.9.7 Biochemische Charakterisierung der Interaktion des Gorasp2 mit Cx45 in HeLa-Zellen

Zur Bestätigung der Interaktion des Gorasp2eYFP Protein mit Cx45 in HeLaCx45 Zellen wurden Pulldown-Experimente und Co-Immunopräzipitationen von mit pGorasp2eYFP\_zeo transient transfizierten HeLaCx45 Zellen durchgeführt.

#### 4.2.9.8 Pulldown aus Gorasp2eYFP transfizierten Lysaten

Aus transient mit Gorasp2eYFP transfizierten HeLaWT Zellen wurde ein Proteinlysate hergestellt und in einem GST Pulldown-Experiment eingesetzt. Jede Pulldownprobe wurde mit 1 mg Proteinlysate inkubiert, zur Positivkontrolle wurden 10 µg Protein des Lysates eingesetzt. Zum Nachweis des gebundenen Gorasp2eYFP wurden gegen das verstärkt grün fluoreszierende Protein (eGFP) gerichtete Antikörper im Immunoblot benutzt.

Als Köderproteine wurden hier GST-Fusionsproteine eingesetzt, die, vollständig oder in Teilen, die Carboxytermini der Connexine Cx45 und Cx43 darstellen. Die Fusionsproteine, die die Deletionskonstrukte des Connexin45 C-Terminus darstellen (siehe Thorsten Höher, Diplomarbeit 2003, sowie Stephan Maxeiner, Dissertation 2005) wurden verwendet, um die Bindestelle des Gorasp2 Proteins an den Cx45CT einzugrenzen; das GST-Cx43CT Fusionsprotein (P. Kussmann) wurde aufgrund der Ähnlichkeiten des Cx43 CT zu dem Cx45CT hinzugenommen.

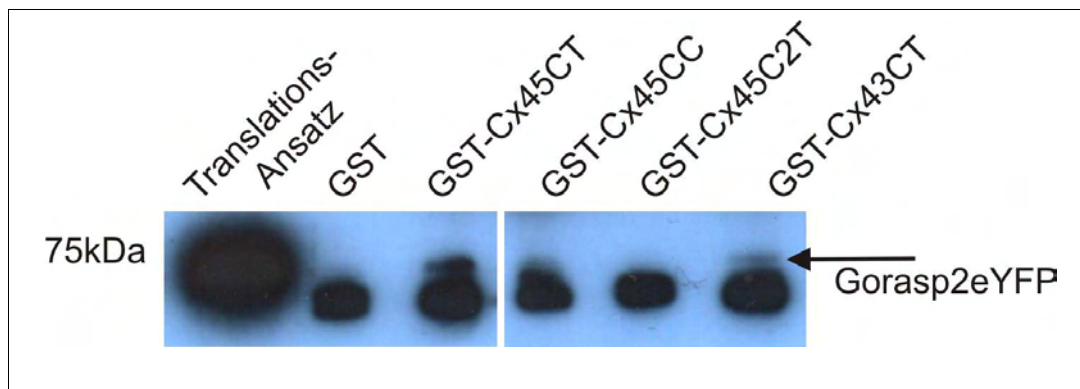


Abb. 4.18.: Immunoblot zum Nachweis von Gorasp2eYFP im Pulldown-Experiment

Immunoblot gerichtet gegen Gorasp2eYFP, 1. Antikörper gegen eGFP, zum Pulldown eingesetzt wurden transient mit pGorasp2eYFP\_zeo transfizierte HeLa Wildtyp Lysate, nachzuweisen ist die spezifische Bindung des Gorasp2 an die Fusionsproteine GST-Cx45CT, GST-Cx45CC sowie GST-Cx43CT

In Abb. 4.18 zu erkennen ist, dass bei langer Exposition des ECL-Films ein schwaches, wenn auch spezifisches Signal für das gebundene Gorasp2eYFP Protein für die Pulldownproben GST-Cx45CT, GST-Cx45CC sowie GST-Cx43CT nachgewiesen werden kann. Hier ist also, analog zu dem Experiment mit *in vitro* translatiertem Protein, ein Pulldown des Gorasp2eYFP mittels des GST-Cx45CT Fusionsproteins möglich. Die in allen Pulldownproben unterhalb der spezifischen Banden zu sehenden starke Banden stellen unspezifische Signale dar. Eine schwache Bindung ist ebenfalls an das GST Fusionsprotein GST-Cx45CC zu erkennen, welches eine trunkierte Version des

Carboxyterminus des Cx45 darstellt, ausserdem scheint eine Bindung an den C-Terminus von Cx43 vorzuliegen.

#### 4.2.9.9 Co-Immunopräzipitation von Cx45 und Gorasp2eYFP aus HeLa-Lysaten

Neben dem erneuten Pulldown des mit eYFP markiertem Gorasp2-Protein aus einer Zelllinie sollte nun auch der Proteinkomplex in der Zelle nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt, um so eine Assoziation der beiden Proteine in der Zelle nachweisen zu können. Hierzu wurde zunächst ein Proteinlysate aus stabil transfizierten HeLaCx45eCFP Zellen hergestellt und die Fähigkeit der gegen den C-Terminus von Cx45 gerichteten monoklonalen Antikörper getestet, sich an ProteinG Sepharose immobilisieren zu lassen und daraufhin Cx45eCFP Protein zu binden. Die Präzipitation des Cx45eCFP-Proteins wurde daraufhin mittels SDS-PAGE mit anschliessendem Immunoblot und dem Nachweis des eCFP mit gegen eGFP gerichteten Antikörpern durchgeführt:

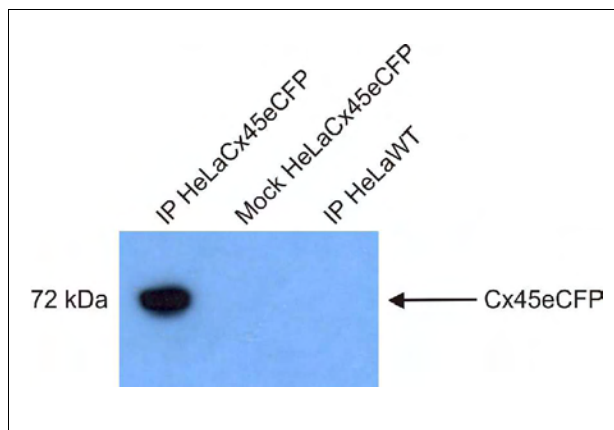


Abb. 4.19.: **Immunoblot zum Nachweis von präzipitiertem Cx45eCFP**

Immunoblotanalyse einer IP mit anti-Cx45 Antikörpern aus der Maus zur Präzipitation von Cx45eCFP; Immunoblotantikörper gerichtet gegen Cx45eCFP, aufgetragen wurden die Präzipitationen von Cx45eCFP aus stabil transfizierten HeLaCx45eCFP Zellen (Klon 157), mit und ohne präzipitierenden Antikörper, sowie HeLa WT Zellen

Die erfolgreiche Präzipitation des Cx45eCFP Proteins durch die auf der Protein-G Sepharose immobilisierten gegen Cx45 gerichteten Antikörper konnte hiermit erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 4.19) und macht so die Co-Immunopräzipitation von Cx45 und Gorasp2eYFP im folgenden Experiment möglich.

Proteinlysate aus transient mit Gorasp2eYFP transfizierten HeLaCx45 Zellen (Klon 19) wurde hier zu einer Immunpräzipitation eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein transient mit Gorasp2eYFP transfiziertes Lysate aus HeLa WT Zellen eingesetzt, das somit kein Cx45 Protein enthält. Jeweils 1,5 mg Protein wurden zur Immunpräzipitation eingesetzt, zur Kontrolle des Lysates per Immunoblot hingegen lediglich jeweils 20 µg Protein.



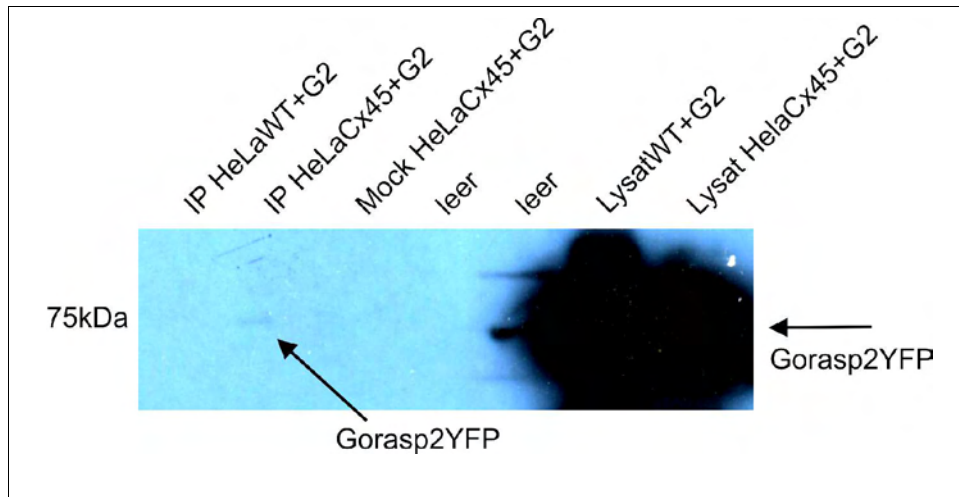


Abb. 4.20.: Immunoblot zum Nachweis von präzipitiertem Cx45eCFP

Immunoblotanalyse einer IP mit anti-Cx45 Antikörpern aus der Maus zur Präzipitation von Cx45; Immunoblotantikörper gerichtet gegen GFP, aufgetragen wurden die Präzipitationen von Cx45 aus stabil transfizierten HeLaCx45 Zellen (Klon 19), mit und ohne präzipitierenden Antikörper, oder HeLa WT Zellen, beide Zelllinien sind zusätzlich transient mit pGorasp2eYFP\_zeo (im Bild abgekürzt mit „G2“) transfiziert.

Das Gorasp2eYFP Protein konnte in der Co-Immunopräzipitation, zwar auch bei langer Expositionszeit nur äusserst schwach, dafür aber reproduzierbar nachgewiesen werden (Abb. 4.20). Da die Kontroll-Co-Immunopräzipitation mit Lysat aus mit Gorasp2eYFP transfizierten HeLaWT Zellen sowie die Kontrollpräzipitation ohne Einsatz von gegen Cx45 gerichteten Antikörpern kein Signal aufwies, muss dieses schwache Signal jedoch als spezifisch angesehen werden.

#### 4.2.9.10 Kolokalisation von Cx45eCFP und Gorasp2eYFP 60 h nach Transfektion

Um einer nicht notwendigerweise golgiständige Interaktion des Cx45 Proteins und des Gorasp2 Proteins nachzuweisen, wurden Experimente fortgesetzt, die die Assoziation der beiden Proteine in transient mit Gorasp2eYFP transfizierten HeLaCx45eCFP Zellen genauer untersuchen sollten. So wurden in längeren Zeiträumen (bis zu 60 h) nach der transienten Transfektion die Assoziation der beiden fluoreszenzmarkierten Proteine unter dem Laser Scanning Mikroskop untersucht.

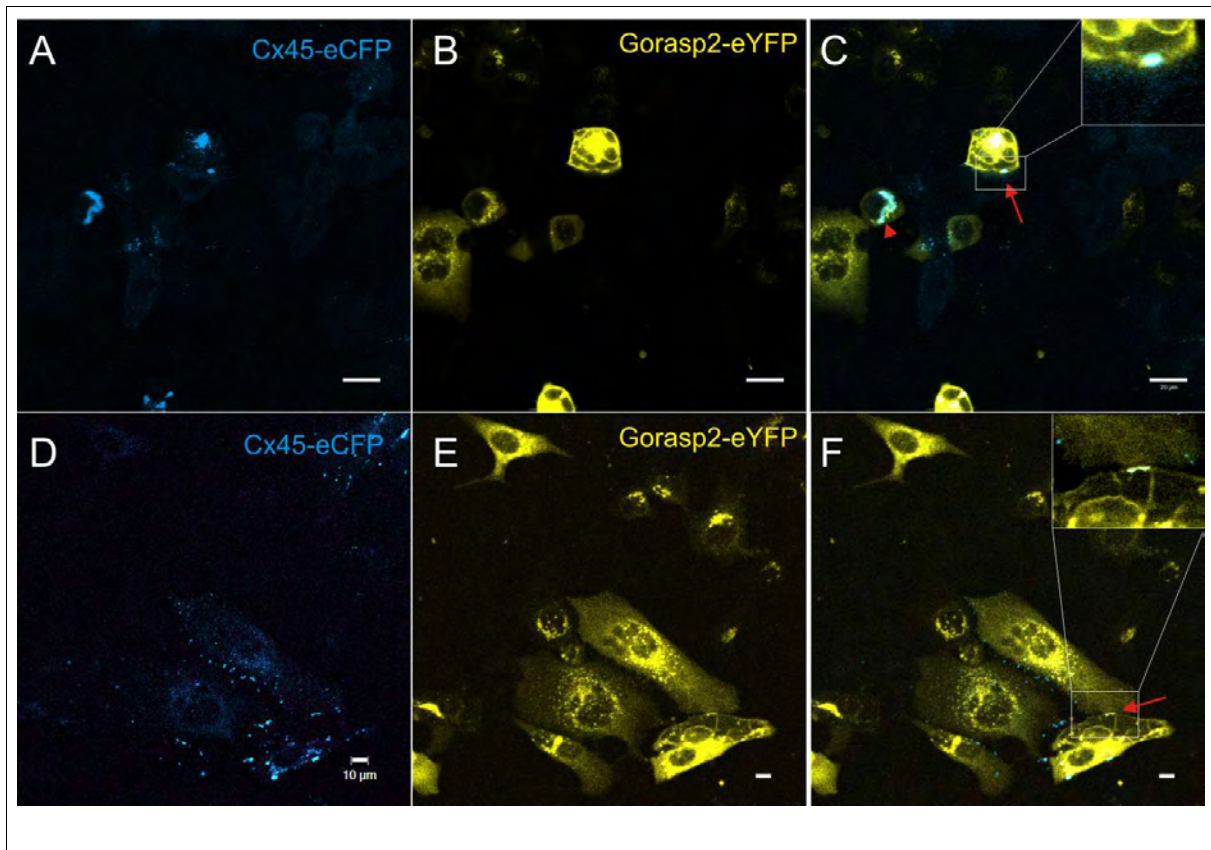


Abb. 4.21.: Fluoreszenzanalyse von Cx45eCFP und Gorasp2eYFP in HeLa Zellen

Dargestellt sind unfixiert transient mit pGorasp2eYFP\_zeo transfizierte HeLaCx45eCFP-Zellen, eCFP-Fluoreszenz in blau, eYFP-Fluoreszenz in gelb dargestellt, (C ist Überlagerung von A und B, F ist eine Überlagerung von D und E), roter Pfeilkopf: Kolokalisation innerhalb einer Zelle, roter Pfeil: Kolokalisation an einem Gap Junction Plaque; Grössenbalken: 20  $\mu\text{m}$  (A-C) und 10  $\mu\text{m}$  (D-F)

In diesen Bildern konnte erstmals eine Kolokalisation des Cx45eCFP Proteins mit dem Gorasp2eYFP Protein in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Bei den Zellen, in denen die Kolokalisation stattfindet, ist meist eine für HeLa Zellen abnorme Morphologie zu beobachten. So sind die Zellen größer als gewöhnliche HeLa Zellen und weisen ebenfalls eine untypische Gorasp2eYFP Lokalisation auf. In den Fällen, an denen die Kolokalisation an der Plasmamembran zu finden ist, ist zwar die Lokalisation des Gorasp2eYFP aus ebenfalls dort zu finden, dessen Fluoreszenz allerdings zeichnet präzise die Konturen des sich ortsgleich befindenden Gap Junction Plaques nach (siehe Pfeile in Abb.4.21). So kann hier eine zufällige Lokalisation ausgeschlossen werden.

#### 4.2.9.11 Stabile Transfektion von HeLa Zellen mit dem Vektor pGorasp2YFP\_blasto

Um weitere Hypothesen zur Lokalisation des Gorasp2eYFP Proteins und der Kollokalisierung von Cx45 und Gorasp2 testen zu können wurden stabile HeLa-Transfektanten hergestellt, die das Gorasp2-YFP Fusionsprotein stabil exprimieren.

Hierzu wurde die den CMV-Promotor und die für das Gorasp2-eYFP Fusionsprotein kodierende Sequenz per *NotI* Spaltung aus dem Vektor pGorasp2eYFP\_zeo ausgeschnitten und das zuvor mittels *NotI* Spaltung linearisierte und dephosphorylierte Vektorrückgrad des Vektors pBlastCMV inkloniert und so der Vektor pGorasp2eYFP\_blasto hergestellt. Dies wurde deswegen nötig, da Zeozin seinen Selektionsdruck über Herbeiführung von DNS-Doppelstrangbrüchen ausübt, während Blasticidinresistenz über Hemmung der Proteinbiosynthese vermittelt wird, und deswegen Zeozinresistenz am Institut nicht mehr verwendet werden sollte. Es wurden 120 Klone gepickt und die eYFP-Fluoreszenz der Klone wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop einer Vorauswahl unterzogen. Zwei Klone, Klon 4 und Klon 21 wiesen eine schwache, cytoplasmatische eYFP Fluoreszenz auf. Ein weiterer Klon (Klon 45) wies eine starke, perinukleäre Fluoreszenz auf, variierte jedoch stark in der Fluoreszenzstärke und erschien stark heterogen. Klon 79 wies eine annähernd homogene, perinukleäre Fluoreszenz auf.

Aus diesen resultierenden Klonen, die die eYFP-Fluoreszenz exprimierten, wurde unter dem Laser Scanning Mikroskop auf eine golgigständige, homogene Fluoreszenz hin Klon79 ausgewählt.

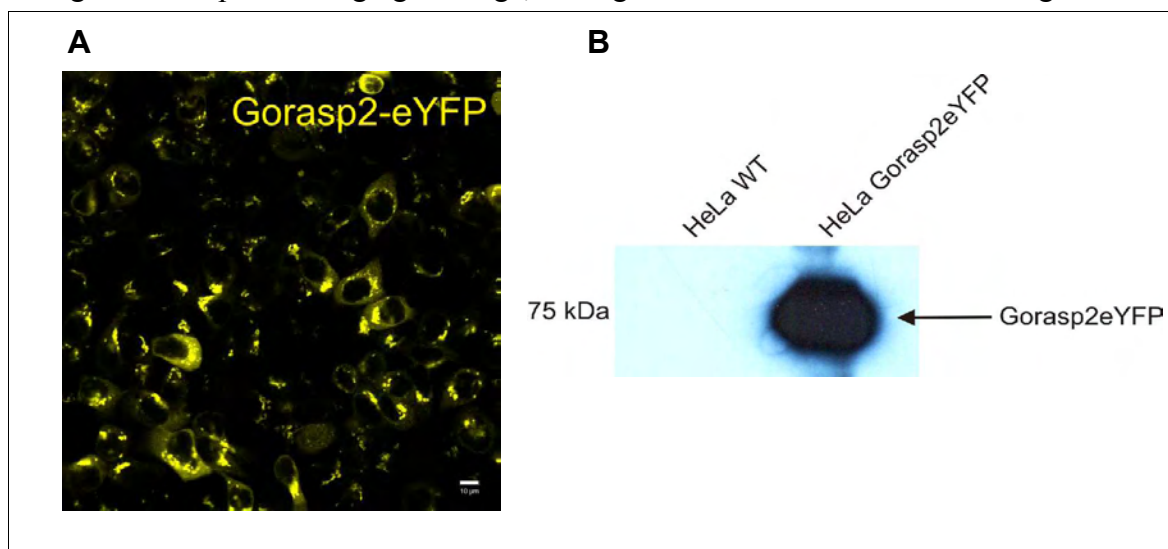


Abb. 4.22.: Fluoreszenz-und Immunoblotanalyse der Gorasp2eYFP stabil transfizierten HeLa-Zellen

Dargestellt sind in A unfixiert stabil mit pGorasp2eYFP\_blast transfizierte HeLa-Wildtyp-Zellen (Klon 79), eYFP-Fluoreszenz in gelb dargestellt, Grössenbalken: 10 μm, in B dargestellt ist ein Immunoblot gegen eGFP, aufgetragen ist Kontrolllysat aus HeLa WT Zellen und HeLaGorasp2eYFP-Lysat aus Klon 79



In Abb. 4.22A zu sehen ist die annähernd homogene Expression des Gorasp2eYFP Proteins. Nur wenige Zellen exprimieren das Protein eher schwach, stets zu finden ist die typische perinukleäre Lokalisation des Gorasp2eYFP Proteins, was auf wiederum nach Shorter et al., 1999 auf die golgiständige Lokalisation hindeutet. Auch mit einem gegen GFP gereichtem Antikörper im Immunoblot konnte das Fusionsprotein analog zu 4.2.9.8 nachgewiesen werden (zu sehen in 4.22B). Bevor eingehendere Versuche mit dieser Zelllinie durchgeführt werden konnten, machten damit denkbare Experimente einem weiteren Aspekt Platz, der durch eine Publikation im Journal „Cell“ (Kinseth et al, 2007) angestossen wurde (siehe 5.7.7)

#### **4.2.9.12 Kolokalisation und Sequestrierung von Cx45eCFP und Gorasp2eYFP in RT4-AC-Zellen**

Um die möglicherweise zelltypspezifische funktionelle Interaktion der beiden Proteine in einer weiteren neuronalen Zelllinie zu testen, die ein diversifizierteres Potential als die aus einem Neuroblastom isolierten N2A Zellen aufweist, wurde die Hirnvorläufer Zelllinie RT4-AC (Droms et al., 1987) genutzt, die sich durch eine Differenzierbarkeit in mehrere neuronale Zelltypen auszeichnet. Diese Zelllinie wurde unter Zellkulturbedingungen wie bei Zoidl et al. (2002) beschrieben angezogen und mit pCx45eCFP\_puro und pGorasp2eYFP\_zeo exprimierenden Konstrukten transient transfiziert:

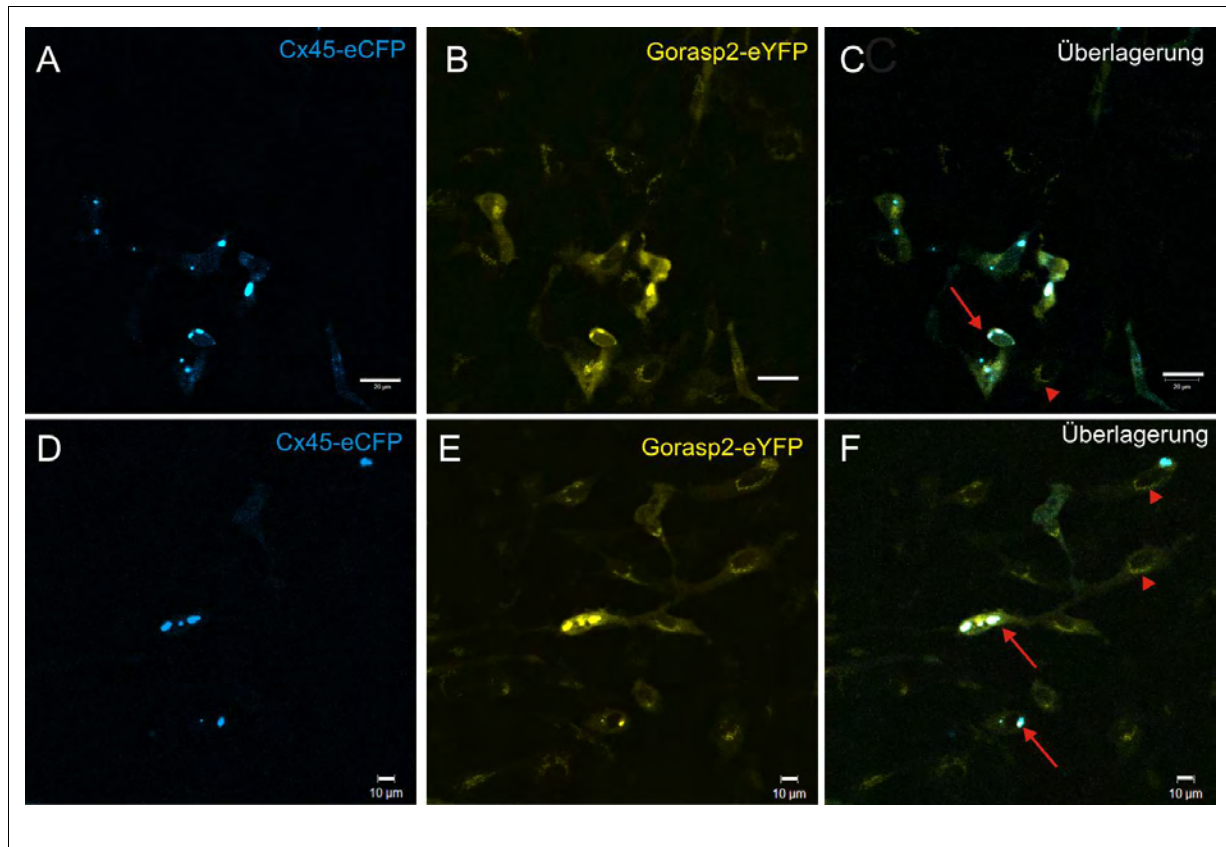


Abb. 4.23.: Fluoreszenzanalyse von Cx45eCFP und Gorasp2eYFP in RT4-AC-Zellen

Dargestellt sind unfixiert transient mit pGorasp2eYFP\_zeo und pCx45eCFP\_puro doppelt transfizierte RT4-AC-Wildtyp-Zellen, eCFP-Fluoreszenz in blau, eYFP-Fluoreszenz in gelb dargestellt, Pfeile weisen auf eine Kolokalisation sowie eine Sequestrierung des Gorasp2eYFP an den Ort der Cx45eCFP Akkumulation, Pfeilköpfe auf eine typische perinukleäre Lokalisation des Gorasp2-eYFP hin. Größenbalken: 20 µm (oben), 10 µm (unten).

Hier wurde eine fast vollständige Kolokalisation des Cx45eCFP und des Gorasp2eYFP Proteins festgestellt. Obgleich das Cx45eCFP Protein wie in N2A Zellen die Plasmamembran nicht erreicht, wurde in doppelt transfizierten Zellen eine Änderung der Lokalisation des Gorasp2eYFP Proteins hin zur Lokalisation des Cx45eCFP Proteins festgestellt (Abb 4.23). In nur mit Gorasp2eYFP transfizierten Zellen hingegen wurde eine bereits bekannte perinukleäre Lokalisation des Proteins festgestellt, die auf die bekannte Golgi-Lokalisation hindeutet. In zusätzlich mit Cx45eCFP transfizierten Zellen wird diese Lokalisation fast komplett aufgegeben. Das Gorasp2eYFP Protein nimmt in diesen Fällen die Lokalisation des Cx45eCFP Proteins ein. Dieses Phänomen konnte weder in der sporadischen Kolokalisation in HeLa Zellen noch in der teilweisen Überlappung in der Neuroblastoma Zelllinie N2A beobachtet werden, was im Zusammenhang mit den *in situ* Daten von [www.brain-map.org](http://www.brain-map.org) siehe 5.7.7 auf eine mögliche zelltypspezifische Funktionalität der Interaktion hindeuten könnte.

### 4.3 Versuche zur Strukturaufklärung des Carboxyterminus von Cx45 mittels NMR

Von Dr. Stephan Maxeiner wurde mittels Lupas Algorithmus (siehe Thorsten Höher, Diplomarbeit 2003) bereits früh die Entdeckung einer möglichen Coiled-Coil-Struktur gemacht, die im Carboxyterminus des Cx45 Proteins vorhergesagt wird. Da eine solche Struktur als proteinbindendes Motiv bekannt ist (Shimizu et al., 2003) und darüber hinaus in anderen Connexinproteinen nicht vorhergesagt wird, könnte eine solche Coiled-Coil eine Sonderstellung des Cx45 Proteins bedeuten. Beispielsweise könnte ein Bindungspartner, der nur über eine Coiled-Coil Struktur bindet, das Cx45 Protein aus der Familie der anderen Connexinproteine herausheben. Dies wäre, da Cx45 Defektmäuse (Krüger et al., 2000) bereits pränatal versterben, möglicherweise sogar bereits entwicklungsbiologisch von Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Versuch unternommen werden, eine Strukturanalyse mittels NMR an der carboxyterminalen Domäne des Cx45 Proteins durchzuführen, um die Möglichkeit einer sich dort befindenden Coiled-Coil Struktur zu verifizieren. Dies sollte analog zu den Versuchen von Paul Sorgen (Sorgen et al., 2002) durchgeführt werden, der ein solches Experiment bereits für den Carboxyterminus des Cx43 Proteins durchgeführt hat.

Versuche zur NMR Analyse des Cx45 Carboxyterminus wurden in Zusammenarbeit mit JP Dr. Raphael Stoll von der Universität Bochum durchgeführt.

Eine solche NMR-Spektroskopie setzt das Vorhandensein einer konzentrierten, möglichst reinen Probe der entsprechenden Domäne voraus, so dass im Folgenden Versuche unternommen wurden, den Cx45 C-Terminus (CT) als Domäne in Bakterien rekombinant zu exprimieren und über eine Affinitäts-Markierung aufzureinigen. Anschliessend sollte dann mittels einer sequenzspezifischen Protease selbige Markierung entfernt werden und die nun reine Proteindomäne in hoher Konzentration in wässriger Lösung für eine NMR-Spektroskopie eingesetzt werden.

Es wurde das pGEX-6P-1 Vektorsystem für die bakterielle Expression als GST-Fusionsprotein ausgewählt, das über ein IPTG-induzierbares offenes Leseraster verfügt, das für das GST-Protein mit anschliessender im Leseraster liegenden PrecisionProtease<sup>TM</sup> Schnittstelle sowie einer multiplen Klonierungsstelle kodiert. Die für die entsprechende Peptidsequenz spezifische PrecisionProtease<sup>TM</sup> ist ebenfalls als bereits GST-markiertes Protein käuflich zu erwerben, so dass prinzipiell eine gleichzeitige Entfernung der Protease zusammen mit dem abgespaltenen GST möglich ist, um auf diese Weise den reinen Cx45CT zu erhalten.

#### 4.3.1 Klonierung, Expression und Gewinnung des GST-Cx45CT Fusionsproteins

Es wurde die bereits in 4.2.3 etablierte Aufreinigungsmethode benutzt.

#### 4.3.2 Spaltung des Fusionsproteins mittels sequenzspezifischer Protease

Das wie in 4.2.3 beschrieben gewonnene Glutathion-freie, hochkonzentrierte Fusionsprotein musste nun einem proteolytischen Verdau unterzogen werden, um das gewünschte Cx45CT Peptid von dem GST-Protein abzuspalten. Also wurde der aufkonzentrierten Probe eine entsprechende Menge Protease zugesetzt, der Verdau durchgeführt und entsprechende Proben einer SDS-PAGE mit anschließender Comassie-Färbung unterzogen:

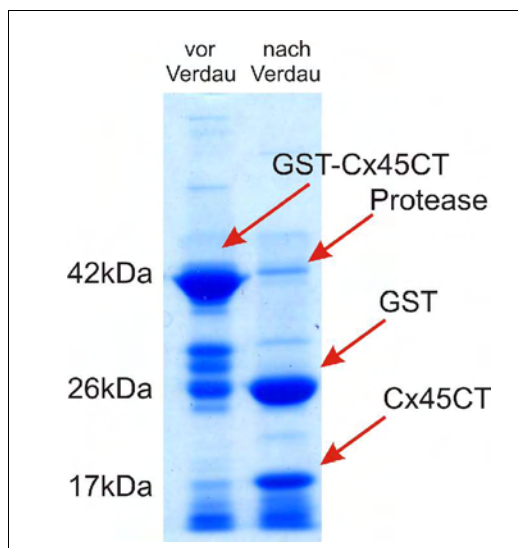


Abb. 4.24.: Darstellung des Verdaus des GST-Cx45CT Fusionsproteins mit sequenzspezifischer Protease

Dargestellt ist eine coomassiegefärbte 12%ige SDS-PAGE, auf der je 12  $\mu$ l des Spaltungsansatzes vor Verdau (links) und nach Verdau (rechts) aufgetragen sind. Zu erkennen ist die erfolgreiche proteolytische Spaltung des 42 kDa grossen Fusionsproteins in das 26 kDa große GST und den 17 kDa grossen Carboxyterminus des Cx45 Proteins

In Abb. 4.24 konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung vollständig erfolgt, die Inkubation mit der Protease spaltete das Fusionsprotein in die vorherberechneten Größen von 26 kDa für das GST und 17 kDa für das Cx45CT-Peptid.

Da ein proteolytischer Verdau einer ausreichenden Menge von GST-Fusionsprotein mit anschließender Entfernung des GST und der GST-getagten PrecisionProtease<sup>TM</sup> zu der gewünschten Menge an ausreichend reinem Cx45CT Peptid führt, kann das auf diese Weise erfolgreich gespaltene Protein weiter verwendet werden.

#### 4.3.3 Versuche zur Abtrennung des GST-Proteins mittels Glutathion-Affinitäts-Säule

Nach erfolgreicher proteolytischer Spaltung des Fusionsproteins die Entfernung des GST sowie der GST-markierten Protease erfolgte analog zur Reinigung des Fusionsproteins aus dem Bakterienlysat mittels Affinitätsreinigung per GSTrap-Säulen.

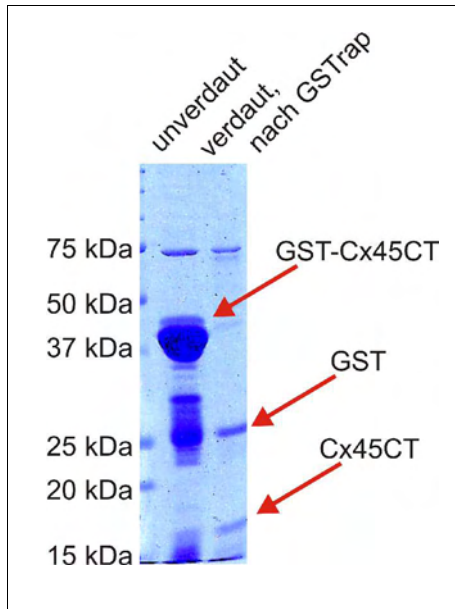


Abb. 4.25.: **Darstellung der Abtrennung der unerwünschten Bestandteile des Spaltungsansatzes über Affinitätsreinigung**

Dargestellt ist eine coomassiegefärbte 12%ige SDS-PAGE, auf der je 12  $\mu$ l des Spaltungsansatzes vor Verdau (links) und nach Verdau und Affinitätsreinigung über GSTrap-Säule (rechts) aufgetragen sind. Zu erkennen ist neben der Abtrennung des GST-Proteins als auch ein nennenswerter Verlust des Cx45CT-Peptids

In mehreren Versuchen (Abb 4.25) dieser Art war zu beobachten, dass die zuvor hochkonzentrierte Probe nach Durchführung der Affinitätsreinigung nicht nur GST und die GSTgetagte Precission<sup>TM</sup> Protease verloren hatte, sondern ebenfalls auch einen hohen Anteil des Cx45CT Peptids. Zu beachten ist hierbei, daß die bei ca. 75 kDa laufende bakterielle Kontaminante an Intensität nur wenig verliert, was zeigt, dass der Verlust des Cx45CT nicht scheinbar durch eine Erhöhung des effektiven Probenvolumens entstanden ist. Hinzu kommt die unzureichende Entfernung des GST-Proteins, was die wiederholte Affinitätsreinigung der Probe nötig machen und zu weiterem Verlust des Cx45CT führen würde.

#### 4.3.4 Versuche zur Reinigung mittels Gelfiltration

Als Alternative zur Affinitätsreinigung wurde die Methode der Gelfiltration zur Trennung des Proteingemisches eingesetzt.

Eine Kalibration der SuperDex75 Säule wurde durchgeführt (nicht gezeigt) und die Gelfiltration mit je 500  $\mu$ l der 4 mg/ml konzentrierten proteolytisch verdauten Probe in unterschiedlichen Puffern durchgeführt. Die vorher durch die Kalibrierung erwarteten und anhand der gemessenen UV-Adsorption nachgeprüften Fraktionen wurden anschliessend einer SDS-PAGE mit darauffolgender

Coomassiefärbung unterzogen:

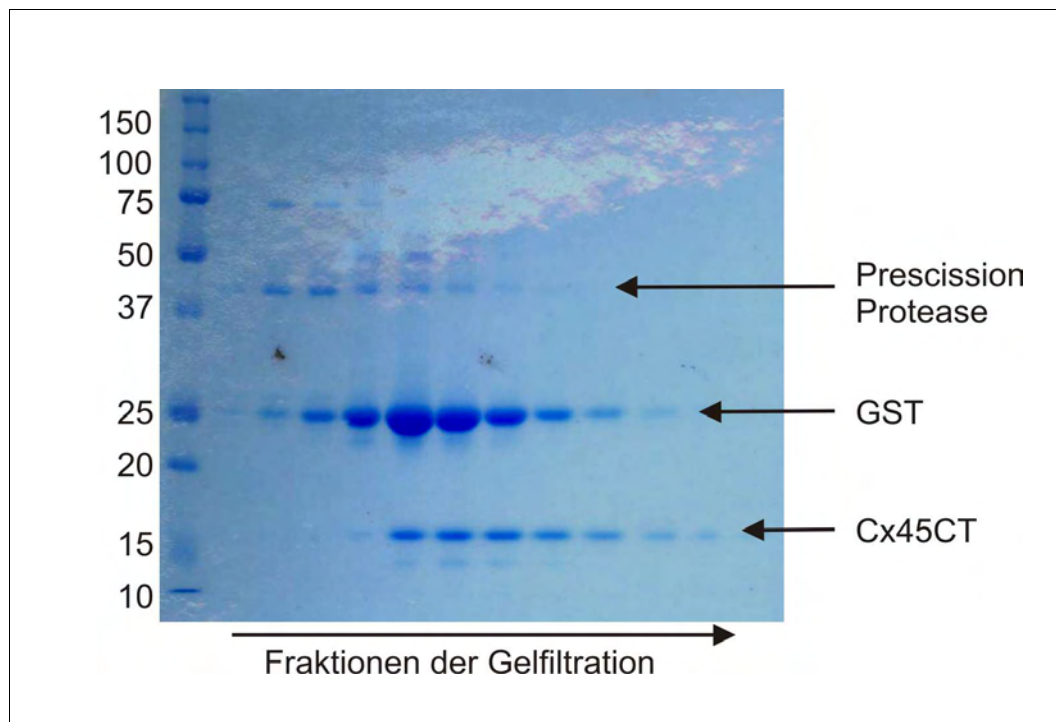


Abb. 4.26.: **Darstellung der versuchten Abtrennung der kontaminierenden Bestandteile von dem Cx45CT-Peptid über Gelfiltration**

Dargestellt ist eine coomassiegefärbte 12%ige SDS-PAGE, auf der je 12  $\mu$ l der proteinhaltigen 1 ml Fraktionen der Gelfiltration von 2 mg proteolytisch verdaulichem Fusionsprotein aufgetragen sind. Zu erkennen ist die unzureichende Trennung von GST und Cx45CT-Peptid. Grössenangaben in kDa.

In Abb. 4.26 ist zu beobachten, dass sich das GST-Protein und auch der Cx45 Carboxyterminus zum größten Teil in den selben Fraktionen befinden, was darauf hindeutet, dass sich mit diesem Ansatz auch bei geringer Flussrate das GST nicht effektiv von Cx45CT trennen läßt.

#### 4.3.5 Etablierung der Reinigung mittels geblockter Affinitätsmatrix

Eine weitere Möglichkeit zur Separation des GST Proteins und des Cx45CT ist eine veränderte Affinitätsreinigung über eine Glutathion-Affinitätsmatrix unter Vermeidung von und Abblockung jeglicher Oberfläche, an die ein möglicherweise adhäsives Protein eventuell bindet. Bei der unter 4.2.3 beschriebenen Reinigung über eine Glutathion-Säule mittels peristaltischer Pumpe könnten Bindungen beispielsweise über den Pumpschlauch der Pumpe, Wandungen des UV-Meters oder der Schlauchverbindungen zustande kommen.

So wurden hier 15 ml Falcongefäße mit 200  $\mu$ l Glt-Matrix befüllt, und üN mit 2% Fischgelatine/2%

BSA in PBS<sup>-</sup> geblockt. Anschliessend wurden diese Gefäße mehrfach mit dem Probenpuffer gewaschen und so überzähliges Blockierungsprotein entfernt. Auf die erste auf diese Weise geblockte Matrix wurde nun die Probe gegeben und für 1 h inkubiert. Dies wurde mehrfach wiederholt und zur Kontrolle entsprechende Proben der Überstände genommen:

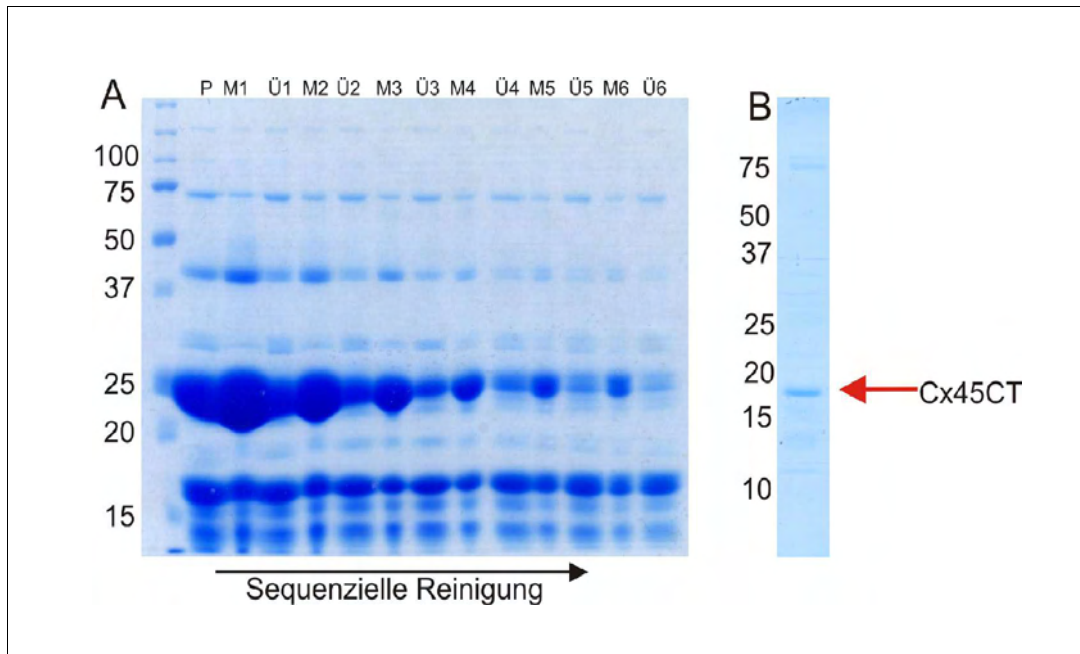


Abb. 4.27.: **Darstellung der Abtrennung der kontaminierenden Bestandteile von dem Cx45CT-Peptid**

Dargestellt ist A: eine coomassiegefärbte 12%ige SDS-PAGE, auf der je 12  $\mu$ l des Spaltungsansatzes nach proteolytischem Verdau (P) bzw. Reinigungsschrittüberstand (Ü) bzw. auf der Matrix retendiertem Protein (M) aufgetragen sind. In B dargestellt ist eine Spur einer 12%igen SDS-PAGE, auf der 5  $\mu$ l der mittels sequentieller Reinigung erhaltenen hochreinen Probe des Cx45CT Peptids zu erkennen ist. Grössenangaben in kDa

In Abb 4.27 zu sehen ist die effiziente schrittweise Entfernung sowohl des GST als auch der GST-markierten Precision Protease, während der Verlust an Cx45CT relativ gering ist.

Nach ausreichend häufiger Durchführung dieser Reinigungsprozedur erhält man nun zu über 90 % reines Cx45CT, ein Reinheitsgrad, der für eine NMR Messung ausreicht (R. Stoll, persönliche Mitteilung). So wurde eine 1 mg /ml konzentrierte Probe in 500  $\mu$ l Puffervolumen hergestellt, die für eine erste NMR-Messung, ein sog. Protonenspektrum, ausreichend ist.



#### 4.3.6 1D-Protonenspektrum: Struktur-Analyse mittels NMR

Die wie oben beschriebene Probe wurde also an das Labor von JP Dr. Raphael Stoll geschickt und einer 1D-NMR unterzogen, aus dieser Messung ging folgendes Protonenspektrum hervor.

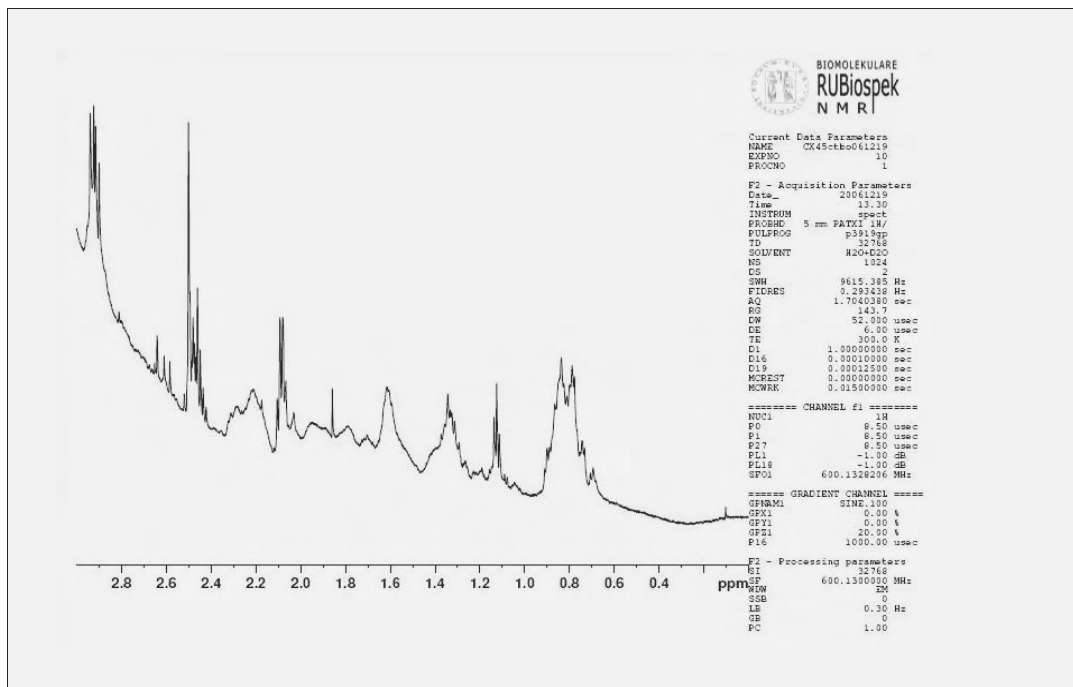


Abb. 4.28.: Darstellung eines NMR-Protonenspektrums des Cx45CTPeptids

Dargestellt ist ein Verlauf der einzelnen Resonanzmaxima der H-Atome des Cx45CT Peptids, das einen ersten Eindruck von der Konformation des Peptids geben soll. Die Auswertung und Interpretation des Spektrums in Zusammenarbeit von JP Dr. Raphael Stoll (Bochum) vorgenommen.

Die Auswertung dieses Spektrums (Abb 4.28) wurde in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern im Labor von JP Dr. Raphael Stoll (Bochum) vorgenommen. Die Interpretation der Daten in diesem Stadium deutet auf ein weitgehend relaxiertes Peptid mit möglicherweise 30 % igem Anteil an strukturierten Teilen hin (Raphael Stoll, persönliche Mitteilung). Um allerdings eine eindeutige Aussage treffen zu können oder sogar eine Zuordnung der Spektrenmaxima zu den einzelnen Aminosäureresten treffen zu können, ist die Aufreinigung des isotopisch markierten Peptids notwendig.

#### 4.3.7 Metabolische Bakterienmarkierung mittels Stickstoff-15

Zur eindeutigen Strukturaufklärung ist eine Markierung des Peptids mit nichtradioaktiven Isotopen wie  $^{15}\text{N}$  oder  $^{13}\text{C}$  notwendig, um mehrere Nuklei einzeln in der NMR anregen und messen zu können. Den ersten Schritt stellt eine Markierung mit  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid dar. Um dies zu erreichen, muß man die Produktion des rekombinant in Bakterien exprimierten Proteins in einem



Nährmedium durchführen, in dem  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle vorliegt, somit komplexes Nährmedium mit Zellextrakten wie z.B. das Luria Bertani-Medium nicht angebracht. Optimal für eine solche Art der bakteriellen Aufzucht ist z.B. das M9- Medium nach Maniatis (Maniatis et al., 1982), im Folgenden wurden also Versuche unternommen, eine Induktion des Fusionsproteins in diesem Medium durchzuführen.

#### 4.2.8 Expression des GST-Cx45CT in *E. coli* Rosetta (DE3) pLys

Eine Induktion der Synthese des Fusionsproteins durch *E. coli* BL21-Bakterien in Minimalmedium war zunächst erfolglos. Auch eine Titrierung sämtlicher Induktionsparameter wie Temperatur, IPTG-Konzentration usw. blieb erfolglos (nicht gezeigt). So wurde der Versuch unternommen, das Plasmid in den *E. coli* ROSETTA (DE3) pLys Stamm, einen sog. kodonoptimierten Bakterienstamm, zu transformieren, der für zusätzliche Kopien für in *mammalia* häufiger genutzten t-RNS-Moleküle kodiert, um so in den Bakterien die unter den Stressbedingungen des Minimalmediums stattfindende Produktion des Fusionsproteins zu begünstigen.

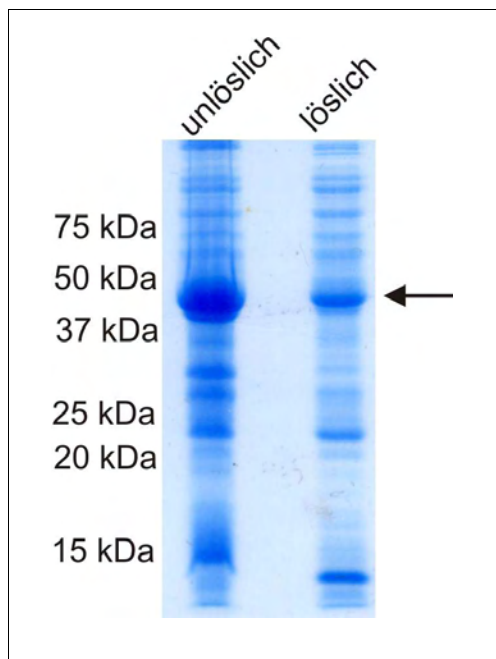


Abb. 4.29.: Darstellung der Löslichkeit des GST-Cx45CT Fusionsproteins in ROSETTA Bakterien

Dargestellt ist eine coomassiegefärbte 12%ige SDS-PAGE, auf der je 12  $\mu\text{l}$  GST-Cx45CT exprimierendes Bakterienlysat nach Induktion aufgetragen ist. Unlösliche Fraktion links, lösliche Fraktion rechts. Zu erkennen ist das zum Teil lösliche Fusionsprotein (schwarzer Pfeil)

Mit Hilfe dieses Stammes gelang die Expression des GST-Cx45CT Fusionsproteins in Minimalmedium, wenn auch die Löslichkeit des Proteins in diesem Stamm nicht vollständig, aber durchaus ausreichend erzielt werden konnte (Abb. 4.29).

Da man für eine  $^{15}\text{N}$ - markierte Messung eine höhere Proteinkonzentration (mindestens 1 mM des reinen Peptids) benötigt, wurde im Folgenden das Fusionsprotein aus vier Litern Bakterienkultur gewonnen, aufgereinigt, mittels Ultrafiltration auf ein Gesamtvolumen 4 ml eingengt, proteolytisch

gespalten und der oben (4.3.5) beschriebenen sequenziellen Reinigung unterzogen. Das erhaltene, ausreichend reine Peptid (Abb. 4.30) wurde dann bei leicht alkalischem pH weiter über Microcon-Röhrchen (Ausschlussgrenze 3 kDa) auf ein Volumen von 500  $\mu\text{l}$  eingengt, und zur NMR eingesetzt.

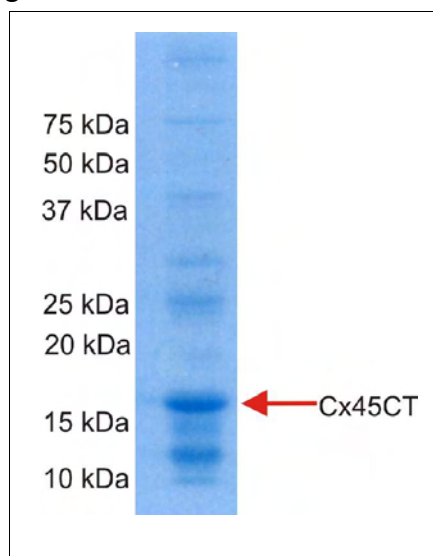
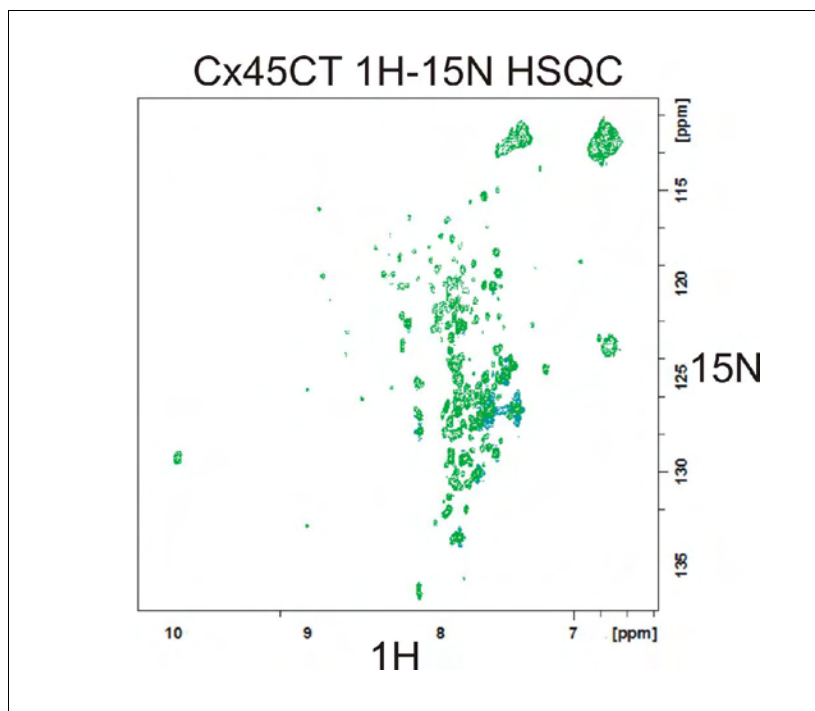


Abb. 4.30.: Darstellung der finalen Probe für die  $^{15}\text{N}$ -markierte 2D-NMR

Dargestellt ist eine coomassiegefärbte 12% ige SDS-PAGE, auf der 5  $\mu\text{l}$  des  $^{15}\text{N}$  markierten Spaltungsansatzes nach erfolgter sequenzieller Reinigung und Aufkonzentrierung aufgetragen sind. Zu erkennen ist das nur leicht degradierte, weitgehend von Kontaminationen freie,  $^{15}\text{N}$  markierte Cx45CT Peptid bei 17 kDa. Die Endkonzentration der Probe betrug 1,9 mM in einem Volumen von 500  $\mu\text{l}$ .

#### 4.3.9 Zweidimensionales Resonanzspektrum des Cx45CT-Peptids (2D-NMR)

Die oben beschriebene Probe wurde also an das Labor von JP Dr. Raphael Stoll (Bochum) geschickt und einer 2D-NMR unterzogen, aus dieser Messung ging folgendes HSQC Spektrum hervor, dass die Umgebung der im Peptid vorhandenen Amid-Protonen abbildet (Lottspeich und Vargas,



Spektrum Bioanalytik.Spektrum Verlag)

Abb. 4.30.: Darstellung eines exemplarischen 2D-NMR- des Cx45CTPeptids

Dargestellt ist ein Verlauf der einzelnen Resonanzmaxima der Amid-Protonen des Cx45CT Peptids, das einen ersten Eindruck von der Konformation des Peptids geben soll. Die Auswertung und Interpretation des Spektrums wurde von JP Dr. Raphael Stoll (Bochum) vorgenommen.

Die Auswertung dieses Spektrums (Abb 4.30) wurde in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern im Labor von JP Dr. Raphael Stoll (Bochum) vorgenommen. Die Interpretation der Daten in diesem Stadium deutet aufgrund der relativ geringen Dispersion der Mehrheit der Signale auf ein weitgehend relaxiertes Peptid mit einem geringem Anteil an strukturierten Teilen hin (JP Dr. Raphael Stoll, persönliche Mitteilung). Zu erwarten sind 20-40 Aminosäurenreste, die vermutlich Sekundärstrukturen ausbilden. Um allerdings eine eindeutige Aussage treffen zu können oder sogar eine Zuordnung der Spektrenmaxima zu den einzelnen Aminosäureresten durchzuführen um so die An- oder Abwesenheit einer „coiled-coil“ Struktur zu verifizieren, ist eine isotopische Markierung mit  $^{13}\text{C}$  notwendig.

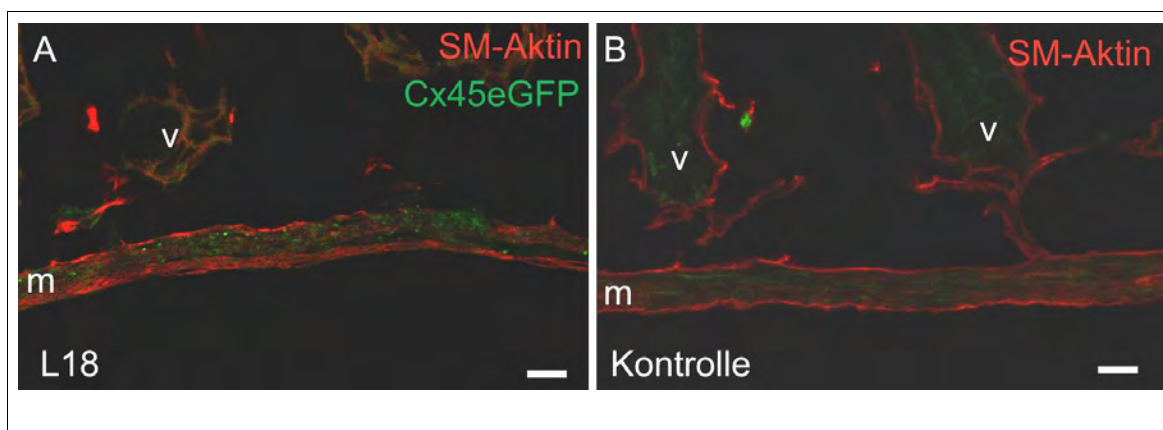
#### 4.4 Teilanalyse einer transgenen Maus (BAC-Cx45eGFP)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch eine Teilanalyse einer transgenen Mauslinie durchgeführt, die durch Dr. Julia von Maltzahn und Dr. Carsten Euwens in unserer Arbeitsgruppe erzeugt wurde. Diese Maus entstand durch Injektion eines BAC (Bacterial Artificial Chromosome) in eine Oocyte, was zu einer willkürlichen Integration im Genom führte. Diese BAC-DNS, die genomische Region des Connexin45 enthält, wurde vorher so verändert, dass sie unter dem nativen Cx45 Promotor nicht das unmodifizierte Connexinprotein, sondern ein Fusionsprotein aus Cx45 und dem verstärkt grün fluoreszierenden Protein eGFP exprimiert. Diese transgene Mauslinie sollte also zusätzlich zu den beiden Cx45 Allelen eine mit eGFP fusionierte Version exprimieren. Dies sollte, da die Antikörper gegen das Cx45 Protein von nicht ausreichender Qualität waren, neue Erkenntnisse bezüglich der subzellulären Lokalisation von Cx45 enthaltenden Gap Junctions in unterschiedlichen Geweben liefern.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression des Cx45eGFP Proteins in der Retina und Darm untersucht werden, da dort die Expression des Cx45 Proteins bereits mit Hilfe von Antikörpern bekannt war (Dedek et al., 2006), und so mit der nativen Expression des Cx45eGFP Proteins verglichen werden konnte. Für weitere Informationen zu Herstellung der transgenen Maus und deren Charakterisierung möchte ich hiermit auf die Doktorarbeit von Julia von Maltzahn (2008) verweisen.

##### 4.4.1 Lokalisation von Cx45eGFP in adultem Darm der Maus

Es wurden Kryoschnitte des Darms von transgenen und Kontrolltieren angefertigt, und nach Ethanolfixierung und Gegenfärbung mit gegen SM-Aktin (Glattmuskel-Aktin) gerichteten Antikörpern unter dem Laser Scanning Mikroskop untersucht



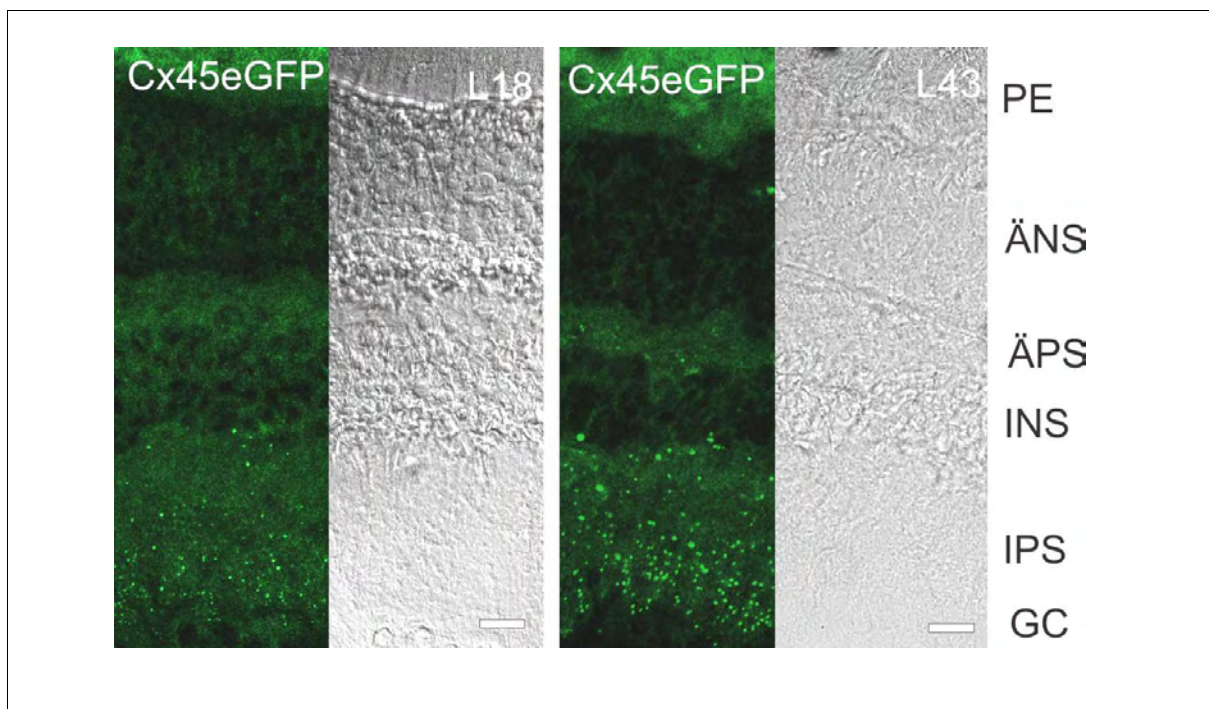
**Abb. 4.31.: Ko-fluoreszenzanalyse des Cx45eGFP Reporterproteins und SM-Aktin spezifischer Immunsignale in Glattmuskelzellen des Darms transgener Mäuse**

Dargestellt sind ethanolfixierte Kryoschnitte des Darms adulter Mäuse, A: Cx45eGFP-BAC, Linie 18, B: Kontrolltier, eGFP Fluoreszenz in grün dargestellt, Immunfärbung gegen SM-Aktin in rot dargestellt, v: Villi, l: Darmlumen, m: glatte Muskulatur des Darms: Größensbalken: 10 µm.

In Abb. 4.31 zu sehen ist die Lokalisation des eGFP Signals, und somit der Lokalisation des Cx45eGFP Fusionsproteins in Form von eGFP positiven Punkten in der glatten Muskulatur des Darms der adulten Maus. Durch Reportergermanalysen von Döring et al., 2007 war bereits bekannt, dass Cx45 in der glatten Muskulatur des Darms adulter Tiere exprimiert wird. Die Lokalisation des Proteins war bisher nicht gezeigt worden.

**4.4.2 Lokalisation von Cx45eGFP in der adulten Retina**

Kryoschnitte von den Augen adulter transgener und Wildtyp Mäuse wurden angefertigt, und direkt oder nach einer Ethanolfixierung und unter dem Laser Scanning Mikroskop auf eGFP Fluoreszenz hin untersucht:



**Abb. 4.32: Fluoreszenzanalyse des Cx45eGFP Reporterproteins in der adulten Retina transgener Mäuse**

Dargestellt sind unfixierte Kryoschnitte der Retinae adulter transgener Cx45eGFP-BAC-Mauslinien, Linie 18 links, Linie 43 rechts, eGFP Fluoreszenz in grün dargestellt, PE: Pigmentepithel, ÄNS: äußere nukleäre Schicht, ÄPS: äußere plexiforme Schicht, INS: innere nukleäre Schicht, IPS: innere plexiforme Schicht, GC: Ganglienschicht, Größensbalken: 20 µm.



Zu erkennen ist die Lokalisation des eGFP Signals, und somit der Lokalisation des Cx45eGFP Fusionsproteins in Form von eGFP positiven Punkten in der inneren plexiformen Schicht, in Linie 43 ebenfalls wenn auch schwach zu sehen in der äusseren plexiformen Schicht und der Ganglionzellschicht (Abb. 4.32). Diese Signale sind im Vergleich der Aufnahmen in der WT Retina (nicht gezeigt) spezifisch und stellen die Lokalisation des Cx45eGFP Proteins in der Retina dar. Die Fluoreszenz der eGFP- positiven Punkte ist in Linie43 stärker als in Linie18. Dies steht in Einklang mit der Anzahl der im Genom der Maus integrierten Kopien des BACs, der in Linie 18 vermutlich einmal, in Linie 43 mehrfach vorhanden ist, was in einer stärkeren Aktivität des Reporterproteins resultiert (Julia von Maltzahn, Doktorarbeit 2008)

#### 4.4.3 Kolokalisation von Cx45eGFP und Cx36 in der adulten Retina

Um die Lokalisation der eGFP positiven Punkte und somit des Cx45eGFP Proteins in der adulten Retina besser einschätzen zu können, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen das Cx36 Protein durchgeführt, dessen Expression und Kolokalisation in der Retina mit dem Cx45 Protein bereits länger (Feigenspan et al., 2004, Dedek et al., 2006) ) beschrieben ist:

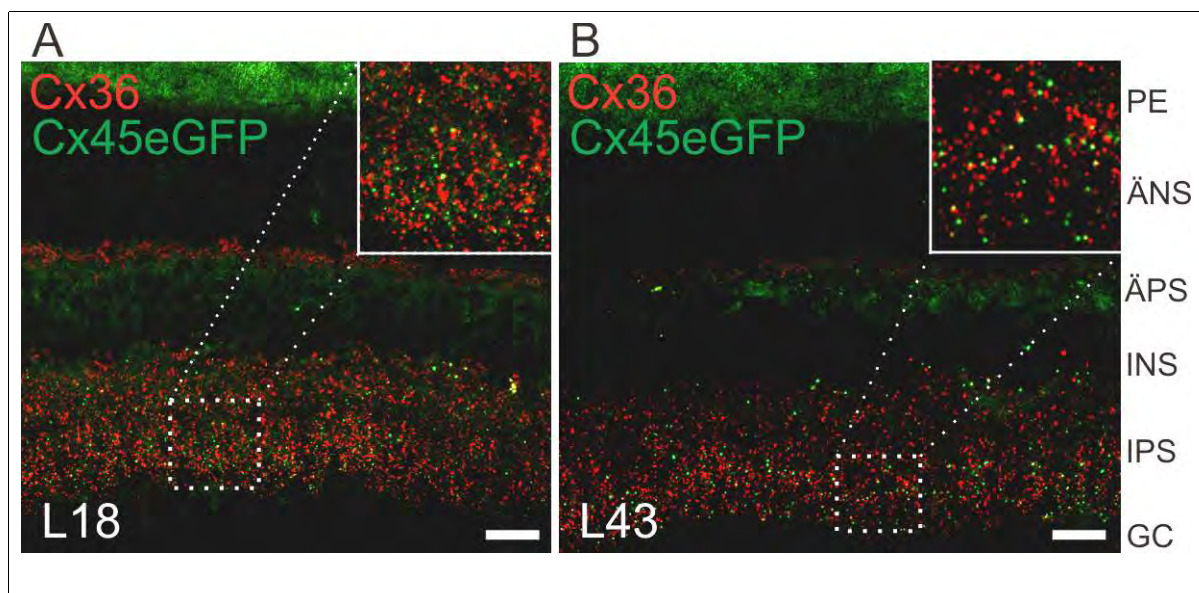


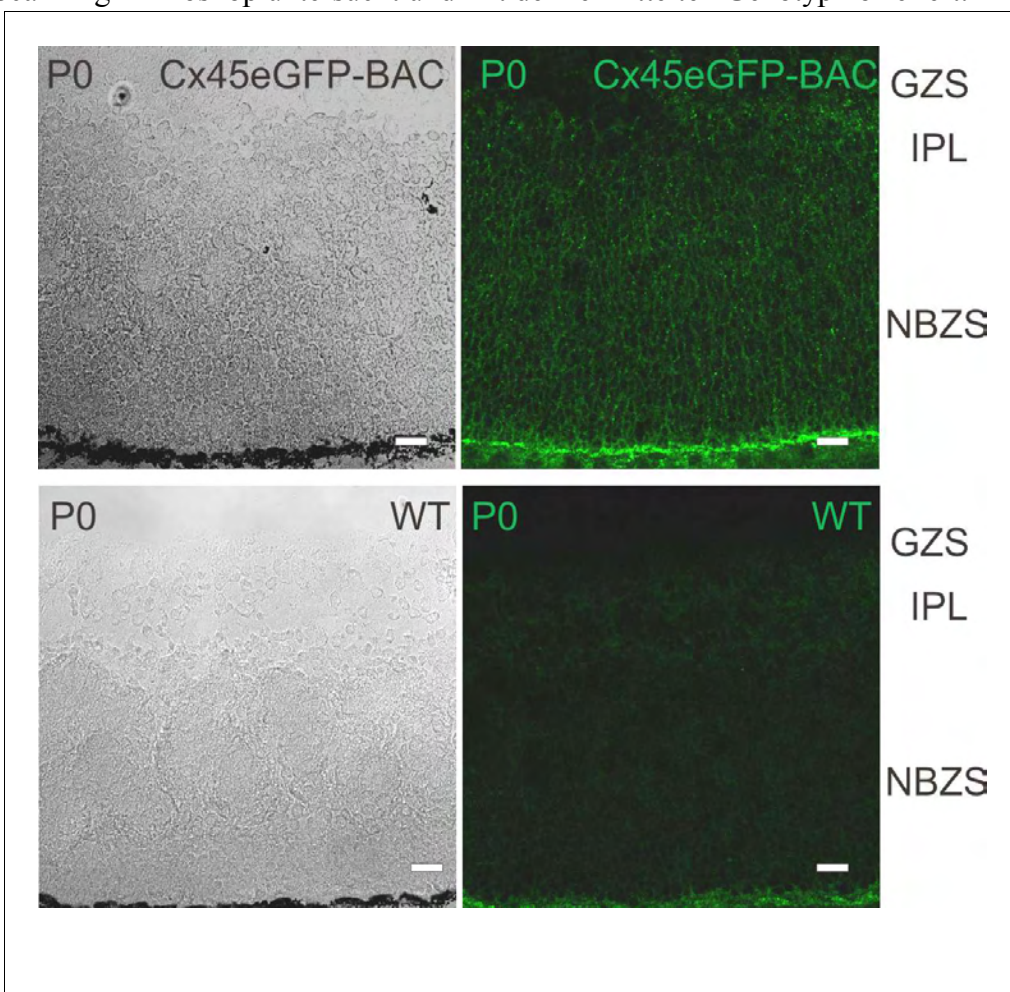
Abb. 4.33.: Ko-fluoreszenzanalyse des Cx45eGFP Reporterproteins und Cx36 spezifischer Immunsignale in der adulten Retina transgener Mäuse

Dargestellt sind ethanolfixierte Kryoschnitte der Retinae adulter transgener Cx45eGFP-BAC-Mauslinien, A: Linie 18, B: Linie 43, eGFP Fluoreszenz in grün dargestellt, Immunfärbung gegen Cx36 in rot dargestellt, PE: Pigmentepithel, ÄNS: äussere nukleäre Schicht, ÄPS: äussere plexiforme Schicht, INS:innere nukleäre Schicht, IPS: innere plexiforme Schicht, GC:Ganglionzellschicht, Größenbalken: 20  $\mu$ m.

In Abb 4.33 ist zu sehen, daß die Lokalisation des Cx45eGFP Proteins in transgenen Tieren der erwarteten Lokalisation des Cx45 Proteins in der äusseren plexiformen und inneren plexiformen Schicht sowie der Ganglienzellschicht der adulten Retina entspricht, wie von Dedek et al., 2006 bereits ausführlich beschrieben. Festzustellen ist ebenfalls eine partielle Kolokalisation mit Immunfluoreszenzsignalen für Cx36 in der IPS, was ebenfalls die Ergebnisse von Dedek et al. bestätigt.

#### 4.4.4 Fluoreszenznachweis des Cx45eGFP Proteins in juveniler Retina (P0)

Der Nachweis des Cx45eGFP Proteins in der juvenilen (P0) Retina wurde ebenfalls unternommen, um die Expression des Transgens während der Entwicklung der Retina mit den bereits beschriebenen Daten von Kihara et al. 2006 für die Expression des Cx45 Proteins zu vergleichen. So wurden Kryoschnitte der Augen von neugeborenen Mäusen angefertigt, unter dem Laser Scanning Mikroskop untersucht und mit dem ermittelten Genotyp korreliert:



**Abb. 4.34.: Fluoreszenzanalyse des Cx45eGFP Reporterproteins in der Retina transgener Mäuse am Tag der Geburt (P0)**

Dargestellt sind unfixierte 14 µm dicke Cryoschnitte P0- Retinae der transgenen Cx45eGFP-BAC Linie 18 oben, Wildtyp-Wurfgeschwiseter unten, eGFP Fluoreszens in grün dargestellt, GZS: Gangionzellschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, NBTS: Neuroblastenzellschicht, Grössenbalken: 20 µm.

Zu beobachten ist in Abb. 4.34 die Expression des eGFP Reporterproteins in allen Schichten der sich entwickelnden Retina. Diese Beobachtung der Expression des Cx45 Proteins stimmt mit den Ergebnissen von Kihara et al., 2006 überein, die bei P0- Tieren das Cx45 Proteins mittels Immunfluoreszenz nachwiesen.

Zusammenfassend kann man nach Analyse der Expression des Cx45eGFP Reporterproteins im sich entwickelnden und adulten im Auge der Maus davon ausgehen, daß die Lokalisation des Reporterproteins mit den bereits charakterisierten Expressionsorten und Koloalisationen des Cx45 Proteins übereinstimmt, und diese Reportermaus als in neuronalen Geweben spezifisch die Expression von Cx45 repäsentiert.



## **5. Diskussion**

### **5.1 Protein Kinase A- vermittelte Änderung der homotypischen Cx36-Kopplung in AII Amakrinzellen der Mausretina**

Im Rahmen dieser Arbeit sollten in Zusammenarbeit mit Dr. Stephanie Urschel Versuche zum Nachweis einer funktionellen Phosphorylierung des in AII Amakrinzellen vorkommenden Connexin36 durchgeführt werden. So war aus den Arbeiten von Hampson et al. (1992) bekannt, dass das homotypische Kopplungsverhalten der AII Amakrinzellen in der Kaninchenretina von der Menge an einfallendem Licht abhängt. Diese Zellen bilden unter Sternenlicht (scotopischen) Bedingungen stark gekoppelte homotypische Netzwerke über aus Cx36 bestehenden Gap Junctions, was zu einer Sensitivierung der Netzhaut gegenüber Lichteinfall führt. Das Signal eines einzelnen detektierten Lichtquants wird im Falle stark gekoppelter AII Amakrinzellen auf eine grosse Anzahl Ganglienzellen übertragen, was zu einer Verstärkung der Lichtinformation führt. Unter Tageslichtbedingungen (photopischen) ist dieses AII Amakrinzell-Netzwerk stark entkoppelt. Dadurch trifft das Erregungssignal eines Photorezeptors auf weniger, im Idealfall eine Ganglionzelle, sodaß kein Verstärkungsmechanismus vorhanden ist.

Hampson et al. (1992) hatten beschrieben, daß die Anpassung des Kopplungsverhaltens in der Kaninchenretina in Abhängigkeit von den ambienten Beleuchtungsstärken über einen Anstieg der extrazellulären Dopaminkonzentration bei Lichteinfall mit anschliessendem D<sub>1</sub>-Dopaminrezeptor-vermitteltem Anstieg in der intrazellulären cAMP Konzentration der AII Amakrinzellen vonstatten geht. Daraus resultiert möglicherweise die Aktivität einer cAMP abhängigen Kinase, was ein denkbarer Grund für die beobachtete Änderung der homotypischen Kopplung der AII Amakrinzellen ist.

Um dies nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit mittels Immunpräzipitation von <sup>32</sup>P- markiertem Cx36 Protein gezeigt, dass Cx36 in der explantierten, kultivierten Mäuseretina als Phosphoprotein vorkommt (siehe 4.1.2), im Gegensatz zu den Ergebnissen von Sitaramaya et al., (2003), die zu dem Schluss kamen, dass in der Rinderretina das Cx36 Protein nicht phosphoryliert vorliegt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von membranpermeablem dibutyryl-cAMP im Medium der kultivierten Retina das Ausmaß der Phosphorylierung des Cx36 Proteins verstärkt (4.1.3), dies deutet darauf hin, dass hier tatsächlich eine Phosphorylierung des Connexins in

Abhängigkeit des intrazellulären cAMP Levels stattfindet, was vermutlich die Erhöhung des cAMP-Spiegels während Lichteinfalls in der nativen Retina widerspiegelt.

Es gibt seit einiger Zeit aus der Arbeitsgruppe von John O'Brien (Houston, Texas) Ergebnisse zu Cx35, dem Karpfen-Ortholog des murinen Cx36 Proteins, im Hinblick auf dessen Kopplungsverhalten in HeLa-Zellen (Ouyang et al., 2005) und einer Rolle von Kinasen wie der Protein Kinase A (PKA) in der Modulation unter diesen Bedingungen.

Tatsächlich tragen auch Connexinproteine der Maus Konsensussequenzen für mögliche Phosphorylierungen durch PKA und andere Kinasen, so dass hier eine Aktivität der cAMP abhängigen Kinase PKA Sinn machen würde.

Eine solche Phosphorylierung konnte schliesslich auch an GST-Fusionsproteinen aus den zytoplasmatischen Domänen des, GST-Cx36CL sowie GST-Cx36CT *in vitro* nachgewiesen werden. Zusätzlich gelang auch die *in vitro* Phosphorylierung des gesamten aus der Retina immunpräzipitierten Proteins (4.1.4).

Weiterhin wurden in massenspektrometrischen Untersuchungen mehrere phosphorylierte Peptide der *in vitro* phosphorylierten GST-Fusionsproteine nachgewiesen (siehe Urschel et al., 2006, supplemental Material).

## **5.2 Kartierung der Phosphorylierungsstellen des Cx36 Proteins für PKA**

Um die Frage der tatsächlichen Prävalenz der von der PKA genutzten Konsensusstellen zu klären, wurden mehrere punktmutierte GST-Fusionproteine erzeugt, die für jeweils eines der möglicherweise durch die PKA phosphorylierten Serinreste (S110, S293, S306, S315) eine Punktmutation zu Alanin tragen. Ein Vergleich der Inkorporation an radioaktivem Phosphat in die Fusionsproteinmutanten in Gegenwart von  $^{32}\text{P}\gamma\text{-ATP}$  läßt so einen direkten Schluss zu, für welche Phosphorylierungsstelle PKA die grösste Affinität besitzt, die daher auch physiologisch von Relevanz sein könnte. So konnte gezeigt werden, dass die beiden Hauptphosphorylierungsstellen des Cx36 Proteins für PKA die Serinreste S110 und S293 sind (4.1.6).

## **5.3 PKA-abhängige Kopplung in homotypischen gekoppelten AII-Amakrin-Zellen**

Der endgültige Nachweis, dass es sich um den bei der Veränderung der Lichtverhältnisse stattfindenden Phosphorylierungen mit einhergehender Veränderung der Kopplung um eine

Phosphorylierungsreaktion der PKA handelt, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Timm Schubert (Oldenburg) erbracht. In Kopplungsexperimenten mit Neurobiotin, das er in AII-Amakrinzellen explantierter Retinae injizierte, konnte eine signifikante Abnahme der homotypischen Cx36 vermittelten Kopplung gezeigt werden, wenn zusätzlich db-cAMP in das Kulturmedium gegeben wurde. Diese Abnahme an Kopplung war dann nicht vorhanden, wenn ausserdem noch der PKA Hemmstoff H-89 im Kulturmedium präsent war (4.1.7).

Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass tatsächlich die Protein Kinase A für die Entkopplung der AII Amakrinzellen unter diesen Bedingungen verantwortlich ist, was dieser Mechanismus sehr wahrscheinlich für die Anpassung der Retina an veränderte Lichtbedingungen unverzichtbar macht.

Ein socher direkter Mechanismus ist ein weiteres Beispiel für die bereits andernorts beschriebene synaptische Plastizität von Synapsen (Bird et al., 2005), die offenbar durchaus auch für Cx36 enthaltende elektrische Synapsen gültig ist.

Ausserdem wurde im Zuge der homotypischen Kopplungsexperimente zwischen AII Amakrinzellen auch eine Abnahme der heterotypischen Kopplung zwischen AII Amakrin und Bipolarzellen gemessen, diese Modulation der Kopplung war noch stärker als die Reduktion der homotypischen Kopplung (Abb. 4.5 C).

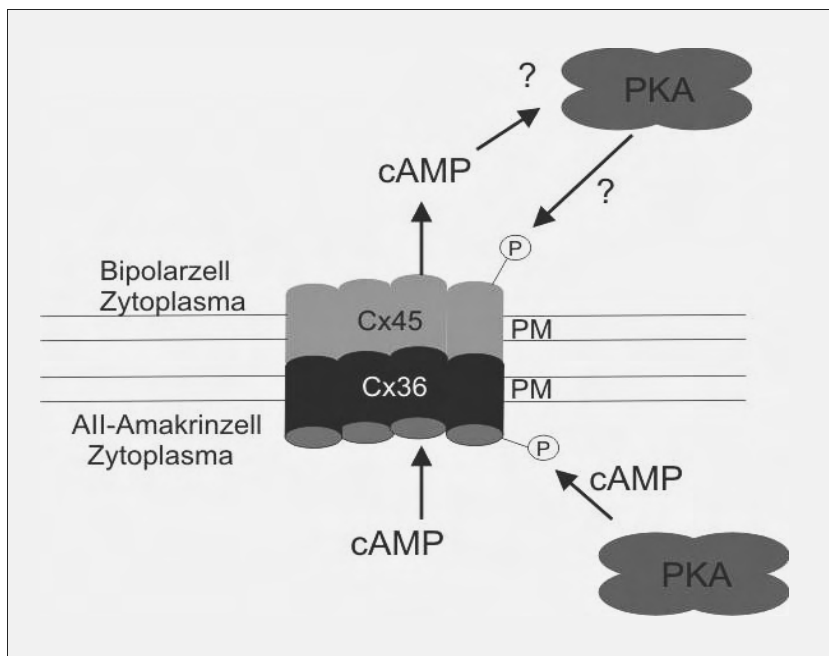


Abb. 5.1: **Aktivität der PKA an der heterotypischen elektrischen Synapse zwischen AII-Amakrinzellen und Bipolarzellen.** Dargestellt ist der hypothetische cAMP-Transfer durch heterotypische Cx36/Cx45 Gap Junctions zwischen AII Amakrinzellen und Bipolarzellen mit dessen möglichen Einfluss auf Cx45, PM: Plasmamembran

Diese Reduktion der heterotypischen Kopplung zwischen AII Amakrin und Bipolarzellen, die durch Cx36 und Cx45 gebildet werden (Maxeiner et al., 2003) könnte auch für eine Aktivität einer cAMP abhängigen Kinase, möglicherweise ebenfalls PKA, auf Seiten der Bipolarzellen sprechen. Tatsächlich ist die PKA in der Lage, den Carboxyterminus des Cx45 Proteins *in vitro* zu phosphorylieren (Abb 4. 7). Ob dies in Retina auch physiologisch eine Relevanz hat, und möglicherweise cAMP, das in der Lage ist, sowohl aus Cx36 als auch aus Cx45 bestehende Gap Junctions zu durchqueren (Bedner et al., 2003), durch die heterotypische Synapse hindurchdiffundiert und auf Bipolarzellseite eine Kinase aktiviert (vgl. Abb. 5.1), müsste in weiterführenden Experimenten noch geklärt werden.

#### **5.4 *in vitro* Phosphorylierung des Connexin45**

Ausser von Protein Kinase A werden GST-Fusionsproteine der zytoplasmatischen Domänen des Cx45 Proteins, genauer die zytoplasmatische Schleife, von der Protein Kinase C (PKC) phosphoryliert (4.1.9).

Schon früh konnte eine Phosphorylierung des Cx43 Carboxyterminus durch PKC gezeigt werden (Laird, 1996), die in der Lage ist, mehrere Aminosäurereste im Cx43CT zu phosphorylieren (P. Lampe, Gap Junction Conference 2007), ein Vorgang, der meist mit dem Abbau von Cx43 in Verbindung gebracht wird (Solan & Lampe, 2007, Laird, 2006).

Ob die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Schleife des Cx45 Proteins funktionell ist und gleichfalls mit dem Abbau des Proteins in Verbindung gebracht werden kann, müssen weitergehende Untersuchungen zeigen.

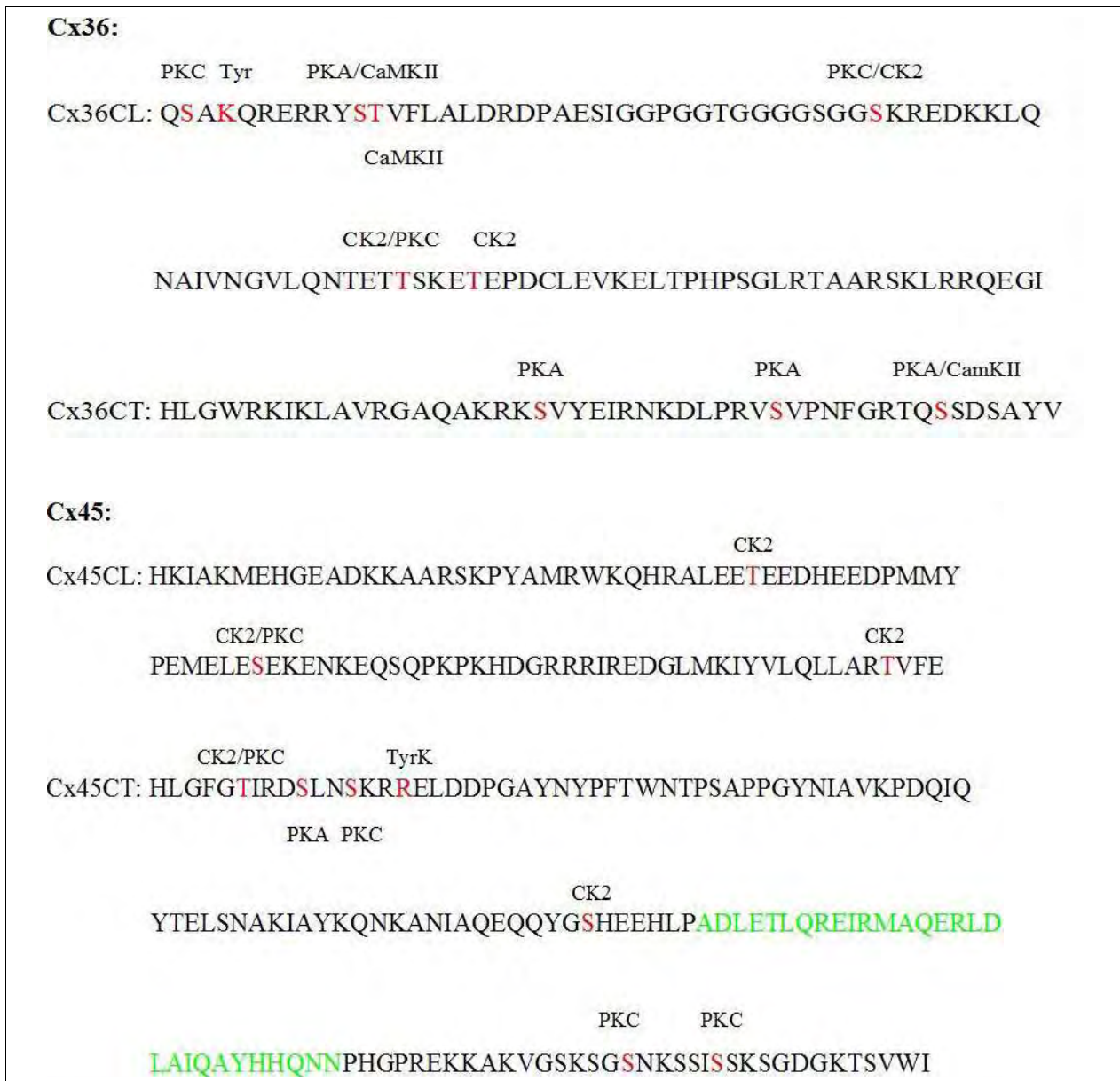
Der einzige vorausgesagte PKC-Konsensus am Cx45CL ist das Serin 138, während der einzige vorausgesagte PKA-Konsensus am Cx45CT das Serin 261 ist (siehe Abb. 5.2). Dies würde die Untersuchung von Cx45S138A Mutanten bzw. Cx45S261A Mutanten *in vitro* und in Zellkultur interessant machen.

Interessant ist allerdings das komplette Ausbleiben der Phosphorylierung des serinreichen Carboxyterminus des Cx45 Proteins durch PKC (siehe Abb. 5.2), ein Umstand, der darauf hindeutet dass hier vermutlich unter keinen Bedingungen eine Phosphorylierung durch die PKC stattfindet. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die gut untersuchte Rolle der PKC am Cx43CT (Lampe & Lau, 2002) in gleichem Maße nicht am Cx45CT ausgeübt werden kann. So kann z.B.

davon ausgegangen werden, dass für die Veränderung der Halbwertszeit des Connexins in an Position 360 verkürzten Cx45 HeLa Zellen (Seong.N.Wong, Dissertation 2005) vermutlich nicht eine direkte Phosphorylierung durch PKC verantwortlich gemacht werden kann.

### **5.5 Phosphorylierung des Cx36 Proteins durch die Calmodulin-abhängigen Kinase (CaMKII)**

Weiterhin wurde in dieser Arbeit im Zusammenhang mit der nachgewiesenen Interaktion von Cx36 mit der Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII), die im Detail von Cantas Alev, Dr. Stephanie Urschel und Stephan Sonntag bearbeitet wird (Alev et al., zur Veröffentlichung eingereicht), die Phosphorylierung des Cx36 Proteins durch rekombinante CaMKII *in vitro* untersucht. Die vermuteten Konsensusstellen für CaMKII im Connexin36 Protein unterscheiden sich nur wenig von den Konsensussequenzen für PKA (siehe Abb.5.2).



**Abb. 5.2. Mögliche Phosphorylierungsstellen der cytoplasmatischen Domänen des Cx36 Proteins:**

Dargestellt sind die zytoplasmatischen Domänen von Cx36 und Cx45 sowie Konsensussequenzen für die Kinasen Protein Kinase A (PKA), Protein Kinase C (PKC), Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII), Casein Kinase II (CK2), Tyrosinkinase (TyrK). CL: Zytoplasmatische Schleife, CT: Carboxyterminus, putativ phosphorylierbare Aminosäurereste sind in rot dargestellt, weiterhin ist die putative Coiled-coil Region im Cx45CT in grün dargestellt. Die Auswertung wurde computergestützt mit Hilfe der Algorithmen des ELM-Servers und des HUSAR-Servers sowie des Lupas Algorithmus durchgeführt.

Der nachgewiesene Einbau von <sup>32</sup>P in punktmutierte Fusionproteine der zytoplasmatischen Domänen des Cx36 Proteins durch CaMKII in Gegenwart von <sup>32</sup>Pγ-ATP zeigt eine teils ähnliche, teils unterschiedliche Nutzung der Phosphorylierungsstellen des Cx36 (4.1.8). Gezeigt werden konnte, dass CaMKII die Aminosäurereste S110 und T111 in der zytoplasmatischen Schleife in ungefähr gleichem Maße nutzt, wobei im Carboxyterminus der einzige benutzte Aminosäurerest

S315 zu sein scheint.

Dies unterscheidet sich von der Phosphorylierung durch PKA, die im Cx36CL ausschliesslich S110 phosphoryliert, während im Cx36CT hauptsächlich S293 bevorzugt wird. Durch die Tatsache, dass hier Phosphatreste an unterschiedlichen Stellen mit dem Protein kovalent verknüpft werden, könnte sich in vollständig unterschiedlichen physiologischen Resultaten widerspiegeln. Somit muss eine Phosphorylierung durch CaMKII nicht notwendigerweise zu einer Reduktion der Cx36 vermittelter Kopplung führen.

Eine Kollokalisierung des Cx36 Proteins mit CaMKII gelang in der unteren Olive (Alev et al., zur Veröffentlichung eingereicht), und nimmt ausserdem in doppelt CamKIIeYFP/Cx36eCFP transfizierten primären Neuronen nach Stimulation mit Glyzin/Glutamin zu. Diese Interaktion und vermutlich auch die Phosphorylierung durch CaMKII könnte einen Einfluss auf die Plastizität von Cx36 enthaltenden elektrischen Synapsen haben, etwa eine Modulation der Synchronizität der in der unteren Olive stattfindenden Oszillationen mit den damit in Verbindung gebrachten motorischen Lernvorgängen (von der Giessen et al., 2008) wären möglich.

## **5.6 Interaktionsproteine des Connexin45**

Im Rahmen des Verständnisses der Biologie der Gap Junction Proteine ist es wichtig, welche Proteine funktionell auf sie Einfluss nehmen oder etwa mit ihnen interagieren. Infrage kommen hier Interaktionspartner, die Einfluss auf die Halbwertszeit (wie TSG101, T. Auth, persönliche Mitteilung), den Öffnungszustand (PKC, Lampe & Lau, 2000, PKA, Urschel et al., 2006) oder in der Organisation eines Gap Junction Plaques bzw. dem Transport haben (ZO-1, Tubulin, Laird, 2006).

Connexin45 (Cx45) kommt in der Embryonalentwicklung eine besondere Rolle zu, die zu einer frühen embryonalen Letalität führt (Krüger et al., 2000), somit ist hier eine Analyse eventueller Bindungsproteine von besonderem Interesse.

So wurde von Krüger et al. (2000) in Cx45 defizienten Embryonen eine Misregulation von kardialem TGF-beta beobachtet, was möglicherweise einen Entwicklungsdefekt zur Folge haben könnte. Eventuelle Bindeproteine, die einen regulatorischen Effekt auf die TGF-beta Konzentration könnten, wären hier von größtem Interesse.

Nachdem bereits am Institut für Genetik ein Hefe-2-Hybrid-Experiment durchgeführt wurde (S. Schlüter, Diplomarbeit, 2003) wurde ein weiteres System zur Untersuchung von Connexin-

Bindepartnern etabliert, der GST-Pulldown (T. Höher, Diplomarbeit, 2003 sowie die vorliegende Arbeit.). Dieser kann, mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse, umfangreiche Datenmengen bezüglich der Interaktionsproteine der Connexin liefern.

So wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Anpassung eines GST-Pulldown Nachweises auf die MudPIT-Technik durchgeführt (siehe 1.11).

Dies hat den Vorteil, dass man grosse Datenmengen der im Bindeansatz vorhandenen Proteine erhält, und so ein eventuell vorhandener unspezifischer Bindungen, die in allen Kontrollen gleichermassen vorhanden ist, durch Subtraktion der Proteine in den Negativkontrollen entfernt werden kann. Auf diese Weise können selbst spezifisch bindende Proteine, die in kleiner Zahl vorhanden sind, nachgewiesen werden.

Bei Pulldown-Experimenten ist ein so ermittelter Bindungskandidat nicht notwendigerweise ein direkter Interaktionspartner des eingesetzten Köderproteins, sondern kann möglicherweise in einem Komplex vorliegen und muss in weitergehenden Experimenten bestätigt werden. Wenn man z. B. ein Motorprotein spezifisch nachgewiesen hat, besteht dennoch die Möglichkeit, dass das so erlangte Positivergebnis nur über die gemeinsame Bindung an Strukturen wie einen Mikrotubulus zustande kommt. (Dr. D. Wolters, persönliche Mitteilung)

Die Aminosäuresequenz des in den MudPIT-Listen nachgewiesenen Peptids hat ausserdem nicht notwendigerweise etwas mit dem etwaigen Bindemotiv zu tun, dieses kann sich an jeder Position des Gesamtproteins befinden, wobei es sich bei Membranproteinen auch um extrazelluläre Fragmente handeln kann (vgl. Fischer et al., 2006).



### **5.6.1 Interaktionskandidaten des Carboxyterminus des Cx45 Proteins in Herzlysat**

Folgende Identitäten von Bindeproteinen konnten am Cx45CT ermittelt werden:

#### **Endothelin I:**

Ein häufig spezifisch nachzuweisendes Peptid war Endothelin I, das in zwei von drei Positivlisten und keiner Negativliste vorkam. Endothelin I ist als extrazellulär beschriebenes Peptid bekannt, das als potenter Vasokonstriktor fungiert. (Marasciulo et al., 2006) Es wurde bereits gezeigt, dass Endothelin-Rezeptoren des Typs I und II für die Erkennung und Internalisierung des Peptids notwendig sind, über das Verbleiben nach Internalisierung ist allerdings nichts bekannt (Gregan et al., 2004). Auch bei der Entstehung von Arrhythmien spielt Endothelin I eine Rolle. So resultiert die Behandlung von Kardiomyozyten mit Endothelin I in veränderter Cx43 vermittelter Reizweiterleitung und Umstrukturierung von Gap Junctions (Reisner et al., 2008). Weiterhin soll Endothelin I als Faktor für die Differenzierung von embryonalen Cardiomyocyten in Zellen des Reizweiterleitungssystems des Herzens eine Rolle spielen (Patel et al., 2005). In Astrozyten konnte gezeigt werden, dass Endothelin I den Gap Junction vermittelten Glukosetransport inhibiert (Blomstrand & Giaume. 2006); ausserdem induziert das Peptid in Ovarkarzinomzellen Gap Junction vermittelte Kopplung durch Phosphorylierung von Connexin43 (Spinella et al., 2003) Da dieses Peptid als sekretorisch beschrieben wird und daher vermutlich topologisch nicht mit einem zytoplasmatischen Teil eines Connexinproteins in Kontakt kommen, kann, wurde sich in dieser Arbeit auf andere Interaktionsproteine konzentriert.

#### **Lin7b:**

Das Lin7b Protein ist als sogenanntes Gerüst- (scaffolding) Protein beschrieben worden, wo es als für die Organisation mehrerer Proteine beschrieben worden ist (Olsen et al., 2005, Hruska-Hageman et al., 2004). Es enthält weiterhin eine PDZ-Domäne, könnte so vergleichbar zu der beschriebenen Interaktion zwischen Cx43 und ZO-1 im Herzen mit Cx45 interagieren. Auch wurde dieser Interaktionspartner auf der Gap Junction Konferenz in Cambridge (2004) für Connexin43 genannt (Singh et al. Posterpräsentation). In Experimenten (4.2.6.1) gelang die Klonierung der cDNS sowie die <sup>35</sup>S-markierte *in vitro*-Translation des Lin7b Proteins, allerdings konnte hier keine direkte Bindung nachgewiesen werden. Da Lin7b jedoch im MudPIT-vermessenen GST-Pulldown eindeutig spezifisch nachgewiesen werden konnte, ist jedoch hier weiterhin eine indirekte Bindung denkbar, etwa über andere PDZ-Domänen enthaltende Proteine.

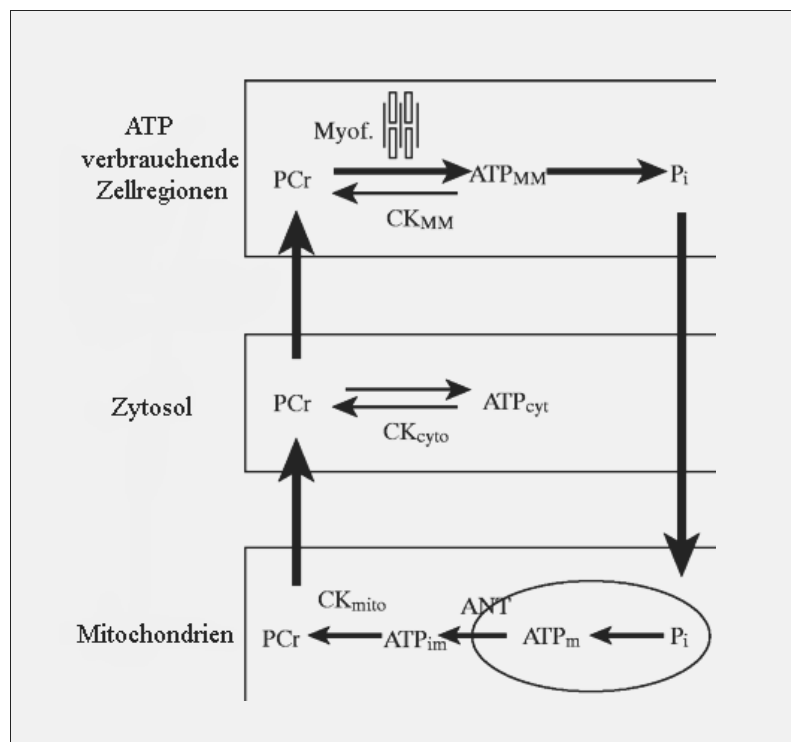
**My-L4 (Myosin light chain 4):**

Das My-L4 Protein ist eine herzspezifische Isoform eines Motorproteins, das im Zusammenhang mit der Muskelentwicklung und beschrieben ist. So wird es in fötalen Herz- und Muskelzellen sowie adulten Atrien exprimiert (Arnold et al., 1988) und überlappt so mit den Expressionsfenstern des Cx45 Proteins. In Experimenten (4.2.6.2) gelang die Klonierung der cDNS sowie die <sup>35</sup>S-markierte *in vitro*-Translation des My-L4 Proteins, allerdings konnte hier keine direkte Bindung nachgewiesen werden. Hier ist ebenfalls dennoch eine indirekte Bindung und eine transportrelevante Funktion über z. B. Tubulin denkbar.

**CreatineKinaseM:**

Die muskelspezifische Isoform der Creatin-Kinase ist ein wichtiges Element der Energie-Homöostase. Sie katalysiert folgende Reaktion :

**Abb. 5.3: Schematische Übersicht der Funktion der Creatin Kinase.** Gezeigt ist der intrazelluläre Transfer von Metaboliten zu ATP-verbrauchenden Bereichen der Zelle CK<sub>MM</sub>, myofibrilläre Creatin Kinase; CK<sub>cyto</sub>, zytoplasmatische Creatin Kinase; CK<sub>mito</sub>, mitochondriale Creatin Kinase; ANT, Adenin-Nukleotid Translocase; ims., äussere mitochondriale Matrix; ATP<sub>MM</sub>, ATP an Myofibrillen; ATP<sub>cyt</sub>, cytoplasmatisches ATP; ATP<sub>im</sub>, ATP im Intermembran-Raum.; ATP<sub>m</sub>, ATP im Matrix-Raum., entommen aus Suarez et al., 2003.



Diese Kinase ist in der Lage, eine Phosphatgruppe an Creatin anzuhängen, was in der Bildung von Creatinphosphat resultiert. Somit wird hier ein Energiepuffer geschaffen, der in Bedarfszeiten rasch verfügbar gemacht werden kann. Weiterhin wird eine Aktivitätsänderung der Creatin-Kinasen mit kontraktile cardialer Dysfunktion in Verbindung gebracht (Lygate et al., 2007). Auch für Transmembranproteine wie den Trombinrezeptor PAR-1 und dessen Aktivität ist eine biochemische Interaktion mit einer CreatinKinase notwendig (Mahajan et al., 2000). Ein solcher Mechanismus

könnte auch in Mikroumgebungen wie einem Gap Junction Plaque eine Rolle spielen und somit die dortige Anwesenheit der CreatinkinaseM sinnvoll machen. Ausserdem spielen auch Creatin-Kinasen in anderen Zelltypen mit hohem ATP-Bedarf wie Neuronen eine Rolle (Andres et al., 2008).

Es ist weiterhin denkbar, dass die möglicherweise kontrollierte Weitergabe von ATP in Geweben, bzw. dessen Fehlen in Cx45 defizienten Tieren, welche embryonal sehr früh (Krüger et al., 2000) versterben in den dortigen noch nicht mit über Gefäße mit einer Grundversorgung ausgestatteten Geweben von Wichtigkeit ist.

Für Cx43 wurde unlängst gezeigt (Kang et al., 2008) dass ATP zumindest über Hemikanäle passieren kann. Sollte dies auch für Vollkanäle (Gap Junctions) und ausserdem für Cx45 zutreffen, würde dies die Anwesenheit der Creatin Kinase am Cx45 Carboxyterminus erklären können:

Interessant hierbei ist zusätzlich noch die Verknüpfung folgender Fakten: In HeLa Zellen vermessen sind die elektrophysiologischen Eigenschaften des Cx45 Kanals im Vergleich zu dem carboxyterminal markiertem Cx45eCFP Kanal eher unauffällig (F. Bukauskas, persönliche Mitteilung), was darauf hindeutet, dass die Markierung mit dem blau fluoreszierenden Protein sich in der elektrophysiologischen Eigenschaften des Gap Junction Kanals nicht negativ auswirkt. Andererseits ist die transgene Cx45eGFP BAC-Maus zwar lebensfähig und zeigt keinen auffälligen Phänotyp, ist jedoch im Cx45del/del Hintergrund embryonal lethal (J. v. Maltzahn, Doktorarbeit, 2008). Dies deutet darauf hin, dass die Fluoreszenzmarkierung tatsächlich die Funktion des Gap Junction Proteins an einem noch nicht untersuchten Zeitpunkt stört, was zu einem embryonalen Versterben, der Tiere, möglicherweise ähnlich zu dem Phänotyp der Cx45 defizienten Tiere führt. Eine Möglichkeit zur Erklärung dieses Phänomens ist die durch die Fluoreszenzmarkierung ausbleibende Bindung von Proteinen, die für die die Weitergabe, bzw. Bereitstellung von ATP am Gap Junction Kanal sorgt. Ein solches Protein könnte die Creatin Kinase M sein (siehe Abb. 5.4)

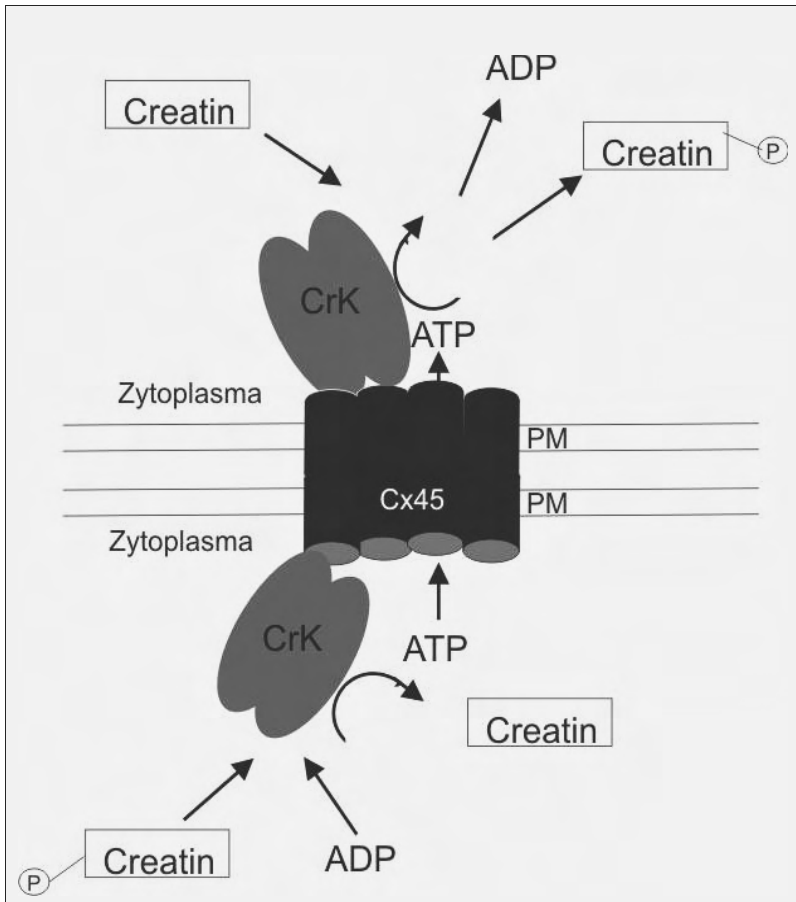


Abb. 5.4: Schematische Übersicht über die hypothetische Rolle der Creatinkinase M an Cx45-beinhaltenden Gap Junctions

Dargestellt ist die katalytische Umwandlung von ATP in Creatinphosphat und ADP und vice versa durch die vermutlich an Cx45 bindende Creatin Kinase M sowie die mögliche beteiligte Passage von ATP durch Gap Junctions. CrK: Creatin Kinase M, PM: Plasmamembran

Die Creatin Kinase M wurde erfolgreich aus cDNS aus dem Herzen kloniert und  $^{35}\text{S}$ -markiert *in vitro* translatiert (4.2.7). Auch bei vollständiger Blockierung der unspezifischen Bindestellen des Versuchsansatzes mit BSA und Fischgelatine konnte unabhängig von der Stringenz der Waschpuffer dieses Protein in der Negativkontrolle beobachtet werden. Somit ist dieses Experiment nicht aussagekräftig, da der unspezifische Hintergrund in diesen Experimenten nicht gesenkt werden konnte.

Allerdings zu beobachten ist die ungewöhnliche wolkenähnliche Form der CrkM-Bande in den Cx45CT Proben (Abb. 4.12). Zu beachten ist hier dass auf gleicher Höhe (43 kDa) mit dem Translationsprodukt das ko-eluierte GST-Fusionsprotein, das bei 42 kDa läuft, scheinbar von dem  $^{35}\text{S}$ -Signal nachgezeichnet wird. Der Grund für ein solches Laufverhalten ist unklar. Zu erwarten wäre in einem solchen Fall eine Verdrängung des Translationsproduktes von dem in grösserer Konzentration vorliegendem GST-Fusionsprotein, was in der Beobachtung einer scharf fokussierten, gebogenen CrkM Bande resultieren müsste. Da sich aber die gesamte  $^{35}\text{S}$ -Markierung auf die auf gleicher Höhe liegende Fusionsproteinbande zu verteilen scheint, ist dies hier nicht der Fall. Eine derart starke Bindung der beiden Proteine, dass mit Lämmli-Probenpuffer keine

Dissoziation der beiden Proteine erreicht wird, kann aufgrund der schwachen und mit zunehmender Waschstringenz noch schwächer werdenen Waschstringenz ausgeschlossen werden.

Um diese Fragestellung zu klären, müsste man ein anderes Interaktionssystem wählen, in dem die beiden putativen Interaktionspartner nicht in der SDS-PAGE die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit besitzen, etwa einen kleinere Markierung als ein GST-Protein, wie zu z. B. den 6xHis („Hexahistidin-tag“).

### **Ryanodin-Rezeptoren:**

Ein weiterer denkbarer Interaktionspartner des Cx45CT wären Ryanodinrezeptoren, deren tryptischen Peptide in den MudPIT Proben gefunden wurden. Als Proteine des sarkoplasmatischen Retikulums sind sie als Interaktionsproteine zunächst eher von topologisch geringer Relevanz. Allerdings wird gegenwärtig in unserer Arbeitsgruppe diskutiert, dass das Connexin45 Protein in den T-Tubuli der Skelettmuskeln vorkommt (V. Wulf, persönliche Mitteilung). Da das sarkoplasmatische Retikulum mit den T-Tubuli sowohl in Skelettmuskelzellen, als auch in Herzmuskelzellen eng assoziiert ist, könnte die biochemische Interaktion hier eine funktionelle Relevanz besitzen. Alternativ wäre eine Lokalisation des Cx45 Proteins am sarkoplasmatischen Retikulum ebenfalls nicht auszuschliessen, dies würde die Erklärung des Vorkommens der Ryanodinrezeptoren im gleichen Proteinkomplex erklären und die Überlegung einer direkten Interaktion der beiden Strukturen unnötig machen.

### **5.6.2 Interaktionskandidaten der zytoplasmatischen Schleife des Cx45 Proteins in Herzlysat**

Folgende Identitäten von Bindeproteinen konnten am Cx45CT ermittelt werden:

#### **Praja1:**

Die spezialisierte Ubiquitin-Ligase Praja1 ist von der Aktivität von TGF-beta abhängig (Saha et al., 2006) und definiert so den Status und Abbau des Tumorsuppressors ELF. So könnte sie auch in den Abbau von Connexinproteinen involviert sein.

#### **Carbonyl-Reduktase 1:**

Dieses im Prostaglandin-Stoffwechsel involvierte NADPH-abhängige Protein wurde mit zwei unterschiedlichen tryptischen Peptiden gefunden und war in allen drei Proben vorhanden. Zu seinen möglichen Substraten gehören unter anderem Prostaglandine, die als durch Cx43 Hemikanäle

passierbar beschrieben wurden (Jiang et al., 2003) und in Osteoblastenzellen einen Zusammenhang zwischen „fluid flow sheer stress“ und Gap Junction vermittelter Kopplung herstellen

### **5.6.3 Proteine aus HM-1-Zellysat, die and den C-Terminus des Cx45 binden**

Folgende Identitäten von Bindeproteinen konnten am Cx45CT in HM-1 Zellen ermittelt werden:

#### **CateninD2:**

CateninD2 ist als in der Hirnentwicklung wichtiges postsynaptisches Catenin in der Literatur beschrieben, in welchem Zusammenhang es als mit PSD-95 (postsynaptic density 95) und dem N-methyl-D-aspartic acid receptor 2A (Nr2A) interagierend beschrieben wird (Jones et al., 2002). Die Überexpression des Proteins in Neuronen ist dort als dendritenwachstumsfördernd beschrieben. Möglicherweise spielt das Protein hier eine Bindungsfunktion in ähnlicher Weise eine Rolle bei der Embryonalentwicklung, in dem es die Lokalisation des Cx45 Proteins in unterschiedlichen Entwicklungsstufen des Gehirns determiniert.

#### **A kinase anchor protein 1 (AKAP1):**

Proteine dieser Familie haben kinaserekrutierende Eigenschaften (Chen et al., 2007). Insbesondere während der frühen Entwicklung ist AKAP1 für die Rekrutierung der Protein Kinase A (PKA) zu zellulären Subdomänen verantwortlich (Webb et al., 2008). So könnte das Protein eine Rolle bei der Rekrutierung der PKA an Cx45 spielen, bevor eine Phosphorylierung stattfindet (siehe 4.1.9). und auf diese Weise als Faktor für die Regulation der Cx45 vermittelter Kopplung unter PKA-Einfluss notwendig sein.

## **5.7 Interaktion des Gorasp2-Proteins mit dem Carboxyterminus des Cx45 Proteins**

Von allen zur Bearbeitung möglichen Interaktionskandidaten wurde im Folgenden das Gorasp2 Protein ausgewählt, da es die beste Bindevidenz aller untersuchten putativen Interaktionspartner aufwies.

### **5.7.1 Biochemische Interaktion des Gorasp2-Proteins und des C45CT**

Das Protein Gorasp2, dessen Ortholog in Ratte zuerst von Shorter et al., 1999 als am medialen Golgi lokalisiertes Protein in Zellkultur beschrieben wurde, konnte erfolgreich aus der cDNS von ED 9.5

Embryonen kloniert und *in vitro* translatiert werden (4.2.7). Eindeutig nachzuweisen war eine Bindung des <sup>35</sup>S-markierten Gorasp2 Proteins an den C-Terminus von Cx45 (4.2.9.1)

In Abb. 4.13 zu sehen ist, dass die Bindung mit steigender Stringenz der Waschlösungen an Spezifität gewinnt. Während bei niedriger Stringenz noch eine Bindung an GST beobachtet wurde, ist diese bei höherer Stringenz nahezu ganz verschwunden. Als Kontrolle wurden hier 2 µl des Translationsansatzes aufgetragen, während für die Interaktionsassays jeweils 10 µl eingesetzt wurden. Offenkundig ist, dass nur ein geringer Anteil des zu Bindung eingesetzten Gorasp2 in den Experimenten nachgewiesen wurde, woraus man annehmen kann, dass die Interaktion möglicherweise eher schwach ist.

### **5.7.2 Analyse von terminal FLAG-markierten Gorasp2 Protein in Cx45 HeLa Zellen.**

Um die biochemische Bindung des Gorasp2-Proteins an Cx45 in Zellkultur nachzuvollziehen, wurde mit einer FLAG-Markierung versehenes Gorasp2 in stabil Cx45 exprimierenden HeLa Zellen transfiziert und auf Kolokalisation des Cx45 Immunsignals und des FLAG-Immunsignals untersucht.

Die hier zu beobachtende Mislokalisierung des N-terminal markierten Gorasp2 Proteins in ist in Übereinstimmung mit den Experimenten von Barr mit der Rattenisoform, der bei seinen Experimenten einen Verlust der Golgi-Lokalisation seines gleichfalls N-terminal markierten Gorasp2 Orthologs beschreibt (Short et al., 2001). Bei den Gorasp2-Expressionen mit C-terminal markiertem Protein ist eine starke Kolokalisation mit Cx45 Immunsignalen zu beobachten, wobei zu bemerken ist, daß sich in diesem Zellklon das Cx45 Protein hauptsächlich intrazellulär befindet und nur selten Plaques bildet. Eine Zurückhaltung und somit funktionelle Kolokalisation des Cx45 Proteins in der Region des Golgi kann ausgeschlossen werden, da die nicht mit pGorasp2\_FLAG transfizierten HeLaCx45 Zellen sich von den transfizierten Zellen nicht in ihrer Lokalisation des Cx45 Proteins unterscheiden (Abb 4.15)

Für weitere Analysen wurden entschieden, eine Cx45eCFP Zelllinie zu benutzen, die das Connexin hauptsächlich an der Plasmamembran exprimiert, damit die in HeLaCx45 Zellen vermutlich nicht funktionelle Kolokalisation die Untersuchung nicht mehr stören kann.

### **5.7.3 GST-Pulldown-Analyse von aus transient Gorasp2-eYFP exprimierenden HeLa- Zellen**

Mit Lysat aus transient Gorasp2 exprimierenden HeLa Zellen wurde hier die Bindung des Gorasp2eYFP Proteins an den Carboxyterminus des Cx45 Proteins in Zellkulturlysaten nachgewiesen (4.2.9.8). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass Gorasp2eYFP noch an den trunkeierten Carboxyterminus (vgl. Diplomarbeit T. Höher, 2003, Dissertation S. Maxeiner, 2005) des Cx45, und nicht an die terminale Region bindet. Ausserdem konnte das Gorasp2eYFP Protein ebenfalls in dem Versuchsansatz nachgewiesen werden, der ein immobilisiertes GST-Cx43CT Fusionsprotein enthielt, was eine mögliche connexinübergreifende Funktion des Gorasp2 Proteins bedeuten könnte. Eine Co-Immunfluoreszenz in transient Gorasp2eYFP exprimierenden HeLaCx43 Zellen zeigte allerdings keine Kolokalisation der beiden Proteine (nicht gezeigt).

Die Tatsache, dass das Gorasp2eYFP Fusionsprotein an den trunkeierten C-Terminus, (GST-Cx45CC), und nicht an GST-Cx45C2T, das das terminale Stück des Carboxyterminus des Cx45 Proteins darstellt, bindet, macht eine in anderen Experimenten mögliche Störung der Interaktion durch die terminal fusionierten eCFP-Markierung unwahrscheinlich.

Die Interaktion der beiden Proteine im GST-Pulldown ist äusserst schwach, sie kann vermutlich nicht mit einer möglichen in Gorasp2-FLAG exprimierenden HeLaCx45 Zellen starken Kolokalisation in Verbindung gebracht werden.

Ob die PDZ-Domäne des Gorasp2 Proteins für die Bindung an den Cx45CT verantwortlich ist, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

### **5.7.4 Immunpräzipitation von Cx45eCFP sowie Co-Immunpräzipitation von Gorasp2eYFP**

Zunächst konnte (Abb. 4.19) der Nachweis erbracht werden, dass eine Immunpräzipitation des Cx45eCFP Proteins möglich ist, was eine Grundvoraussetzung für den Versuch einer Co-Immunpräzipitation ist.

Die Co-Immunpräzipitation wurde nicht mit Lysat aus Cx45eCFP HeLa Zellen, sondern mit Lysat aus transient Gorasp2eYFP exprimierenden Cx45 HeLa Zellen durchgeführt. Das Experiment ist eindeutig und reproduzierbar (4.2.9.9), die äusserst geringe Stärke des Immunsignals im Vergleich zu der stark überstrahlten Lysatkontrolle legt die Vermutung nahe, dass dieser Befund nicht eine mögliche biochemische Assoziation innerhalb der mit Immunfluoreszenz nachgewiesenen fast vollständigen Kolokalisation von Cx45 und Gorasp2-FLAG in HeLaCx45-Zellen widerspiegelt



(siehe Abb.4.15), sondern dass es sich bei einer solchen schwachen Bindung eher um eine spezialisiertere Assoziation handelt, die eher auf eine seltene Assoziation deuten könnte.

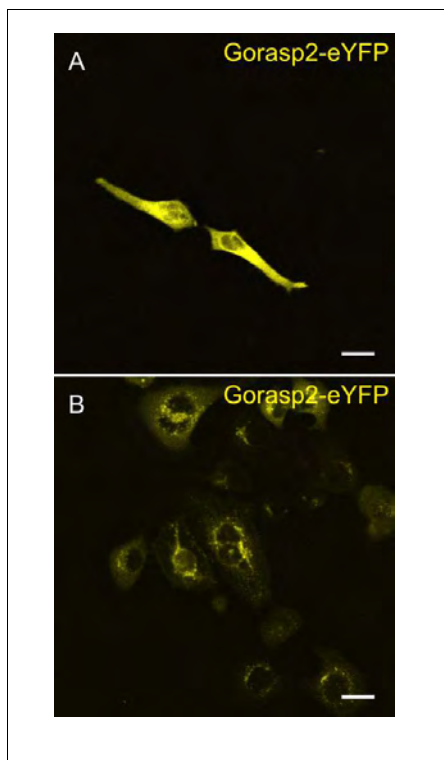
### **5.7.5 Kofluoreszenz von Gorasp2eYFP und Cx45eCFP in HeLaCx45eCFP Zellen**

Um die eventuelle Kolo-kalisation der beiden Fusionsproteine in lebenden Zellen ohne die Notwendigkeit einer Fixierung studieren zu können, wurde das Gorasp2eYFP Protein in HeLaCx45eCFP Zellen (zur Verfügung gestellt von S. Sonntag) transient exprimiert. Es wurde ein Zellklon benutzt, der die Expression des Cx45eCFP Proteins an der Plasmamembran aufweist. In ersten Analysen war keine Kolo-kalisation der beiden Proteine zu beobachten (Abb.4.16). Wenn allerdings die transfizierten Zellen länger in Kultur blieben, konnte eine höchst seltene Kolo-kalisation der beiden Proteine an der Plasmamembran wie auch intrazellulär nachgewiesen werden (Abb. 4.21).

### **5.7.6 Lokalisation des Gorasp2YFP-Proteins in HeLa-Zellen während des Zellzyklus**

Um die seltene Kolo-kalisation der beiden mit einer Fluoreszenzmarkierung versehenen Proteine zu erklären wurde die Möglichkeit untersucht, inwieweit die ungewöhnliche Lokalisation des Gorasp2eYFP Proteins abhängig vom Zellzyklus sein könnte. Beispielsweise ist beschrieben, daß das Ratten-Ortholog des Gorasp1 seine golgistä-dige Lokalisation im Zuge der Mitose aufgibt, und es so möglicherweise auch zu einer Kolo-kalisation des Gorasp2eYFP Proteins und des Cx45eCFP Proteins kommen könnte (Preisinger et al., 2005).

Zu diesem Zweck wurde ein prometaphasischer Mitosearrest mittels Nocadazol (siehe Dissertation Monika Kulartz, 2004) durchgeführt (Abb 5.3A), um auf diese Weise die Zellen zu beobachten, wie sie nach Auswaschung der Substanz wieder in den Zellzyklus eintreten und die Zellteilung durchführen. Weiterhin wurden die Zellen einem doppeltem Serumentzug unterzogen, bei dem beschrieben ist (Kulartz&Knippers, 2004), dass HeLa Zellen in der G-0 Phase des Zellzyklus arretieren (Abb 5.4B), um so ihren Zellzyklus zu synchronisieren. Dies hatte das Ziel, sie daraufhin wieder durch Serumgabe synchron den Zyklus beginnen zu lassen, um so möglicherweise eine Lokalisation des Gorasp2eYFP Proteins an der Plasmamembran zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden so synchronisierte, wieder mit Serumgabe stimulierte Zellen stündlich nach Aufhebung des Blocks unter dem Laser Scanning Mikroskop analysiert.



**Abb. 5.4.: Fluoreszenzanalyse von Gorasp2eYFP in HeLa Zellen nach Zellzyklusarrest**

Dargestellt sind unfixiert transient mit pGorasp2eYFP\_zeo transfizierte HeLa-Wildtyp-Zellen, eCFP-Fluoreszenz in blau, eYFP-Fluoreszenz in gelb dargestellt, A: typisches Zellpärchen nach Mitosearrest, B: exemplarische Zellen nach G0-Arrest (Zeitpunkt 0), Grössenbalken: 20 µm

Exemplarisch gezeigt ist in Abb.5.4A ein nach Abklopfen der mitotischen Zellen neu ausgesähte, zu einem Tochterzellenpaar sich teilenden HeLa Zellen, die das Gorasp2eYFP Protein exprimieren. Festzustellen ist die eher gleichförmige, vermutlich vesikuläre Verteilung des Proteins beim Abschluss der Zytokinese.

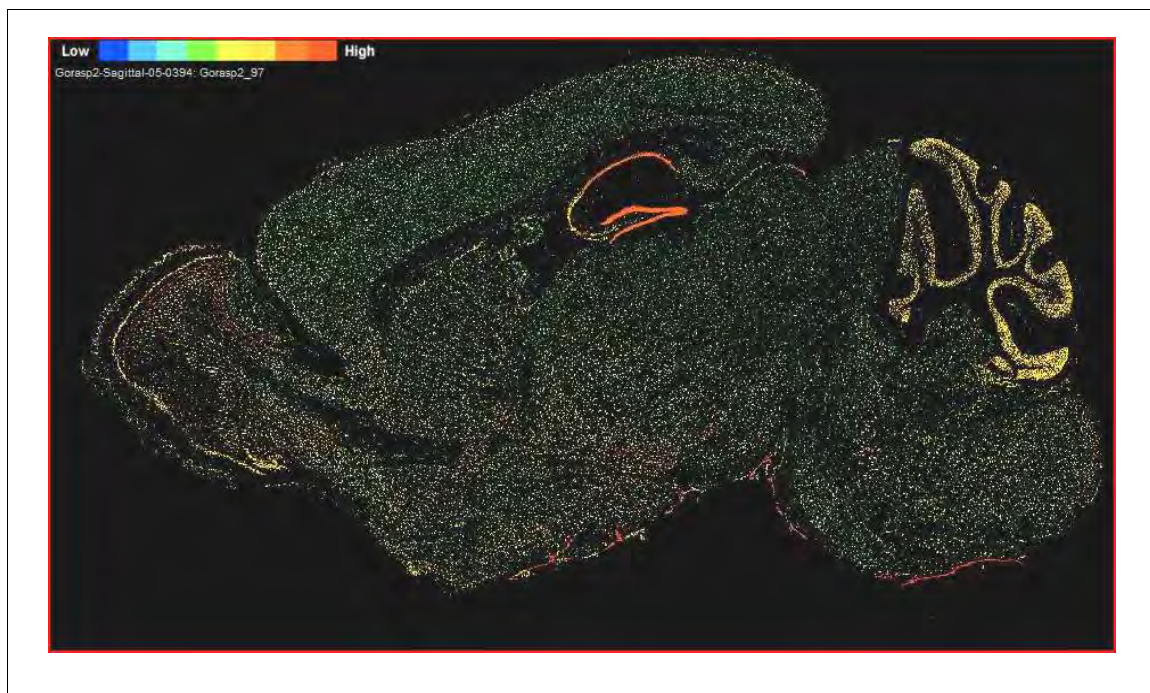
In Abb.5.4B ist exemplarisch die Lokalisation des Gorasp2eYFP Proteins während Entlassung aus dem G0 Arrest zum Zeitpunkt 0 zu sehen. Die Zeitpunkte 0 h, 1 h, 2 h, 3 h und 4 h unterschieden sich hier nicht in der typischen perinukleären Lokalisation des Gorasp2eYFP Proteins (nicht dargestellt).

Nach vierstündiger Analyse war die Expression des Gorasp2eYFP Fusionsproteins in den transient transfizierten Zellen soweit zurückgegangen, dass die Analyse eingestellt werden musste. Umfassendere Untersuchungen über längere Zeiträume könnten mit der unter 4.3.9 beschriebenen stabil transfizierten Gorasp2-eYFP Zelllinie erneut in Angriff genommen werden.

Dies läßt dennoch vorläufig vermuten, daß die Lokalisation des Gorasp2eYFP Proteins an der Plasmamembran nicht eine Funktion des Zellzyklus ist. Endgültig beantworten liesse sich diese Frage in der Wiederholung der obigen Experimente mit einer das Gorasp2eYFP Protein stabil exprimierenden HeLa Zelllinie, die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls hergestellt wurde.

### 5.7.7 *in situ* Hybridisierungen von Gorasp2 in saggitalen Hirnschnitten der adulten Maus (Allen Brain Atlas)

Die Autoren um Kinseth (Kinseth et al. 2007) zeigten im Herbst 2007 eine mögliche neue Rolle eines Orthologs des Gorasp2 Proteins. So wurde ein für das Ortholog GRASP defizienter Schleimpilz *Dictyostelium* untersucht, der sich im Gegensatz zu Überlegungen zu vorherigen Untersuchungen (Shorter et al., 1999) als vital und in seinem Wachstum unbeeinflusst herausstellte. Einzig allein die Sporulation des Schleimpilzes war gestört (siehe 1.5). Der Defekt konnte von Kinseth et al. auf die nicht mehr erfolgende Sekretion von AbCA zurückgeführt werden, ein für die Sporulation essentieller Faktor. Da die Autoren vorhersagen, dass aufgrund der hohen Sequenzhomologie des AcbA zu AcbP, der in *mammalia* als bekannter Neuropeptid-Voläufer bekannt ist (Guidotti et al., 1983) die GRASP Proteine, insbesondere Gorasp2, auch in höheren Tieren für eine unkonventionelle Sekretion von Schlüsselproteinen verantwortlich sein könnten. Hierzu passt eine *in situ* Hybridierung der Gorasp2 mRNA, die im Rahmen eines grösseren Screens von dem Allen Brain Institute durchgeführt wurde und auf der Internetseite <http://www.brain-map.org> der wissenschaftlichen Gemeinschaft zur Verfügung steht:



**Abb. 5.6.: *In-situ* Hybridisierung gegen Gorasp2 mRNA in sagittal geschnittenem adulten Mäusehirn**

Dargestellt ist die Quantifizierung einer *in situ* Hybridisierung gegen die Gorasp2-mRNA. Kalte Farben (blau über grün) bedeuten ein niedriges Level, warme Farben (gelb bis hin zu rot) ein hohes Level an hybridisierter mRNA. Bild entnommen aus dem Allen Brain Atlas. ([www.brain-map.org](http://www.brain-map.org))

Diese Auswertung der *in situ* Hybridisierung eines exemplarischen Saggitalschnitts zeigt das Vorhandensein von Gorasp2-mRNA im adulten Mäusehirn. Zu erkennen ist keineswegs eine ubiquitäre Expression gleicher Stärke, sondern statt dessen eine im hohen Maße differenzierte Ausprägung der mRNA, mit hohen Konzentrationen in z. B. hippocampalen Regionen und im olfaktorischen Bulbus, d.h. Regionen, in denen sich möglicherweise die Expressionen von Cx45 und Gorasp2 durchaus überlappen könnten. Schliesslich ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass das Gorasp2 Protein möglicherweise nicht nur die von Barr (Shorter et al., 1999) postulierte Funktion in der Organisation der Golgi-Zisternen besitzen könnte, sondern auch eine darüber hinaus gehende von Kinseth (Kinseth et al. 2007) postulierte Funktion in der unkonventionellen Sekretion von Proteinen besitzt. Zusätzlich denkbar wäre auch eine Funktion des Gorasp2 Proteins in einem unkonventionellen Plasmamembran-gerichteten Transport von den dort ständigen Connexinen, um so eine Protein- und funktionspezifische Lokalisation der Connexinproteine zu gewährleisten. Diese Fakten legen den Schluss nahe, dass es sich bei den wenigen Kollokalisierungen des Cx45eCFP und des Gorasp2eYFP Proteins um Zellkulturartefakte handeln könnte, die aus verschiedenen entarteten, einzelnen HeLa Zellen resultieren.

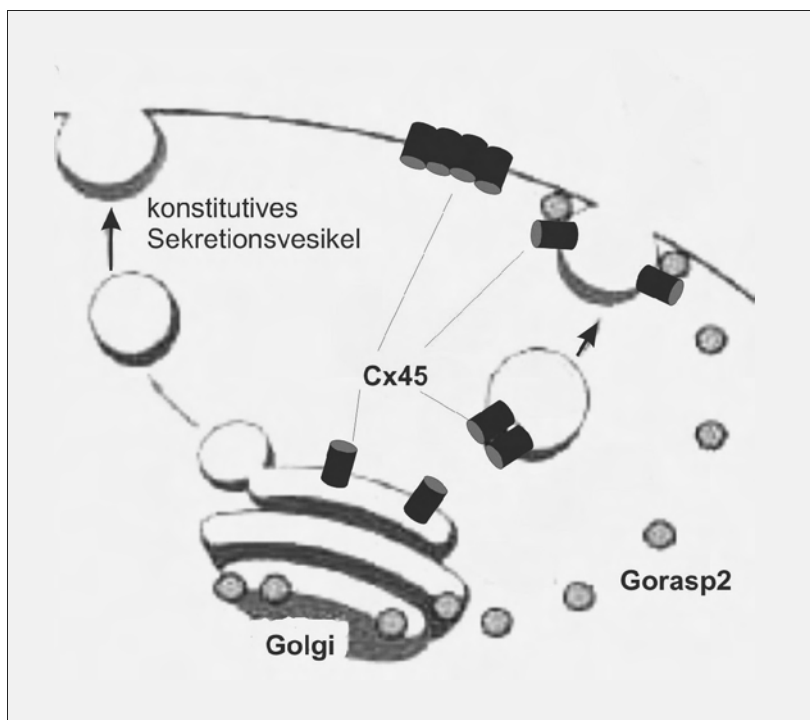
**5.7.8 Kollokalisierung von Cx4eCFP und Gorasp2eYFP in transient doppelt transfizierten RT4-AC Zellen**

Als Konsequenz aus der möglicherweise zellspezifischen Interaktion der beiden Proteine wurde eine Zelllinie gewählt, die eine bessere Möglichkeit gewährt, einen eventuelle Gorasp2 positiven neuronalen Zelltyp darstellen zu können. Die Wahl fiel auf die RT4-AC Zelllinie, die als differenzierbar in mehrere unterschiedliche Zelltypen des Gehirns beschrieben wurde (Droms et al., 1987). In doppelt Cx45eCFP und Gorasp2eYFP transient exprimierenden RT4-AC Zellen (4.2.9.12) kann nicht nur eine fast vollständige Kollokalisierung der beiden Fusionsproteine festgestellt werden, es findet bei Anwesenheit des fluoreszenzmarkierten Cx45eCFP in der Zelle eine Veränderung der Lokalisation des Gorasp2eYFP Proteins statt. Das zuvor in einer perinukleären, monopolar neben

dem Zellkern Lokalisation zu findende Protein verändert diese Verteilung und nimmt den Raum des in intrazellulären Aggregaten vorhandene Cx45eCFP Proteins ein. Auch wenn das Cx45eCFP Protein in dieser Zelllinie nicht die Plasmamembran zu erreichen scheint, ist doch die Sequestrierung des Gorasp2eYFP-Proteins in diese Aggregate ein möglicher Hinweis für eine Bindung in diesem Zelltyp.

RT4-AC Zellen stellen vermutlich mit ihrem hohen Differenzierungspotential ein besseres Modell zur Untersuchung der Interaktion der beiden Proteine dar als die ebenfalls eingesetzten, Neuroblastomcharakter besitzenden und so determinierten N2A Zellen.

Wenn es möglich wäre, diese beiden fluoreszenzmarkierten Proteine in einer Zelllinie zu studieren, die das Connexinprotein an der Plasmamembran aufweist, etwa durch Erzeugung einer stabil transfizierten RT4-AC-Cx45eCFP- Linie mit klonaler Auswahl auf eine Ständigkeit des Connexins an der Plasmamembran, könnte man durch erneute transiente Expression des Gorasp2eYFP wiederum Lokalisationsstudien durchführen. Auch sinnvoll wäre die Transfektion in primäre Neuronen in Kultur, um dort die Kolo-kalisation studieren zu können.



**Abb. 5.7 Hypothetischer Mechanismus der Interaktion von Cx45 und Gorasp2** Dargestellt ist der konstitutive sekretorische Weg (links) und der hypothetische Weg der Gorasp2-abhängigen Präsentation des Cx45 Proteins (rechts). Verändert nach Levi et al., 2007

## **5.8 Untersuchungen zur Struktur des Carboxyterminus mit nukleärer Magnetresonanz-Spektroskopie (NMR)**

Im Rahmen der Analyse des Cx45 Carboxyterminus wurden auch Experimente zur Strukturaufklärung des Cx45CT durchgeführt. Hierzu wurde die Technik der nukleären Magnet Resonanz Spektroskopie (NMR) genutzt, die in der Lage ist, die Struktur eines rekombinanten erzeugten und aufgereinigten Peptids bis zu einer Länge von 150 Aminosäuren zu bestimmen.

Die Expression, Aufreinigung und proteolytische Spaltung des Fusionsproteins gelang mit grossem Erfolg (4.3.1, 4.3.2), allerdings wies der Cx45CT in freier, vom GST-Protein abgespaltener Form eine ungewöhnliche Bindung an Oberflächen auf und konnte nur unter Schwierigkeiten aufgereinigt werden. Zum Beispiel ist die unspezifische Bindung an Bestandteile der Aufreinerungsapparatur wie etwa den Schlauch der peristaltischen Pumpen denkbar.

Die Abtrennung der GST-enthaltenden Bestandteile, also des abgespaltenden GST sowie der GST-markierten Protease gelang nicht mit einer klassischen Glutathion-Affinitätssäule, da sich der Verlust des abgespaltenen Cx45CT als zu groß erwies (4.3.3).

Eine weitere Möglichkeit zur Abtrennung der unerwünschten Proteinbestandteile ist die Methode der Gelfiltration, die in der Lage ist, Proteine nach ihrer Größe zu fraktionieren, allerdings erwies sich der Filtrationseffekt als nicht groß genug, um die GST-enthaltenden Proteine abzutrennen (4.3.4)

Da die Trennung nach Größe nach dem Prinzip der Gelfiltration auf der Wanderungsgeschwindigkeit verschieden großer globulärer Proteine beruht, kann der Grund dafür bereits dort zu suchen sein. Das GST Protein ist als globuläres Protein bekannt (Wilce et al., 1995), der Cx45CT hingegen sollte nicht diesem Kriterium entsprechen. So könnte es alleine deswegen zu einer möglicherweise erhöhten Wanderungsgeschwindigkeit des Cx45CT kommen, was die Methode der Gelfiltration für Trennung der beiden Proteine zumindest mit der Superdex75 Säule ungeeignet macht.

Schliesslich gelang die Aufreinigung des Cx45CT über eine Reihe von Probenröhrchen, deren Oberflächen sowie die Oberflächen des Glutathion-Gelbets sämtlichst mit Hilfe von BSA und Fischgelatine abgeblockt wurden (4.3.5). Hiermit konnte eine Reinheit des Peptids von schätzungsweise mehr als 90% erreicht werden, was für eine NMR- Untersuchung mehr als ausreichend ist (JP Dr. R. Stoll, persönliche Mitteilung). Somit wurde die Aufnahme eines ersten Protonenspektrums des Peptids mit einer unmarkierten 1 mg/ ml konzentrierten Probe möglich.

Das auf diese Weise erhaltene  $^1\text{H}$ -Protonenspektrum (4.3.6) sollte erste Hinweise auf eine eventuelle Struktur und zu erwartende Spektrenqualität liefern, für eine weiterführende Strukturanalyse oder gar einer Zuordnung der Resonanzmaximal zu einem einzelnen Nukleus und somit der einzelnen Aminosäurenreste wäre in jedem Fall eine isotopisch markierte Anzucht der Bakterien mit  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid,  $^{13}\text{C}$ -Glukose oder deuteriertem Wasser ( $\text{D}_2\text{O}$ ), notwendig, um die entsprechenden Isotope von den Bakterien metabolisieren zu lassen, so dass der zu produzierende Cx45CT lediglich isotopisch markierte Nuklei mit ungerader Kernzahl enthält, die sich in einem NMR Experiment anregen lassen und so eine Strukturmessung möglich machen.

Die  $^{15}\text{N}$ -markierte Erzeugung des Fusionsproteins gelang zunächst nicht in den benutzen *E.coli* BL21 Bakterien, da eine Induktion der Produktion des Fusionsproteins in Minimalmedium in diesen Bakterien nicht funktionierte (nicht gezeigt). Durch die Retransformation des pGEX-6P-1-Plasmids in den codonoptimierten Stamm ROSETTA pLys konnte dieses Problem gelöst werden (4.3.8). Dieser Bakterienstamm exprimiert zusätzliche Kopien von tRNS Molekülen, die die Produktion von in *mammalia* häufiger vorkommenden Aminosäuren erleichtern und so die rekombinante Expression von Säugerproteinen in Bakterien auch unter Stressbedingungen wie der Anzucht unter minimalen Bedingungen ermöglicht.

Das GST-Fusionsprotein ließ sich auch mit  $^{15}\text{N}$  Amoniumchlorid als einziger Stickstoffquelle produzieren, affinitätsreinigen und spalten. Die unerwünschten GST-Bestandteile liessen sich ebenfalls wie zuvor etabliert entfernen. Da für eine 2D-NMR eine Konzentration von mindestens 1 mM Protein notwendig ist, musste hier auch eine weitere Ankonzentrierung des Peptids durchgeführt werden (4.3.8), was zunächst bei höheren Konzentrationen zu einem Ausfällen führte. Dies konnte durch empirische Tests mittels einer Alkalisierung der Probe auf einen pH über 9 allerdings in weiteren Experimenten unterbunden werden.

Auf diese Weise konnte ein HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)-Spektrum der Amidprotonen des Cx45CT aufgenommen werden (4.3.9). Dieses Spektrum wurde in Zusammenarbeit mit JP Dr. Raphael Stoll ausgewertet und enthält erste Hinweise auf eine geringe Menge strukturierter Bereiche im Carboxyterminus des Cx45 Proteins. Dies ist im Wesentlichen mit der NMR-Analyse des Cx43CT zu vergleichen (Sorgen et al., 2002), bei dem gleichfalls nur einige wenige Aminosäurereste Sekundärstrukturen ausbilden. Laut Spektrum zu erwarten sind Sekundärstrukturen in der Umgebung von 20-40 Aminosäureresten, eine Aussage bezüglich deren Position im Peptid ist allerdings zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht möglich. Sollten die

besagten in Struktur vorliegenden Aminosäureresten an vergleichbarer Position vorkommen, wäre sogar die Existenz einer Coiled-coil Struktur möglich, die in dem Cx45CT mit einer Länge von ca. 35 Aminosäureresten vorhergesagt wird. Eine endgültige Aussage über die An-oder Abwesenheit einer Coiled-coil- Struktur läßt sich allerdings erst nach Zuordnung der Spektrenmaxima zu den einzelnen Amidprotonen machen, was eine isotopische Markierung mit  $^{13}\text{C}$ -Glukose notwendig macht. Offenbar sind hier die beiden C-Termini von Cx43 und Cx45 sehr ähnlich, da beide Peptide in wässriger Lösung weitgehend relaxiert vorliegen.

### **5.9 Untersuchung der Cx45eGFP Expression in der adulten Retina sowie der glatten Muskulatur des Darms der Cx45eGFP-BAC-Maus**

Da gegen Cx45 gerichtete Antikörper zumeist nicht von benötigter Sensitivität in den meisten Geweben sind, wurde mit der Erzeugung einer Maus, die eine zusätzliche eGFP markierte Kopie des Cx45 Proteins auf einem BAC (bacterial artificial chromosome) stabil in das Genom integriert trägt, ein nützliches Werkzeug zur Aufdeckung bislang verborgener Expressionorte etabliert. Im Rahmen der Basischarakterisierung der von Dr. Carsten Euwens und Julia von Maltzahn erzeugten Mauslinie sollte im Rahmen dieser Arbeit die Fluoreszenz des eGFP-Proteins in der Retina sowie im Darm der Maus gezeigt werden.

Erste Analysen der Fluoreszenz des Cx45eGFP Reporterproteins in der adulten Retina der Maus (4.4.2) weisen darauf hin, dass die Lokalisation des Cx45eGFP Proteins den bereits beschriebenen Lokalisationen des mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesenen Cx45 Proteins entsprechen (Dedek et al., 2006). So sind starke Fluoreszenzsignale in der inneren plexiformen Schicht, schwächere auch in der äusseren plexiformen Schicht sowie in der Ganglionzellschicht zu sehen.

Weiterhin überlappen Immunfluoreszenzsignale (4.4.3) die gegen Cx36 gerichteten Antikörpern teilweise mit den eGFP-Fluoreszenzsignalen in einer Kolokalisation, die ebenfalls in dieser Art und Weise bereits von Dedek et al. (2006) als 30%ige Kolokalisation beschrieben wurde. Dies weist darauf hin dass die eGFP Markierung nicht mit der endogenen Lokalisation des Proteins interferiert, und die erzeugten Mauslinien als verlässliches Werkzeug zu Analyse der Lokalisation von Cx45 enthaltenden Gap Junctions angesehen werden können

In der sich entwickelnden Retina der neonatalen Maus (P0) ist das eGFP Fluoreszenzsignal hingegen weiter verteilt (Abb. 4.4.5), so ist die Expression des Reporterproteins in weiten Teilen der Neuroblastenzellschicht zu erkennen, wie gleichfalls bereits von Kihara et al. (2006) beschrieben



wurde. Dieser Befund weist wiederum auf eine von der eGFP Markierung unbeeinflusste Lokalisation des Cx45eGFP Proteins im Verlauf der Organentwicklung im Falle der Retina hin.

Ausserdem konnte das Reporterprotein in der glatten Muskelschicht des Darms der adulten Maus nachgewiesen werden (4.4.1), wo bereits LacZ Reportersignale für die Expression der Cx45 mRNA sprachen (Döring et al. 2007).

Zusammen genommen konnte Cx45eGFP Reporterprotein in allen untersuchten Geweben dort nachgewiesen werden, wo es in der Literatur (Dedek et al., 2006, Kihara et al., 2006, Maxeiner et al., 2003) bereits mit beschrieben ist. Dies gilt sowohl für die zelltypspezifische Expression als auch für den Ort und dem Ausmaß der Koloalisation mit Cx36 Immunsignalen in der adulten Retina.

Somit kann, da das Fusionsreporterprotein in allen Fällen mit der erwarteten, bereits beschriebenen Lokalisation der Cx45 spezifischen Immunsignale übereinstimmt, angenommen werden, dass es auch in den Geweben, wo die Lokalisation des Cx45 noch nicht bekannt ist, zur Aufklärung derselben von grossem Nutzen sein wird. Erste Ergebnisse aus Hirn, Herz und Niere liegen bereits vor (J. v. Maltzahn, persönliche Mitteilung).

Weiterhin wurde die Expression des Reporterproteins der beiden transgenen Linien Linie18 (L18) und Linie43 (L43) in der adulten Retina verglichen (4.4.2, 4.4.3). Southern Blot sowie Immunoblot Analysen (siehe J. v. Maltzahn, Dissertation 2008) wiesen auf eine einfache Integration des Transgens ins Genom in L18 hin, während das Transgen in Linie 43 mehrfach integriert zu sein scheint. Die Lokalisationen der Reporterproteine beider Linien sowie die Koloalisation mit Cx36 immunopositiven Punkten wies keinen offensichtlichen Unterschied auf, die Stärke der Fluoreszenz war in der Linie43 deutlich höher (Abb. 4.32), was vermutlich auf die erwähnte Mehrfachintegration hindeutet. So eröffnet möglicherweise Linie43 aufgrund der starken Fluoreszenz die Gelegenheit, die Lokalisation des Cx45eGFP Proteins in anderen Geweben verlässlich nachzuweisen.

Ogleich die Lokalisation des Cx45eGFP Proteins in den transgenen Mauslinien unverändert zu sein scheint, und die Tiere nicht durch die Expression des Transgens nicht beeinträchtigt zu sein scheinen, kann das Cx45eGFP Protein das Wildtyp-Cx45 Protein nicht funktionell ersetzen (J. v. Maltzahn, persönliche Mitteilung), die Cx45<sup>LacZ/LacZ</sup> Cx45eGFP-BAC-Tiere versterben pränatal. Diese fehlende Redundanz könnte möglicherweise in unterschiedlichen Kanaleigenschaften der entstehenden Gap Junctions, zum anderen in gestörten Interaktionen mit anderen Proteinen oder Problemen beim Proteintransport begründet sein. Durch das Fehlen des endogenen Cx45 Proteins könnte es zu Problemen beim Transport oder bei der Oligomerisierung der Connexine im

endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat kommen (Koval, 2006). Ebenfalls denkbar ist eine fehlerhafte Membrankolokalisation durch eine vermutlich ausbleibende Interaktion mit ZO-1 (Laing et al., 2005)

### **5.10 Ausblick**

In dieser Arbeit gelang der Nachweis der Protein Kinase A (PKA) abhängigen funktionellen Phosphorylierung des Cx36 Proteins in der Mausretina. Aufgedeckt werden konnten ebenfalls die Aminosäurereste des Cx36 Proteins, die von der PKA phosphoryliert werden.

Um die Benutzung dieser durch die (PKA) genutzten Serine auch *in vivo* nachweisen zu können, sind Mausmutanten notwendig, die statt einem der verantwortlichen Serine, möglicherweise auch statt beiden, ebenfalls eine Alaninmutation tragen. Immunpräzipitationsexperimente bzw. Kopplungsexperimente in diesen Retinae würden darüber Aufschluss geben, ob der hier geführte biochemische Ansatz sich auch im Tier als richtig erweist. Möglicherweise lässt sich so ein anderer Phänotyp als nach dem Ausschalten des für Connexin Cx36 codierende Gen (Güldenagel et al. 2001) beobachten, da hier der Kanal, obwohl vorhanden, möglicherweise von PKA oder CaMKII nicht mehr durch Phosphorylierung geschlossen werden kann, was in der Maus zu eventuellen Beeinträchtigungen in der Lernfähigkeit bzw. verstärkter Lichtempfindlichkeit führen könnte. An solchen Mutanten könnte ein Elektoretinogramm über eine Veränderung der Cx36-vermittelten Kopplung in der Retina Aufschluss geben.

Weiterhin könnte das Kopplungsverhalten von Cx45S138A Mutanten bzw. Cx45S261A Mutanten *in vitro* auf Phosphorylierbarkeit durch PKC respektive PKA bzw. in Mikroinjektionsexperimenten auf Veränderung in der Farbstoffkopplung nach Stimulation der jeweiligen Kinasen untersucht werden

Ausserdem konnte in dieser Arbeit die Bindung des Gorasp2 Proteins an den Carboxyterminus des Cx45 Proteins nachgewiesen werden. Diese Bindung des Gorasp2 Proteins an den Carboxyterminus des Cx45 ist möglicherweise von zelltypspezifischer Bedeutung und sollte weiter mit Experimenten auf den Grund gegangen werden. Die starke Kolokalisation in RT4-AC Zellen, nicht aber in humanen HeLaZellen oder den Maus-Neuroblastoma-(N2A) Zellen legt eine zelltypspezifische Interaktion nahe.

Zunächst sollte über Immunpräzipitationsexperimente der Nachweis der Bindung der beiden Proteine in diesen Zellen erbracht werden.

Schliesslich könnte der Versuch unternommen werden, die RT4-AC Zellen stabil mit beiden Konstrukten (pCx45eCFP\_puro und pGorasp2eYFP\_blasto) zu transfizieren und anschliessend zu unterschiedliche Zelltypen des Gehirns zu differenzieren (vgl. Droms et al., 1987). Eventuell können so Unterschiede der Kolokalisation in unterschiedlichen Differenzierungsprotokollen aufgezeigt werden.

Ausserdem sollte der Befund der zelltypspezifischen Bindung in transient transfizierten primären Neuronen nachvollzogen werden. Gorasp2eYFP und Cx45eCFP Kolokalisationen in derart behandelten Neuronen könnten unter dem Laser Scanning Mikroskop untersucht werden, mit der Hoffnung, eine Kolokalisation an der Plasmamembran nachweisen zu können. Ausserdem kann so möglicherweise eine Aussage getroffen werden, ob das Cx45eCFP Protein eher am Zellsoma oder an der Zellfortsätzen (Dentriten, Axonen) lokalisiert ist.

Mit den nun vorhandenen HeLa-Gorasp2eYFP-Zelllinie können ausserdem weitere Studien bezüglich der Biologie des Gorasp2 Proteins durchgeführt werden. Insbesondere die sporadische Lokalisierung des Proteins an der Plasmamembran der Zellen wäre hier von Interesse.

Einer möglichen Interaktion der Creatin Kinase M und des Cx45CT sollte nachgegangen werden. Denkbar wäre hier eine Klonierung einer immunaffinitätsmarkierten Form der Kinase, die ihrerseits in weiteren biochemischen Interaktionsexperimenten eingesetzt werden könnte. Weiterhin könnte mit Hilfe von gegen die Creatin Kinase gerichteten Antikörpern die Bindung mit Hilfe einer Co-Immunpräzipitation aus Herzlysat nachvollzogen werden. Sollte sich eine Bindung bestätigen, wären Kolokalisationsexperimente in Zellkultur von Interesse, ebenso wie Messungen des ATP-Transfers durch möglicherweise mit der Kinase kolokalisierenden Cx45 Kanälen.

Die Strukturanalyse des Carboxyterminus des Cx45 Proteins ist fast abgeschlossen, die Proteindomäne liegt offenbar weitgehend unstrukturiert vor. Um die Frage nach einem Vorhandensein einer Coiled-coil-Struktur vollständig klären zu können, sollte die gut etablierte Präparation des isotopisch markierten Peptids mit dem <sup>13</sup>C-Isotop durchgeführt werden. Aus den daraus resultierenden Daten wird die Zuordnung der Peptidmaxima zu den einzelnen Aminosäurenresten und damit eine dreidimensionale Darstellung des Carboxyterminus möglich sein.

Die basale Analyse der Cx45eGFP-BAC-Maus wurde in Zusammenarbeit mit Julia von Maltzahn weitgehend abgeschlossen und wird in wichtigen Organen, in denen die genaue Lokalisation des Cx45 Proteins noch unbekannt ist (Niere, Gehirn, Blutgefäße) über die Analyse der Fluoreszenz des

Cx45eGFP Proteins weitere Einsicht in die Expression des Cx45 Proteins vermitteln. Ausserdem werden Studien zur Ersetzbarkeit des Cx45 Proteins durch das Cx45eGFP Protein zeigen können, ob der zu beobachtende Phänotyp sich mit dem für Connexin45 defiziente Mäusen beschriebenem deckt, oder ob hier ein unabhängiger Effekt zu vermuten ist.

## **6. Zusammenfassung:**

Das Gap Junction-Protein Connexin45 (Cx45) kann interzelluläre Kanäle ausbilden und wird unter anderem in Gehirn, Herz und Interneuronen der Retina der adulten Maus exprimiert. Sein Fehlen führt zu einer embryonalen Lethalität aufgrund einer pericardialen Effusion, was auf die wichtige Rolle des Proteins in der embryonalen Herzentwicklung der Maus hinweist.

In dieser Doktorarbeit wurde nach Bindeproteinen gesucht, die an die zytoplasmatischen Domänen dieses Connexins binden oder diese posttranslational modifizieren, um so die Bedeutung des Connexins für Signalwege, den intrazellulären Transport sowie der Regulationen der Kanalfunktion zu charakterisieren. Es wurden zunächst mehrere Kandidatenproteine bearbeitet und schließlich das golgiständige Bindeprotein „Gorasp2“ näher untersucht. Dessen Bindung an den Carboxyterminus des Cx45 Proteins konnte sowohl im Hefe-Zwei-Hybrid-System als auch in unterschiedlichen biochemischen Bindeexperimenten nachgewiesen werden. Die Assoziation des Proteins mit Cx45 wurde in verschiedenen Zelllinien getestet. Vorläufige Analysen deuten darauf hin, dass eine Interaktion vorliegen könnte, die zum Transport des Connexins in einigen Zelltypen beiträgt.

Zur Strukturaufklärung des Carboxyterminus des Cx45 und einem besseren sterischen Verständnis möglicher Proteinbindungen wurden Experimente durchgeführt um durch eine NMR (Nuclear Magnetic Resonanz)- Analyse die dreidimensionale Struktur dieser Domäne aufzuklären. Die Messergebnisse an dem <sup>15</sup>N markierten reinen Peptid deuten auf eine weitgehend relaxierte Struktur hin.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die lichtabhängige Phosphorylierung des Connexin36 (Cx36)-Proteins in AII Amakrin Zellen in der Retina der Maus untersucht: Es gelang in Zusammenarbeit mit Dr. Stephanie Urschel (Bonn) und Dr. Timm Schubert (Oldenburg) der Nachweis, dass die Serinreste S110 und S293 der intrazellulären Domänen dieses Proteins abhängig von der intrazellulären Konzentration von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) phosphoryliert werden. Dies führt zu einer Verminderung der Cx36-vermittelten Gap Junction-Kopplung zwischen diesen Zellen und moduliert so die Anpassung der Retina an veränderte Lichtverhältnisse (Urschel et al., 2006).

Zusammen mit Dr. Julia von Maltzahn (Bonn) wurde eine Maus, die das verstärkt grün fluoreszierende Protein (eGFP) als Fusionsprotein mit Cx45 transgen exprimiert, hinsichtlich dessen Lokalisation in der Retina und in glatten Muskelzellen untersucht. Die Fluoreszenzsignale in der Mausretina weisen auf eine Lokalisation des Proteins hin, die der des endogenen Cx45 entspricht, was eine subzelluläre Analyse der Lokalisation in verschiedenen Zelltypen ermöglicht.

## 7. Literaturverzeichnis

- Alcolea,S., Theveniau-Ruissy,M., Jarry-Guichard,T., Marics,I., Tzouanacou,E., Chauvin,J.P., Briand,J.P., Moorman,A.F., Lamers,W.H., and Gros,D.B. (1999). Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circ. Res.* *84*, 1365-1379.
- Alev C.\*, Urschel S.\*, Sonntag S., Zoidl G., **Höher T.**, Fort AG., Wolters D., Matsubara M., Willecke K., Spray DC., Dermietzel R. The neuronal gap junction protein Cx36 interacts with CaMKII: a framework for control of activity-dependent synaptic plasticity; (Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht)
- Allagnat,F., Martin,D., Condorelli,D.F., Waeber,G., and Haefliger,J.A. (2005). Glucose represses connexin36 in insulin-secreting cells. *J. Cell Sci.* *118*, 5335-5344.
- Andres,R.H., Ducray,A.D., Schlattner,U., Wallimann,T., and Widmer,H.R. (2008). Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res. Bull.* *76*, 329-343.
- Arnold,H.H., Lohse,P., Seidel,U., and Bober,E. (1988). A novel human myosin alkali light chain is developmentally regulated. Expression in fetal cardiac and skeletal muscle and in adult atria. *Eur. J. Biochem.* *178*, 53-60.
- Bauer,R., Loer,B., Ostrowski,K., Martini,J., Weimbs,A., Lechner,H., and Hoch,M. (2005). Intercellular communication: the Drosophila innexin multiprotein family of gap junction proteins. *Chem. Biol.* *12*, 515-526.
- Bedner,P., Niessen,H., Odermatt,B., Kretz,M., Willecke,K., and Harz,H. (2006). Selective permeability of different connexin channels to the second messenger cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* *281*, 6673-6681.
- Belluardo,N., Mudo,G., Trovato-Salinaro,A., Le,G.S., Charollais,A., Serre-Beinier,V., Amato,G., Haefliger,J.A., Meda,P., and Condorelli,D.F. (2000). Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain. *Brain Res.* *865*, 121-138.
- Bird,G.C., Lash,L.L., Han,J.S., Zou,X., Willis,W.D., and Neugebauer,V. (2005). Protein kinase A-dependent enhanced NMDA receptor function in pain-related synaptic plasticity in rat amygdala neurones. *J. Physiol* *564*, 907-921.
- Blomstrand,F. and Giaume,C. (2006). Kinetics of endothelin-induced inhibition and glucose permeability of astrocyte gap junctions. *J. Neurosci. Res.* *83*, 996-1003.
- Bloomfield,S.A. and Volgyi,B. (2004). Function and plasticity of homologous coupling between AII amacrine cells. *Vision Res.* *44*, 3297-3306.
- Bloomfield,S.A., Xin,D., and Osborne,T. (1997). Light-induced modulation of coupling between AII amacrine cells in the rabbit retina. *Vis. Neurosci.* *14*, 565-576.
- Brink,P. (2000). Gap junction voltage dependence. A clear picture emerges. *J. Gen. Physiol* *116*, 11-12.
- Bruzzone,R., Hormuzdi,S.G., Barbe,M.T., Herb,A., and Monyer,H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 13644-13649.
- Bruzzone,R. and Ressot,C. (1997). Connexins, gap junctions and cell-cell signalling in the nervous system. *Eur. J. Neurosci.* *9*, 1-6.
- Bukauskas,F.F., Kreuzberg,M.M., Rackauskas,M., Bukauskiene,A., Bennett,M.V., Verselis,V.K., and Willecke,K. (2006). Properties of mouse connexin 30.2 and human connexin 31.9 hemichannels: implications for atrioventricular conduction in the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 9726-9731.
- Butkevich,E., Hulsmann,S., Wenzel,D., Shirao,T., Duden,R., and Majoul,I. (2004). Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr. Biol.* *14*, 650-658.

- Butterweck,A., Gergs,U., Elfgang,C., Willecke,K., and Traub,O. (1994). Immunochemical characterization of the gap junction protein connexin45 in mouse kidney and transfected human HeLa cells. *J. Membr. Biol.* *141*, 247-256.
- Cachope,R., Mackie,K., Triller,A., O'Brien,J., and Pereda,A.E. (2007). Potentiation of electrical and chemical synaptic transmission mediated by endocannabinoids. *Neuron* *56*, 1034-1047.
- Cavanagh J., Fairbrother W.J, Palmer III, A.G., Skelton N.J., *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice* (1995) Academic Press
- Chang,Q., Gonzalez,M., Pinter,M.J., and Balice-Gordon,R.J. (1999). Gap junctional coupling and patterns of connexin expression among neonatal rat lumbar spinal motor neurons. *J. Neurosci.* *19*, 10813-10828.
- Chen,Q., Lin,R.Y., and Rubin,C.S. (1997). Organelle-specific targeting of protein kinase AII (PKAII). Molecular and in situ characterization of murine A kinase anchor proteins that recruit regulatory subunits of PKAII to the cytoplasmic surface of mitochondria. *J. Biol. Chem.* *272*, 15247-15257.
- Condorelli,D.F., Parenti,R., Spinella,F., Trovato,S.A., Belluardo,N., Cardile,V., and Cicirata,F. (1998). Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 1202-1208.
- Cooper,C.D. and Lampe,P.D. (2002). Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. *J. Biol. Chem.* *277*, 44962-44968.
- Dedek,K., Schultz,K., Pieper,M., Dirks,P., Maxeiner,S., Willecke,K., Weiler,R., and Janssen-Bienhold,U. (2006). Localization of heterotypic gap junctions composed of connexin45 and connexin36 in the rod pathway of the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.* *24*, 1675-1686.
- Degen,J., Meier,C., Van Der Giessen,R.S., Sohl,G., Petrasch-Parwez,E., Urschel,S., Dermietzel,R., Schilling,K., De Zeeuw,C.I., and Willecke,K. (2004). Expression pattern of lacZ reporter gene representing connexin36 in transgenic mice. *J. Comp Neurol.* *473*, 511-525.
- DeRosa,A.M., Xia,C.H., Gong,X., and White,T.W. (2007). The cataract-inducing S50P mutation in Cx50 dominantly alters the channel gating of wild-type lens connexins. *J. Cell Sci.* *120*, 4107-4116.
- Döring,B., Pfitzer,G., Adam,B., Liebrechts,T., Eckardt,D., Holtmann,G., Hofmann,F., Feil,S., Feil,R., and Willecke,K. (2007). Ablation of connexin43 in smooth muscle cells of the mouse intestine: functional insights into physiology and morphology. *Cell Tissue Res.* *327*, 333-342.
- Döring,B., Shynlova,O., Tsui,P., Eckardt,D., Janssen-Bienhold,U., Hofmann,F., Feil,S., Feil,R., Lye,S.J., and Willecke,K. (2006). Ablation of connexin43 in uterine smooth muscle cells of the mouse causes delayed parturition. *J. Cell Sci.* *119*, 1715-1722.
- Droms,K. and Sueoka,N. (1987). Cell-type-specific responses of RT4 neural cell lines to dibutyryl-cAMP: branch determination versus maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *84*, 1309-1313.
- Elfgang,C., Eckert,R., Lichtenberg-Frate,H., Butterweck,A., Traub,O., Klein,R.A., Hulser,D.F., and Willecke,K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* *129*, 805-817.
- Fanning,A.S., Jameson,B.J., Jesaitis,L.A., and Anderson,J.M. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* *273*, 29745-29753.
- Feigenspan,A., Janssen-Bienhold,U., Hormuzdi,S., Monyer,H., Degen,J., Sohl,G., Willecke,K., Ammermuller,J., and Weiler,R. (2004). Expression of connexin36 in cone pedicles and OFF-cone bipolar cells of the mouse retina. *J. Neurosci.* *24*, 3325-3334.
- Feigenspan,A., Teubner,B., Willecke,K., and Weiler,R. (2001). Expression of neuronal connexin36 in AII amacrine

cells of the mammalian retina. *J. Neurosci.* *21*, 230-239.

Feinstein, T.N. and Linstedt, A.D. (2007). Mitogen-activated protein kinase kinase 1-dependent Golgi unlinking occurs in G2 phase and promotes the G2/M cell cycle transition. *Mol. Biol. Cell* *18*, 594-604.

Fischer, F., Wolters, D., Rogner, M., and Poetsch, A. (2006). Toward the complete membrane proteome: high coverage of integral membrane proteins through transmembrane peptide detection. *Mol. Cell Proteomics.* *5*, 444-453.

Foote, C.I., Zhou, L., Zhu, X., and Nicholson, B.J. (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.

Fujimoto, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Kuraoka, A., Ohokuma, A., and Shibata, Y. (1997). Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *J. Cell Sci.* *110 (Pt 3)*, 311-322.

Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J. Cell Biol.* *127*, 1617-1626.

Gellhaus, A., Dong, X., Propson, S., Maass, K., Klein-Hitpass, L., Kibschull, M., Traub, O., Willecke, K., Perbal, B., Lye, S.J., and Winterhager, E. (2004). Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 36931-36942.

Ghoshroy, S., Goodenough, D.A., and Sosinsky, G.E. (1995). Preparation, characterization, and structure of half gap junctional layers split with urea and EGTA. *J. Membr. Biol.* *146*, 15-28.

Giepmans, B.N. (2006). Role of connexin43-interacting proteins at gap junctions. *Adv. Cardiol.* *42*, 41-56.

Giepmans, B.N. and Moolenaar, W.H. (1998). The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr. Biol.* *8*, 931-934.

Giepmans, B.N., Verlaan, I., Hengeveld, T., Janssen, H., Calafat, J., Falk, M.M., and Moolenaar, W.H. (2001). Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr. Biol.* *11*, 1364-1368.

Gilula, N.B. (1987). Topology of gap junction protein and channel function. *Ciba Found. Symp.* *125*, 128-139.

Goldberg, G.S., Valiunas, V., and Brink, P.R. (2004). Selective permeability of gap junction channels. *Biochim. Biophys. Acta* *1662*, 96-101.

Goodenough, D.A. (1976). In vitro formation of gap junction vesicles. *J. Cell Biol.* *68*, 220-231.

Gregan, B., Jurgensen, J., Papsdorf, G., Furkert, J., Schaefer, M., Beyermann, M., Rosenthal, W., and Oksche, A. (2004). Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J. Biol. Chem.* *279*, 27679-27687.

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

Gros DB, Alcoléa S, Dupays L, Meysen S, Théveniau-Ruissy M, Teunissen BEJ,

Bierhuizen MFA (2005). Connexins in Cardiac Development: Expression, Role, and Transcriptional Control. In: *Gap Junctions in Development and Disease*, Winterhager E (ed). Springer, pp. 29-56.

Gudotti, A., Forchetti, C.M., Corda, M.G., Konkel, D., Bennett, C.D., and Costa, E. (1983). Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *80*, 3531-3535.

Guldenagel, M., Ammermuller, J., Feigenspan, A., Teubner, B., Degen, J., Sohl, G., Willecke, K., and Weiler, R. (2001).



- Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin36. *J. Neurosci.* *21*, 6036-6044.
- Guldenagel,M., Sohl,G., Plum,A., Traub,O., Teubner,B., Weiler,R., and Willecke,K. (2000). Expression patterns of connexin genes in mouse retina. *J. Comp Neurol.* *425*, 193-201.
- Haftek,M., Kowalewski,C., Mesnil,M., Blaszczyk,M., and Schmitt,D. (1999). Internalization of gap junctions in benign familial pemphigus (Hailey-Hailey disease) and keratosis follicularis (Darier's disease). *Br. J. Dermatol.* *141*, 224-230.
- Hampson,E.C., Vaney,D.I., and Weiler,R. (1992). Dopaminergic modulation of gap junction permeability between amacrine cells in mammalian retina. *J. Neurosci.* *12*, 4911-4922.
- Harris,A.L. (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *94*, 120-143.
- Hertlein,B., Butterweck,A., Haubrich,S., Willecke,K., and Traub,O. (1998). Phosphorylated carboxy terminal serine residues stabilize the mouse gap junction protein connexin45 against degradation. *J. Membr. Biol.* *162*, 247-257.
- Higuchi R, Krummel B, Saiki R (1988). "A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions". *Nucleic Acids Res* **16** (15): 7351–67
- Hirst-Jensen,B.J., Sahoo,P., Kieken,F., Delmar,M., and Sorgen,P.L. (2007). Characterization of the pH-dependent interaction between the gap junction protein connexin43 carboxyl terminus and cytoplasmic loop domains. *J. Biol. Chem.* *282*, 5801-5813.
- Hruska-Hageman,A.M., Benson,C.J., Leonard,A.S., Price,M.P., and Welsh,M.J. (2004). PSD-95 and Lin-7b interact with acid-sensing ion channel-3 and have opposite effects on H<sup>+</sup>- gated current. *J. Biol. Chem.* *279*, 46962-46968.
- Jeon,C.J., Strettoi,E., and Masland,R.H. (1998). The major cell populations of the mouse retina. *J. Neurosci.* *18*, 8936-8946.
- Jesch,S.A., Lewis,T.S., Ahn,N.G., and Linstedt,A.D. (2001). Mitotic phosphorylation of Golgi reassembly stacking protein 55 by mitogen-activated protein kinase ERK2. *Mol. Biol. Cell* *12*, 1811-1817.
- Jiang,J.X. and Cherian,P.P. (2003). Hemichannels formed by connexin 43 play an important role in the release of prostaglandin E(2) by osteocytes in response to mechanical strain. *Cell Commun. Adhes.* *10*, 259-264.
- Jones,H.W., Jr., McKusick,V.A., Harper,P.S., and Wu,K.D. (1971). George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet. Gynecol.* *38*, 945-949.
- Jones,S.B., Lanford,G.W., Chen,Y.H., Morabito,M., Kim,K., and Lu,Q. (2002). Glutamate-induced delta-catenin redistribution and dissociation from postsynaptic receptor complexes. *Neuroscience* *115*, 1009-1021.
- Kandler,K. (1997). Coordination of neuronal activity by gap junctions in the developing neocortex. *Semin. Cell Dev. Biol.* *8*, 43-51.
- Kanemitsu,M.Y., Loo,L.W., Simon,S., Lau,A.F., and Eckhart,W. (1997). Tyrosine phosphorylation of connexin 43 by v-Src is mediated by SH2 and SH3 domain interactions. *J. Biol. Chem.* *272*, 22824-22831.
- Kang,J., Kang,N., Lovatt,D., Torres,A., Zhao,Z., Lin,J., and Nedergaard,M. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J. Neurosci.* *28*, 4702-4711.
- Kidder,G.M. and Winterhager,E. (2001). Intercellular communication in preimplantation development: the role of gap junctions. *Front Biosci.* *6*, D731-D736.
- Kihara,A.H., Mantovani de,C.L., Belmonte,M.A., Yan,C.Y., Moriscot,A.S., and Hamassaki,D.E. (2006). Expression of connexins 36, 43, and 45 during postnatal development of the mouse retina. *J. Neurobiol.* *66*, 1397-1410.

- King, T.J. and Lampe, P.D. (2005). Temporal regulation of connexin phosphorylation in embryonic and adult tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1719, 24-35.
- Kinseth, M.A., Anjard, C., Fuller, D., Guizzunti, G., Loomis, W.F., and Malhotra, V. (2007). The Golgi-associated protein GRASP is required for unconventional protein secretion during development. *Cell* 130, 524-534.
- Kojima, T., Sawada, N., Chiba, H., Kokai, Y., Yamamoto, M., Urban, M., Lee, G.H., Hertzberg, E.L., Mochizuki, Y., and Spray, D.C. (1999). Induction of tight junctions in human connexin 32 (hCx32)-transfected mouse hepatocytes: connexin 32 interacts with occludin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 222-229.
- Koval, M. (2006). Pathways and control of connexin oligomerization. *Trends Cell Biol.* 16, 159-166.
- Kreuzberg, M.M., Willecke, K., and Bukauskas, F.F. (2006). Connexin-mediated cardiac impulse propagation: connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart. *Trends Cardiovasc. Med.* 16, 266-272.
- Kruger, O., Plum, A., Kim, J.S., Winterhager, E., Maxeiner, S., Hallas, G., Kirchhoff, S., Traub, O., Lamers, W.H., and Willecke, K. (2000). Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 127, 4179-4193.
- Kulartz, M. and Knippers, R. (2004). The replicative regulator protein geminin on chromatin in the HeLa cell cycle. *J. Biol. Chem.* 279, 41686-41694.
- Kulartz, M. :Untersuchung der Regulationsproteine Geminin und Cdt1 in menschlichen Zellen, Doktorarbeit, Konstanz 2004
- Kumai, M., Nishii, K., Nakamura, K., Takeda, N., Suzuki, M., and Shibata, Y. (2000). Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development* 127, 3501-3512.
- Kumar, N.M. and Gilula, N.B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381-388.
- Kuo, A., Zhong, C., Lane, W.S., and Derynck, R. (2000). Transmembrane transforming growth factor- $\alpha$  tethers to the PDZ domain-containing, Golgi membrane-associated protein p59/GRASP55. *EMBO J.* 19, 6427-6439.
- Laemmli, U.K., Molbert, E., Showe, M., and Kellenberger, E. (1970). Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 49, 99-113.
- Laing, J.G. and Beyer, E.C. (1995). The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 270, 26399-26403.
- Laing, J.G., Manley-Markowski, R.N., Koval, M., Civitelli, R., and Steinberg, T.H. (2001). Connexin45 interacts with zonula occludens-1 and connexin43 in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 276, 23051-23055.
- Laird, D.W. (1996). The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 311-318.
- Laird, D.W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* 394, 527-543.
- Lampe, P.D. and Lau, A.F. (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1171-1186.
- Lampe, P.D., TenBroek, E.M., Burt, J.M., Kurata, W.E., Johnson, R.G., and Lau, A.F. (2000). Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J. Cell Biol.* 149, 1503-1512.
- Lan, Z., Kurata, W.E., Martyn, K.D., Jin, C., and Lau, A.F. (2005). Novel rab GAP-like protein, CIP85, interacts with connexin43 and induces its degradation. *Biochemistry* 44, 2385-2396.
- Leithe, E., Cruciani, V., Sanner, T., Mikalsen, S.O., and Rivedal, E. (2003). Recovery of gap junctional intercellular

- communication after phorbol ester treatment requires proteasomal degradation of protein kinase C. *Carcinogenesis* 24, 1239-1245.
- Leithe,E. and Rivedal,E. (2007). Ubiquitination of gap junction proteins. *J. Membr. Biol.* 217, 43-51.
- Levi,S.K. and Glick,B.S. (2007). GRASping unconventional secretion. *Cell* 130, 407-409.
- Li,X., Olson,C., Lu,S., Kamasawa,N., Yasumura,T., Rash,J.E., and Nagy,J.I. (2004). Neuronal connexin36 association with zonula occludens-1 protein (ZO-1) in mouse brain and interaction with the first PDZ domain of ZO-1. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2132-2146.
- Lottspeich und Zorbas, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag (1998)
- Luke,M.R., Kjer-Nielsen,L., Brown,D.L., Stow,J.L., and Gleeson,P.A. (2003). GRIP domain-mediated targeting of two new coiled-coil proteins, GCC88 and GCC185, to subcompartments of the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* 278, 4216-4226.
- Lygate,C.A., Fischer,A., Sebag-Montefiore,L., Wallis,J., ten,H.M., and Neubauer,S. (2007). The creatine kinase energy transport system in the failing mouse heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* 42, 1129-1136.
- MacCoss,M.J., McDonald,W.H., Saraf,A., Sadygov,R., Clark,J.M., Tasto,J.J., Gould,K.L., Wolters,D., Washburn,M., Weiss,A., Clark,J.I., and Yates,J.R., III (2002). Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 7900-7905.
- Magin,T.M., McEwan,C., Milne,M., Pow,A.M., Selfridge,J., and Melton,D.W. (1992). A position- and orientation-dependent element in the first intron is required for expression of the mouse hprt gene in embryonic stem cells. *Gene* 122, 289-296.
- Mahajan,V.B., Pai,K.S., Lau,A., and Cunningham,D.D. (2000). Creatine kinase, an ATP-generating enzyme, is required for thrombin receptor signaling to the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 12062-12067.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning. A Laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Marasciulo,F.L., Montagnani,M., and Potenza,M.A. (2006). Endothelin-1: the yin and yang on vascular function. *Curr. Med. Chem.* 13, 1655-1665.
- Masland,R.H. (2001). The fundamental plan of the retina. *Nat. Neurosci.* 4, 877-886.
- Mathews,R.A., Johnson,T.C., and Hudson,J.E. (1976). Synthesis and turnover of plasma-membrane proteins and glycoproteins in a neuroblastoma cell line. *Biochem. J.* 154, 57-64.
- Maxeiner,S., Dedek,K., Janssen-Bienhold,U., Ammermuller,J., Brune,H., Kirsch,T., Pieper,M., Degen,J., Kruger,O., Willecke,K., and 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, 566-576.
- Maxeiner,S., Kruger,O., Schilling,K., Traub,O., Urschel,S., and Willecke,K. (2003). Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience* 119, 689-700.
- Morley,G.E., Ek-Vitorin,J.F., Taffet,S.M., and Delmar,M. (1997). Structure of connexin43 and its regulation by pHi. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 8, 939-951.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-50.

- Neijssen,J., Herberts,C., Drijfhout,J.W., Reits,E., Janssen,L., and Neefjes,J. (2005). Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 434, 83-88.
- Olsen,O., Wade,J.B., Morin,N., Bredt,D.S., and Welling,P.A. (2005). Differential localization of mammalian Lin-7 (MALS/Veli) PDZ proteins in the kidney. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 288, F345-F352.
- Patel,L.S., Mitchell,C.K., Dubinsky,W.P., and O'Brien,J. (2006). Regulation of gap junction coupling through the neuronal connexin Cx35 by nitric oxide and cGMP. *Cell Commun. Adhes.* 13, 41-54.
- Patel,R. and Kos,L. (2005). Endothelin-1 and Neuregulin-1 convert embryonic cardiomyocytes into cells of the conduction system in the mouse. *Dev. Dyn.* 233, 20-28.
- Pellecchia,M., Sem,D.S., and Wuthrich,K. (2002). NMR in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 211-219.
- Pereda,A., O'Brien,J., Nagy,J.I., Smith,M., Bukauskas,F., Davidson,K.G., Kamasawa,N., Yasumura,T., and Rash,J.E. (2003). Short-range functional interaction between connexin35 and neighboring chemical synapses. *Cell Commun. Adhes.* 10, 419-423.
- Phelan,P. (2005). Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1711, 225-245.
- Poulos,T.L. and Raag,R. (1992). Cytochrome P450cam: crystallography, oxygen activation, and electron transfer. *FASEB J.* 6, 674-679.
- Preisinger,C., Korner,R., Wind,M., Lehmann,W.D., Kopajtich,R., and Barr,F.A. (2005). Plk1 docking to GRASP65 phosphorylated by Cdk1 suggests a mechanism for Golgi checkpoint signalling. *EMBO J.* 24, 753-765.
- Qin,H., Shao,Q., Igdoura,S.A., aoui-Jamali,M.A., and Laird,D.W. (2003). Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of Cx43 in gap junctional intercellular communication-deficient and -competent breast tumor cells. *J. Biol. Chem.* 278, 30005-30014.
- Rahman,S. and Evans,W.H. (1991). Topography of connexin32 in rat liver gap junctions. Evidence for an intramolecular disulphide linkage connecting the two extracellular peptide loops. *J. Cell Sci.* 100 ( Pt 3), 567-578.
- Reisner,Y., Meiry,G., Zeevi-Levin,N., Barac,D.Y., Reiter,I., Abassi,Z., Ziv,N., Kostin,S., Shaper,J., Rosen,M.R., and Binah,O. (2008). Impulse conduction and gap junctional remodeling by endothelin-1 in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J. Cell Mol. Med.*
- Reuss,B., Hellmann,P., Traub,O., Butterweck,A., and Winterhager,E. (1997). Expression of connexin31 and connexin43 genes in early rat embryos. *Dev. Genet.* 21, 82-90.
- Revel,J.P. and Karnovsky,M.J. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* 33, C7-C12.
- Rieske,E., Schubert,P., and Kreutzberg,G.W. (1975). Transfer of radioactive material between electrically coupled neurons of the leech central nervous system. *Brain Res.* 84, 365-382.
- Roosild,T.P., Greenwald,J., Vega,M., Castronovo,S., Riek,R., and Choe,S. (2005). NMR structure of Mistic, a membrane-integrating protein for membrane protein expression. *Science* 307, 1317-1321.
- Rose,B. and Loewenstein,W.R. (1975). Calcium ion distribution in cytoplasm visualised by aequorin: diffusion in cytosol restricted by energized sequestering. *Science* 190, 1204-1206.
- Saez,J.C., Berthoud,V.M., Branes,M.C., Martinez,A.D., and Beyer,E.C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.* 83, 1359-1400.

- Saha,T., Vardhini,D., Tang,Y., Katuri,V., Jogunoori,W., Volpe,E.A., Haines,D., Sidawy,A., Zhou,X., Gallicano,I., Schlegel,R., Mishra,B., and Mishra,L. (2006). RING finger-dependent ubiquitination by PRAJA is dependent on TGF-beta and potentially defines the functional status of the tumor suppressor ELF. *Oncogene* 25, 693-705.
- Sambrook J., Fritsch, E. F., Maniatis, M. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: CSH Press.
- Sato,S., Tomomori-Sato,C., Parmely,T.J., Florens,L., Zybaylov,B., Swanson,S.K., Banks,C.A., Jin,J., Cai,Y., Washburn,M.P., Conaway,J.W., and Conaway,R.C. (2004). A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Mol. Cell* 14, 685-691.
- Schubert,A.L., Schubert,W., Spray,D.C., and Lisanti,M.P. (2002). Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry* 41, 5754-5764.
- Schwalbe,H. (2003). Kurt Wuthrich, the ETH Zurich, and the development of NMR spectroscopy for the investigation of structure, dynamics, and folding of proteins. *ChemBiochem*. 4, 135-142.
- Serre-Beinier,V., Le,G.S., Belluardo,N., Trovato-Salinaro,A., Charollais,A., Haefliger,J.A., Condorelli,D.F., and Meda,P. (2000). Cx36 preferentially connects beta-cells within pancreatic islets. *Diabetes* 49, 727-734.
- Shimizu,T., Ihara,K., Maesaki,R., Amano,M., Kaibuchi,K., and Hakoshima,T. (2003). Parallel coiled-coil association of the RhoA-binding domain in Rho-kinase. *J. Biol. Chem.* 278, 46046-46051.
- Short,B., Preisinger,C., Korner,R., Kopajtich,R., Byron,O., and Barr,F.A. (2001). A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic. *J. Cell Biol.* 155, 877-883.
- Shorter,J., Watson,R., Giannakou,M.E., Clarke,M., Warren,G., and Barr,F.A. (1999). GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system. *EMBO J.* 18, 4949-4960.
- Simpson,I., Rose,B., and Loewenstein,W.R. (1977). Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science* 195, 294-296.
- Sitaramayya,A., Crabb,J.W., Matesic,D.F., Margulis,A., Singh,V., Pulukuri,S., and Dang,L. (2003). Connexin 36 in bovine retina: lack of phosphorylation but evidence for association with phosphorylated proteins. *Vis. Neurosci.* 20, 385-395.
- Skerrett,I.M., Aronowitz,J., Shin,J.H., Cymes,G., Kasperek,E., Cao,F.L., and Nicholson,B.J. (2002). Identification of amino acid residues lining the pore of a gap junction channel. *J. Cell Biol.* 159, 349-360.
- Söhl,G., Maxeiner,S., and Willecke,K. (2005). Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 191-200.
- Söhl,G. and Willecke,K. (2003). An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun. Adhes.* 10, 173-180.
- Söhl,G. and Willecke,K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* 62, 228-232.
- Solan,J.L. and Lampe,P.D. (2007). Key connexin 43 phosphorylation events regulate the gap junction life cycle. *J. Membr. Biol.* 217, 35-41.
- Sorgen,P.L., Duffy,H.S., Cahill,S.M., Coombs,W., Spray,D.C., Delmar,M., and Girvin,M.E. (2002). Sequence-specific resonance assignment of the carboxyl terminal domain of Connexin43. *J. Biomol. NMR* 23, 245-246.
- Sorgen,P.L., Duffy,H.S., Sahoo,P., Coombs,W., Delmar,M., and Spray,D.C. (2004). Structural changes in the carboxyl terminus of the gap junction protein connexin43 indicates signaling between binding domains for c-Src and zonula

occludens-1. *J. Biol. Chem.* 279, 54695-54701.

Spinella,F., Rosano,L., Di,C., V, Nicotra,M.R., Natali,P.G., and Bagnato,A. (2003). Endothelin-1 decreases gap junctional intercellular communication by inducing phosphorylation of connexin 43 in human ovarian carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 278, 41294-41301.

Steinberg,T.H., Civitelli,R., Geist,S.T., Robertson,A.J., Hick,E., Veenstra,R.D., Wang,H.Z., Warlow,P.M., Westphale,E.M., Laing,J.G., and . (1994). Connexin43 and connexin45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *EMBO J.* 13, 744-750.

Stevenson,B.R., Siliciano,J.D., Mooseker,M.S., and Goodenough,D.A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* 103, 755-766.

Strauss,O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 85, 845-881.

Sudo,K., Ito,H., Iwamoto,I., Morishita,R., Asano,T., and Nagata,K. (2006). Identification of a cell polarity-related protein, Lin-7B, as a binding partner for a Rho effector, Rhotekin, and their possible interaction in neurons. *Neurosci. Res.* 56, 347-355.

Teubner,B., Degen,J., Sohl,G., Guldenagel,M., Bukauskas,F.F., Trexler,E.B., Verselis,V.K., De Zeeuw,C.I., Lee,C.G., Kozak,C.A., Petrasch-Parwez,E., Dermietzel,R., and 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.

Thalmann,R., Henzl,M.T., Killick,R., Ignatova,E.G., and Thalmann,I. (2003). Toward an understanding of cochlear homeostasis: the impact of location and the role of OCP1 and OCP2. *Acta Otolaryngol.* 123, 203-208.

Thomas,M.A., Zosso,N., Scerri,I., Demaurex,N., Chanson,M., and Staub,O. (2003). A tyrosine-based sorting signal is involved in connexin43 stability and gap junction turnover. *J. Cell Sci.* 116, 2213-2222.

Toyofuku,T., Akamatsu,Y., Zhang,H., Kuzuya,T., Tada,M., and Hori,M. (2001). c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 1780-1788.

Urschel,S., Hoher,T., Schubert,T., Alev,C., Sohl,G., Worsdorfer,P., Asahara,T., Dermietzel,R., Weiler,R., and Willecke,K. (2006). Protein kinase A-mediated phosphorylation of connexin36 in mouse retina results in decreased gap junctional communication between AII amacrine cells. *J. Biol. Chem.* 281, 33163-33171.

Schlüter, S, Identifizierung von Proteinen, die an der carboxyterminalen Domäne des Maus-Connexin45 binden , Diplomarbeit Bonn, 2003

Van Der Giessen,R.S., Koekkoek,S.K., van,D.S., De,G., Jr., Cupido,A., Khosrovani,S., Dortland,B., Wellershaus,K., Degen,J., Deuchars,J., Fuchs,E.C., Monyer,H., Willecke,K., De Jeu,M.T., and De Zeeuw,C.I. (2008). Role of olivary electrical coupling in cerebellar motor learning. *Neuron* 58, 599-612.

van Rijen,H.V., van Veen,T.A., van Kempen,M.J., Wilms-Schopman,F.J., Potse,M., Krueger,O., Willecke,K., Opthof,T., Jongasma,H.J., and de Bakker,J.M. (2001). Impaired conduction in the bundle branches of mouse hearts lacking the gap junction protein connexin40. *Circulation* 103, 1591-1598.

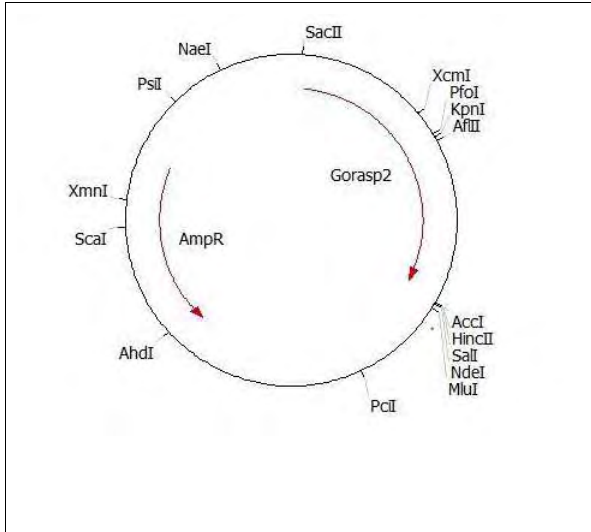
Vaughan,D.K. and Lasater,E.M. (1992). Acid phosphatase localization in endocytosed horizontal cell gap junctions. *Vis. Neurosci.* 8, 77-81.

Wagner,C. (2008). Function of connexins in the renal circulation. *Kidney Int.* 73, 547-555.

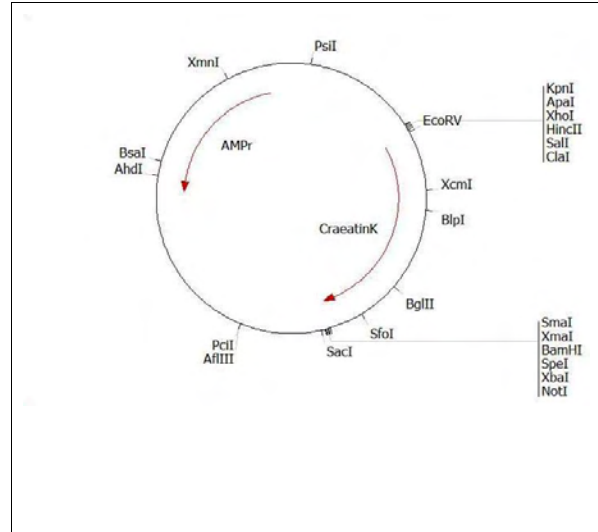
Wagner,L.M., Saleh,S.M., Boyle,D.J., and Takemoto,D.J. (2002). Effect of protein kinase Cgamma on gap junction disassembly in lens epithelial cells and retinal cells in culture. *Mol. Vis.* 8, 59-66.

- Washburn, M.P., Wolters, D., and Yates, J.R., III (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* *19*, 242-247.
- Webb, R.J., Tinworth, L., Thomas, G.M., Zaccolo, M., and Carroll, J. (2008). Developmentally acquired PKA localisation in mouse oocytes and embryos. *Dev. Biol.* *317*, 36-45.
- White, T.W., Bruzzone, R., Wolfram, S., Paul, D.L., and Goodenough, D.A. (1994). Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J. Cell Biol.* *125*, 879-892.
- Wilce, M.C., Board, P.G., Feil, S.C., and Parker, M.W. (1995). Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. *EMBO J.* *14*, 2133-2143.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U., and Sohl, G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* *383*, 725-737.
- Witkovsky, P. (2004). Dopamine and retinal function. *Doc. Ophthalmol.* *108*, 17-40.
- Wolters, D.A., Washburn, M.P., and Yates, J.R., III (2001). An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.* *73*, 5683-5690.
- Worsdorfer, P., Maxeiner, S., Markopoulos, C., Kirfel, G., Wulf, V., Auth, T., Urschel, S., von, M.J., and Willecke, K. (2008). Connexin expression and functional analysis of gap junctional communication in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* *26*, 431-439.
- Wuthrich, K. (1990). Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* *265*, 22059-22062.
- Xia, X.B. and Mills, S.L. (2004). Gap junctional regulatory mechanisms in the AII amacrine cell of the rabbit retina. *Vis. Neurosci.* *21*, 791-805.
- Yeager, M. and Nicholson, B.J. (1996). Structure of gap junction intercellular channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *6*, 183-192.
- Zhang, C. and Restrepo, D. (2003). Heterogeneous expression of connexin 36 in the olfactory epithelium and glomerular layer of the olfactory bulb. *J. Comp Neurol.* *459*, 426-439.
- Zoidl, G., Meier, C., Petrasch-Parwez, E., Zoidl, C., Habbes, H.W., Kremer, M., Srinivas, M., Spray, D.C., and Dermietzel, R. (2002). Evidence for a role of the N-terminal domain in subcellular localization of the neuronal connexin36 (Cx36). *J. Neurosci. Res.* *69*, 448-465.

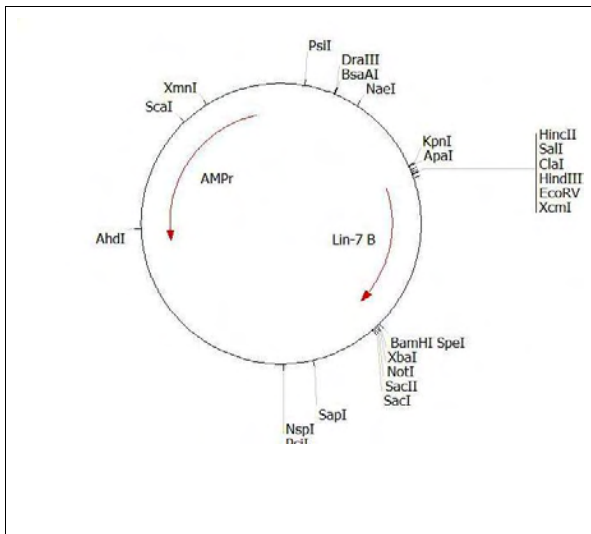
## Anhang A: Erzeugte Plasmide:



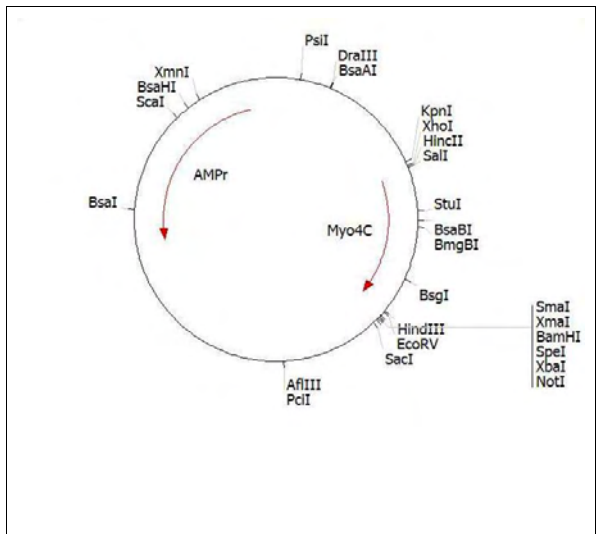
pBlueGorasp2: Erzeugt durch Ligation eines *BglII/XhoI* gespaltenen die codierende Region des Gorasp2 Proteins enthaltenden cDNS Fragmentes in den *BglII/XhoI* gespaltenen Vektor pBluecriptII S/K



pBlueCrkM: Erzeugt durch Ligation eines *EcoRI* gespaltenen die codierende Region des CretatinKinase M Proteins enthaltenden cDNS Fragmentes in den *EcoRI* gespaltenen Vektor pBluecriptII S/K

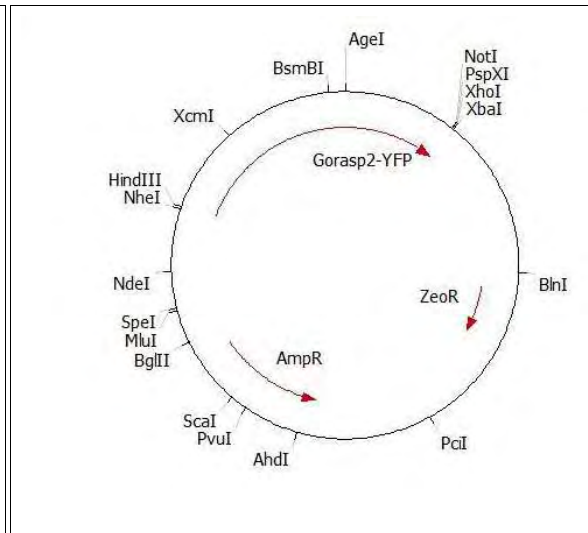
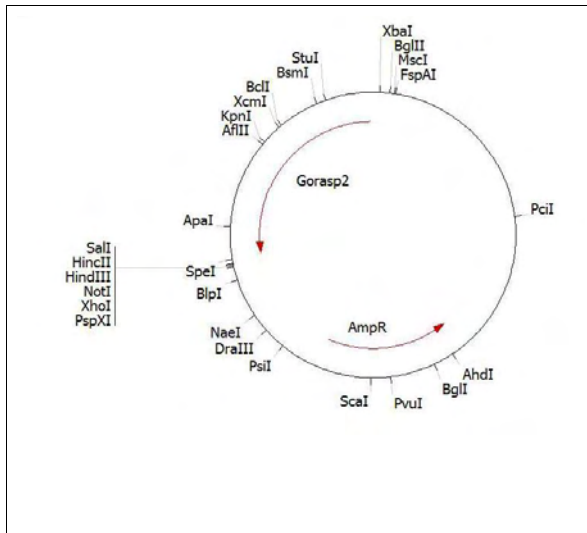


pBlueLin7b: Erzeugt durch Ligation eines *EcoRI* gespaltenen die codierende Region des Lin7b Proteins enthaltenden cDNS Fragmentes in den *EcoRI* gespaltenen Vektor pBluecriptII S/K



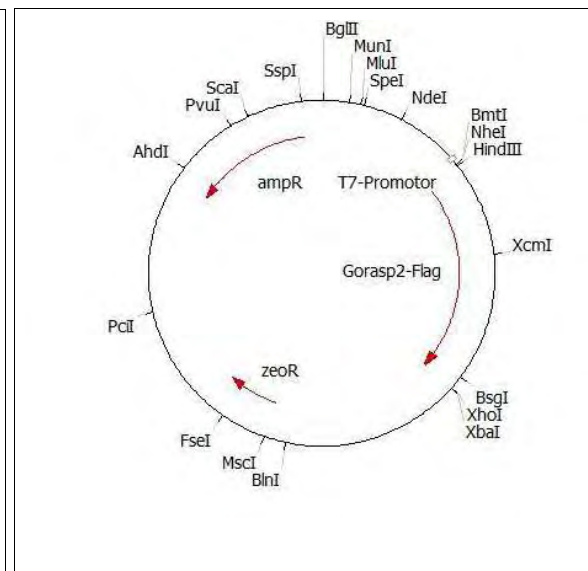
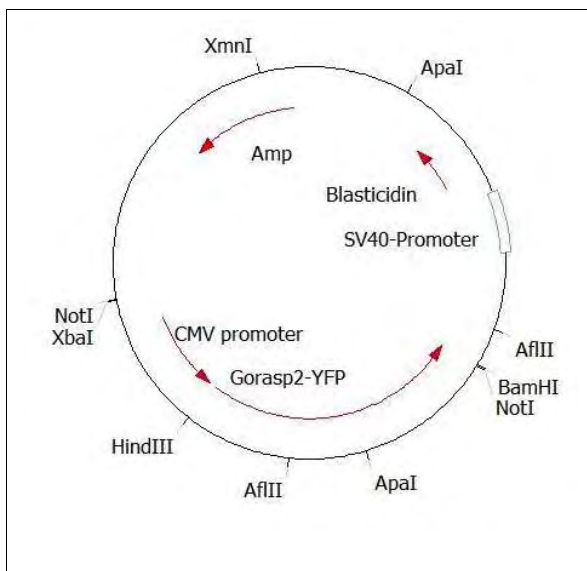
pBlueMyoL4: Erzeugt durch Ligation eines *Clal* gespaltenen die codierende Region des CretatinKinase M Proteins enthaltenden cDNS Fragmentes in den *Clal* gespaltenen Vektor pBluecriptII S/K





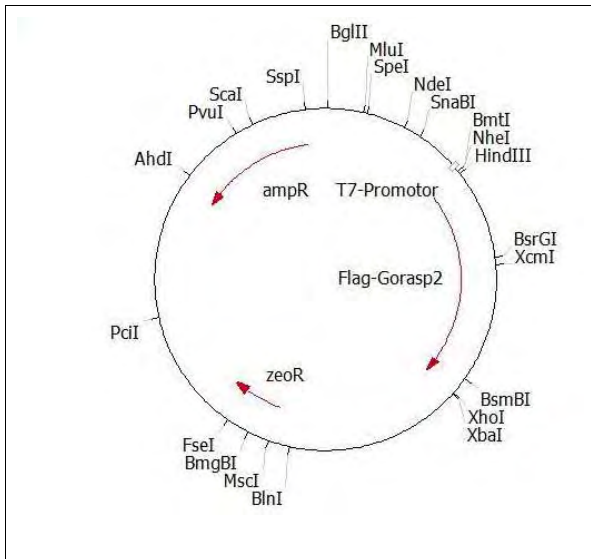
pET23aGorasp2: Erzeugt durch Ligation eines *EcoRI* gespaltenen die codierende Region des CretatinKinase M Proteins enthaltenden cDNS Fragmentes in den *EcoRI* gespaltenen Vektor pET23a

pGorasp2eYFP\_zeo: Erzeugt durch Ligation eines *BamHI* gespaltenen die codierende Region des Gorasp2 Proteins enthaltenden cDNS Fragmentes in den *BamHI* gespaltenen Vektor pCDNA3.1

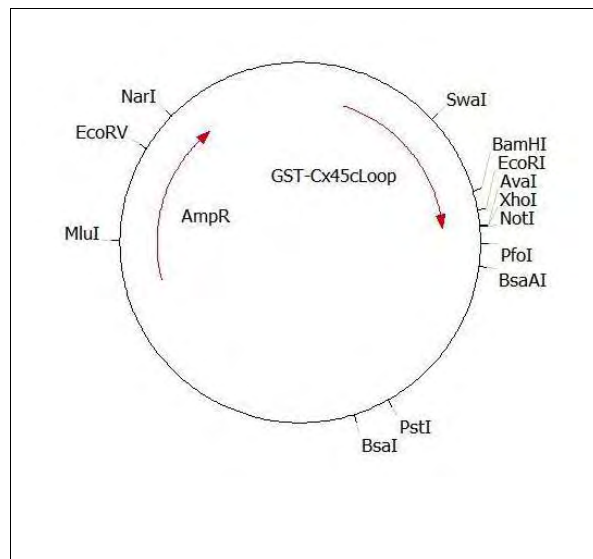


pGorasp2eYFP\_blasto: Erzeugt durch Ligation eines *NotI* gespaltenen die codierende Region des Gorasp2 Proteins enthaltenden cDNS Fragmentes aus dem Vektor pGorasp2eYFP\_zeo in den *NotI* gespaltenen Vektor pBlastCMV

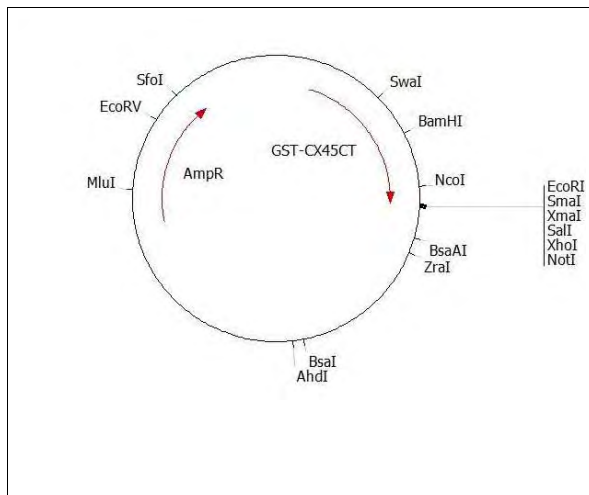
pGorasp2-FLAG: Erzeugt durch Ligation eines *BamHI/XhoI* gespaltenen die codierende Region des Gorasp2 Proteins und der für FLAG codierende Region enthaltenden cDNS Fragmentes in den *BamHI* gespaltenen Vektor pCDNA3.1



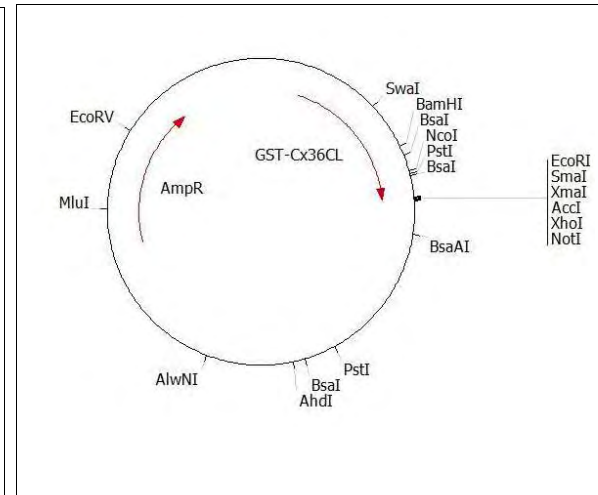
pFLAG-Gorasp2: Erzeugt durch Ligation eines *BamHI/XhoI* gespaltenen die codierende Region des Gorasp2 Proteins und der für FLAG codierende Region enthaltenden cDNS Fragmentes in den *BamHI* gespaltenen Vektor pCDNA3.1



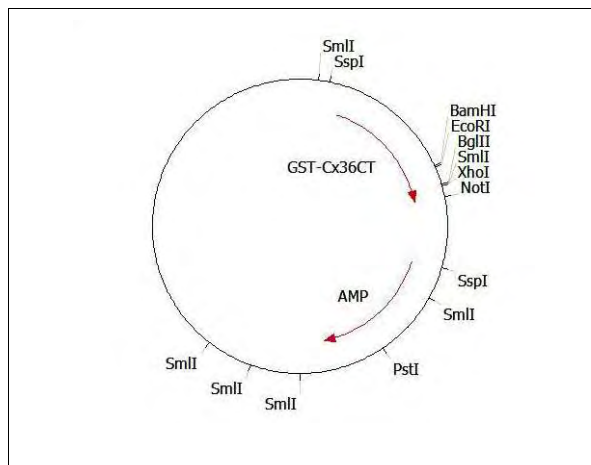
pGEX-6P-1-Cx45CL: Erzeugt durch Ligation eines *BamHI/EcoRI* gespaltenen die codierende Region für die cytoplasmatische Schleife des Cx45 Proteins enthaltenden cDNS Fragmentes in den *BamHI/EcoRI* gespaltenen Vektor pGEX-6P-1



pGEX-6P-1-Cx45CT: Erzeugt durch Ligation eines *BamHI/EcoRI* gespaltenen die codierende Region für den Carboxyterminus des Cx45 Proteins enthaltenden cDNS Fragmentes in den *BamHI/EcoRI* gespaltenen Vektor pGEX-6P-1



pGEX-6P-1-Cx36CL: Erzeugt durch Ligation eines *BamHI/EcoRI* gespaltenen die codierende Region für die cytoplasmatische Schleife des Cx36 Proteins enthaltenden cDNS Fragmentes in den *BamHI/EcoRI* gespaltenen Vektor pGEX-6P-1. Die erzeugte zytoplasmatische Punktmutation wurden auf die gleichen Weise erzeugt.



pGEX-5X-3-Cx36CT : Erzeugt durch Ligation eines *SmaI/NotI* gespaltenen die codierende Region für den Carboxyterminus des Cx36 Proteins enthaltenden cDNS Fragmentes in den *SmaI/NotI* gespaltenen Vektor pGEX-5X-3. Die erzeugten carboxyterminalen Punktmutationen wurden auf die gleichen Weise erzeugt.