

Analysen
zur Expression und Funktion von
Connexinen
während der Skelettmuskelentwicklung und
in adulten Skelettmuskelfasern
der Maus

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Volker Wulf

aus Siegburg

Bonn, 2010

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

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Willecke
2. Gutachter: Prof. Dr. D. O. Fürst

Tag der Promotion: 7.12.2010
Erscheinungsjahr: 2011

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,

Volker Wulf

„Ach, das ist gestreift?“

Loriot, Ödipussi

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus Willecke danke ich für die Überlassung des Themas, die solide Unterstützung und besonders für die Gewährung der wissenschaftlichen Freiheit.

Herrn Prof. Dr. Fürst danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Koch für die freundliche Übernahme des fachnahen - und Frau PD Dr. van Echten-Deckert für die Übernahme des fachangrenzenden Gutachtens.

Der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Fleischman, insbesondere Daniela Wenzel und Torsten Becker, danke ich für die Kooperation.

Herrn Dr. Hartmann Harz danke ich für die Zusammenarbeit und Hilfe im Rahmen der Kalziummessungen.

Meine Band: Julia von Maltzahn, Gerda Hertig, Gabi Matern, Philipp Wörsdörfer, Oliver Tress, Silke Imgrund, Dr. Stephan Sonntag, Christina Ginkel, Felicitas Bosen, Christine Siegmund, Philipp Ebel, Melanie Schütz, Melanie Jokwitz, Dennis May, Indra Lübke, Michael Lange, Stefan Klein, Marina Frank, Nikolai Dicke, Julia Hecker, Christiane Kremser, Thorsten Höher, Robert Requardt, Joachim Degen, Radek Dobrowolski und Maria Kreutzberg.

Anna-Lena singt.

Meine Verwandten und Freunden danke ich. Danke!

Meinem Bruder danke ich für seine Freundschaft.

Meine Eltern Ursula und Hans-Georg geben mir Mut und Kraft.

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest	zweifach destilliertes	NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
Abb.	Abbildung	Neurobiotin	N-[2-aminoethyl]-biotinamid
abs.	Absolut	nizzle	Eigenwort
ATP	Wasser	N-Terminus	aminoterminals
bp	Adenosintriphosphat		Ende eines Peptids
bzw.	Basenpaare	P0	postnatal
	beziehungweise	PBS	Phosphat-gepufferte
[Ca ²⁺]	Intrazelluläre		Salzlösung
°C	Kalziumkonzentration	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
cAMP	Grad Celcius	pH	negativer dekadischer
	zyklisches		Logarithmus der
	Adenosinmonophosphat		Wasserstoffionenkonzentration
CKII	Casein Kinase II	PKC	Proteinkinase C
CL	zytoplasmatische Schleife	RNase	Ribonuklease Ribonukleinsäure
		RNS	Raumtemperatur/Reverse
cm	Zentimeter	RT	Transkription
CMV	Cytomegalovirus	RyR	Ryanodin Rezeptor
C-Terminus	carboxyterminales Ende eines Peptids	SDS	Natriumdodecylsulfat
		s.	siehe
		sec	Sekunde
Cx	Connexin	SERCA	Sarkoplasmatische Retikulum
Da	Dalton		Kalzium ATPase
DEPC	Diethylpyrocarbonat	TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
DNase	Desoxyribonuklease	TE	Tris-EDTA Puffer
DNS	Desoxyribonukleinsäure	TEMED	N,N,N',N'-
d.h.	dass heisst		Tetramethylethylendiamin
DHPR	Dihydropyridin Rezeptor		Tris Tris-(hydroxymethyl)-
dNTP 2'-	desoxy-Nukleosid-5'-	ÜN	aminomethan
	Triphosphat Embryonaltag	Upm	über Nacht
ED	Embryonaltag	UV	Umdrehungen pro Minute
EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure	vgl.	ultraviolett
	enhanced green	v/v	vergleiche
eGFP	fluorescent protein	Vol.	Volumen pro Volumen
	et altera	w/v	Volumen
et al.	et cetera	WT	Gewicht pro Volumen
etc.	Ethanol	z. B.	Wildtyp
EtOH	fötales Kälberserum		zum Beispiel
FCS	Mikrogramm		
µg	Gramm		
g	Stunde(n)		
h	Kilobasenpaare		
kb	(1000 bp)		
kDa	Kilodalton (1000 Da)		
konz.	konzentriert		
µl	Mikroliter		
l	Liter		
Lsg.	Lösung		
M	Molar		
mA	Milliampere		
MCK	Muskel Kreatin Kinase		
mg	Milligramm		
MHC	Mysosin Schwere Kette		
min	Minute(n)		
ml	Milliliter		
MLC	Myosin Leichte Kette		
mM	millimolar		

1	EINLEITUNG	1
1.1	Gap Junctions	1
1.1.1	Struktur von Gap Junctions	1
1.1.2	Funktion von Gap Junctions	2
1.1.3	Regulation von Gap Junctions	4
1.1.4	Connexine als Halbkanäle	5
1.2	Der Skelettmuskel	6
1.2.1	Der kontraktile Apparat	7
1.2.2	Die Elektro-Chemische Kopplung	7
1.2.3	Fasertypen	10
1.2.4	Faserplastizität	10
1.3	DIE EMBRYONALE SKELETTMUSKELENTWICKLUNG (MYOGENESE)	11
1.3.1	Ein Überblick	11
1.3.2	Die Fusion von Myoblasten	13
1.3.3	Die Funktion von Connexinen während der Myogenese	14
1.4	Ziel der Arbeit	15
2	METHODEN	16
2.1	Arbeiten mit DNS	16
2.1.1	Isolierung genomischer DNS aus Schwanzspitzen	16
2.1.2	Die Polymerase Kettenreaktion	16
2.1.3	PCR-Programme zur Genotypisierung von Mäusen	17
2.1.4	Agarosegelelektrophorese	20
2.2	Arbeiten mit RNS	20
2.2.1	RNA Aufreinigung aus Geweben	20
2.2.2	RNA Aufreinigung aus Zellen	21
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	21
2.2.4	RT-PCR	21
2.3	Proteinanalytik	22
2.3.1	Herstellung von Gewebelysaten	22
2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten	22
2.3.3	SDS-Page: Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese	22
2.3.4	Immunoblot	23
2.3.5	Ponceau-Färbung	24
2.3.6	Auftrennung von MHC Isoformen mittels SDS-Page	24
2.3.7	Herstellung der Gewebelysate zur MHC Auftrennung	24
2.3.8	SDS-Page zur MHC Isoformenauftrennung	24
2.3.9	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid Gelen	24
2.4	Isolation primärer Mausmyoblasten	25
2.4.1	Isolation primärer Maus Myoblasten aus embryonalen Skelettmuskeln	25
2.4.2	Isolation primärer Maus Myoblasten aus adulten Skelettmuskeln	26

2.5	Kultivierung primärer Mausmyoblasten	26
2.5.1	Beschichtung der Schalenböden mit Fibronectin.....	26
2.5.2	Kultivierung primärer Maus Myoblasten.....	26
2.5.3	RT-PCR.....	27
2.6	Kalziumbildung	27
2.6.1	Beladung der Zellen mit FURA 2 AM.....	27
2.6.2	Kontamination der Kalziummessungen durch eGFP.....	28
2.7	<i>Ex vivo</i> Mikroinjektion von Farbstoffen in Skelettmuskelfasern	28
2.8	Histologische Techniken	29
2.8.1	Herstellen von Kryoschnitte.....	29
2.8.2	Immunofluoreszenz.....	29
2.8.3	HE-Färbung.....	30
2.8.4	Statistische Auswertung	30
3	MATERIAL	31
3.1.1	Allgemeine Lösungen	31
3.1.2	Lösungen für die Zellkultur.....	33
3.1.3	Lösungen für den Immunoblot.....	34
3.1.4	Lösungen für die Silberfärbung.....	36
3.1.5	Lösungen für die Mikroinjektion/Kalziumbildung	37
3.1.6	Verwandte Geräte.....	38
3.1.7	Reagenziensätze	39
3.1.8	Primäre Antikörper.....	40
3.1.9	Sekundäre Antikörper	40
3.1.10	Mauslinien.....	41
4	ERGEBNISSE	42
4.1	Ektopische Expression von Cx43 in adulten Skelettmuskelfasern	42
4.1.1	Erzeugung der Mauslinie zur skelettmuskel-spezifischen ektopischen Expression von Cx43	42
4.1.2	Immunfluoreszenz-Analysen an Cx43 ektopisch exprimierenden Skelettmuskeln.	43
4.1.3	Immunoblot-Analysen Cx43 ektopisch exprimierender Skelettmuskelfasern.....	45
4.1.4	Mikroinjektion von Neurobiotin in Cx43 ektopisch exprimierende Skelettmuskelfasern	46
4.1.5	ATP-Freisetzungsforschungen an Cx43 ektopisch exprimierenden Skelettmuskelfasern	47
4.1.6	Kraft-Frequenz Messungen an Cx43 ektopisch exprimierenden Skelettmuskelfasern	48
4.1.7	Untersuchung der MHC Isoformen Expression an Cx43 ektopisch exprimierende Skelettmuskelfasern	49
4.1.8	Kalzium Bildung an Cx43 ektopisch exprimierenden primären Skelettmuskelzellen.....	51
4.2	Die endogene Expression von Cx45 in adulter Skelettmuskulatur der Maus	53

4.2.1	Analysen an Cx45lacZ Reporter Mäusen zum Nachweis der Cx45 Promotoraktivität in Skelettmuskelfasern	53
4.2.2	RT-PCR und Immunoblot Analysen an C ₂ C ₁₂ Zellen.....	54
4.2.3	Immunfluoreszenz-Analysen an C ₂ C ₁₂ Zellen	55
4.2.4	Immunfluoreszenz-Analysen zur Lokalisation von Cx45 in adulten Skelettmuskelfasern	56
4.2.5	KO-Immunfluoreszenz-Analysen mittels Antikörpern gegen Cx45 und DHPR.....	58
4.2.6	Immunfluoreszenz-Analysen von Cx45 während der Myogenese	59
4.3	Untersuchungen zur Myogenese an Cx39 und Cx43 doppelt defizienten Embryonen.....	61
4.3.1	Immunfluoreszenz-Analysen an Cx39 und Cx43 doppelt defizienten Embryonen .	61
4.3.2	HE-Färbungen und Gesamtansichten an Cx39 und Cx43 doppelt defizienten Embryonen	63
5	DISKUSSION	64
5.1	Die ektopische Expression von Cx43 im adulten Skelettmuskel	64
5.1.1	Das Transgene System zur ektopischen Expression von Cx43 im Skelettmuskel...	64
5.1.2	Die Lokalisation von ektopisch exprimiertem Cx43 im Skelettmuskel.....	65
5.1.3	Cx43 ektopisch im Skelettmuskel exprimiert zeigt ungewöhnliche Eigenschaften	66
5.1.4	Bildet Cx43 funktionale Halbkanäle?	67
5.1.5	Cx43 ektopisch im Skelettmuskel exprimiert verändert die Kontraktionseigenschaften des Muskels	69
5.1.6	Die intrazelluläre Kalziumkonzentration reguliert die Gentranskription im Skelettmuskel	70
5.2	Die endogene Expression von Connexin45 in adulten Skelettmuskelfasern	71
5.2.1	Die Lokalisation von Connexin45.....	72
5.2.2	Cx45 Halbkanäle im Skelettmuskel	73
5.2.3	Die hypothetische Funktion von Cx45 im adulten Skelettmuskel	75
5.2.4	Mechanismen der Dekodierung von Innervationsmustern im Skelettmuskel.....	76
5.2.5	Purinerge Signalwege im Skelettmuskel und die Beteiligung ATP permeabler Kanäle.....	76
5.3	Untersuchungen der Myogenese an Cx39 und Cx43 doppelt defizienten Embryonen.....	78
5.3.1	Die Expression myogener Marker in Cx39 und Cx43 doppelt defizienten Embryonen	79
5.3.2	Vergleich der Myogenese in Cx39 einfach- und Cx39/Cx43 doppelt defizienten Embryonen – die Rolle von Cx43 während der Myogenese.....	80
5.3.3	Die Funktion von Cx39 während der Myogenese.....	81

5.4	Zusammenfassung.....	83
5.5	Ausblick.....	84
5.5.1	Die ektopische Expression von Cx43 in adulten Skelettmuskelfasern	84
5.5.2	Die Endogene Expression von Cx45 in adulten Skelettmuskelfasern	84
5.5.3	Untersuchungen zur Myogenese an Cx43 und Cx39 defizienten Embryonen.....	85
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	86

1 Einleitung

1.1 Gap Junctions

1.1.1 Struktur von Gap Junctions

Gap Junctions bilden sich aus zwei Halbkanälen, den Connexonen (Goodenough 1976). Sie liegen in der Plasmamembran benachbarter Zellen und bilden nach Zusammenlagerung eine hydrophile Pore. Connexone ihrerseits setzen sich aus sechs Untereinheiten, den Connexinen (Cx) zusammen (s.Abb.1).

Identifiziert wurden 20 Connexine im Maus- und 21 Connexine im menschlichen Genom, von denen 19 orthologe Paare bilden (Kumar and Gilula 1996; Willecke et al. 2002). Connexine werden in fast allen Geweben exprimiert. Dabei können die Expressionsmuster der verschiedenen Connexine überlappen, so daß die Bildung heteromerer Kanäle möglich wird (Kumar and Gilula 1996), und vermutlich eine Redundanz der Connexine in einem Gewebe auftritt. In der adulten Skelettmuskulatur, in bestimmten Blutzellen und Spermatozoen wurde bis zu diesem Zeitpunkt keine Connexin Expression beschrieben (Gilula 1987).

Die Topologie der Connexine zeichnet sich wie folgt aus: Das Protein durchspannt die Membran viermal, besitzt eine intrazelluläre und zwei extrazelluläre Schleifen, sowie den cytoplasmatisch gelegenen N- und C- Terminus (s. Abb.1). Untereinander zeigen Connexine die größten Unterschiede in Sequenz und Länge des C-Terminus. Hoch konserviert hingegen ist die Anordnung von jeweils drei Cysteinresten in den beiden extrazellulären Schleifen (Willecke et al. 2002). Sie sind wahrscheinlich an der Zusammenlagerung von Connexonen beteiligt (Yeager and Nicholson 1996). Disulfidbrücken stabilisieren die Sekundär-Struktur der Schleifen (Kumar and Gilula 1996). Die meisten Connexin-Gene bestehen aus zwei Exonen, getrennt über ein Intron variabler Länge. Exon 1 trägt die 5' untranslatierte Region, Exon 2 die kodierende Region mit anschließender 3' untranslatierter Region (Willecke et al. 2002). Es gibt jedoch Ausnahmen. Die kodierende Region kann auf Exon 1 und 2 verteilt sein oder die 5' untranslatierte Region setzt sich aus mehreren Exonen, alternativ spleißbar, zusammen (Sohl and Willecke 2003). Verwendung findet folgende Nomenklatur: Das Connexin wird mit Cx abgekürzt, und die Spezies (m=Maus, r=Ratte, h=Mensch) sowie die theoretische

Molekularmasse in Kilodalton kDa angegeben (z.B. mCx43). Die Connexin kodierenden Gene werden mit *Gj* abgekürzt, wobei sie chronologisch nach ihrer Entdeckung beziffert werden z.B *Gja1* (Cx43) (<http://www.genenames.org/genefamily/gj.php>).

1.1.2 Funktion von Gap Junctions

Gap Junctions verbinden Zellen untereinander und ermöglichen den Austausch von Ionen, Metaboliten und sekundären Botenstoffen wie Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃), Kalzium-Ionen (Ca²⁺), cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat), und Nikotinamiddinukleotide (NAD⁺) (Harris and Locke, 2010). So bieten sie die Möglichkeit eines koordinierten Agierens von Zellgruppen auf extrazelluläre Signale. Dies ist zentral für Homöostase und Funktion von Geweben.

Als elektrische Synapsen bieten sie einen Weg geringen elektrischen Widerstandes und ermöglichen eine Ladungsübertragung von Zelle zu Zelle mit geringer Verzögerung (Gros and Jongasma 1996), wie z.B. im reizleitenden Gewebe des Herzens und des Nervensystems verwirklicht. In wenig oder schlecht durchbluteten Geweben, wie der Linse, werden Metabolite aus dem Blut von Zelle zu Zelle über Gap Junction Kanäle weitergegeben (DeRosa et al. 2007).

Zudem sind eine Reihe humaner Erkrankungen mit Mutationen in Connexin Genen assoziiert, die die Eigenschaften der Connexine in unterschiedlichster Weise verändern und die vielfältigen Funktionen von Connexinen in Geweben aufdecken.

Bestimmte Mutationen im *Gja1* Gen (Cx43) können zum Beispiel im Menschen zur Ausbildung der ODDD Krankheit führen (Occludentodigitale Dysplasie), die einen vielgestaltigen Phänotyp aufweist (Paznekas et al. 2003). So leiden ODDD Patienten unter Verwachsungen und Missbildungen der Finger, lichtem Haar und unterentwickelten Zähnen. Die Pealizeus-Merzbacher-Ähnliche Erkrankung, die Myelinisierungsdefekte im Nervensystem hervorruft, kann mit Mutationen im Cx47 Gen (*Gja12*) korreliert werden (Orthmann-Murphy et al. 2007). Das Charcot Marie Tooth Syndrom, eine Erkrankung der peripheren Nerven, die in Patienten zur Muskeldegeneration führt, kann u.a. durch Mutationen in Cx32 hervorgerufen werden (Omori et al. 1996). Mutationen in Cx26 und Cx31 führen z.B. zur nicht-syndromischen-Gehörlosigkeit (Liu et al. 2009).

Daneben sind eine Reihe von Connexin Mutationen bekannt, die im Herzen exprimiert werden und mit der Entstehung verschiedener Arrhythmien assoziiert sind (Gollob 2006; Wang et al. 2009).

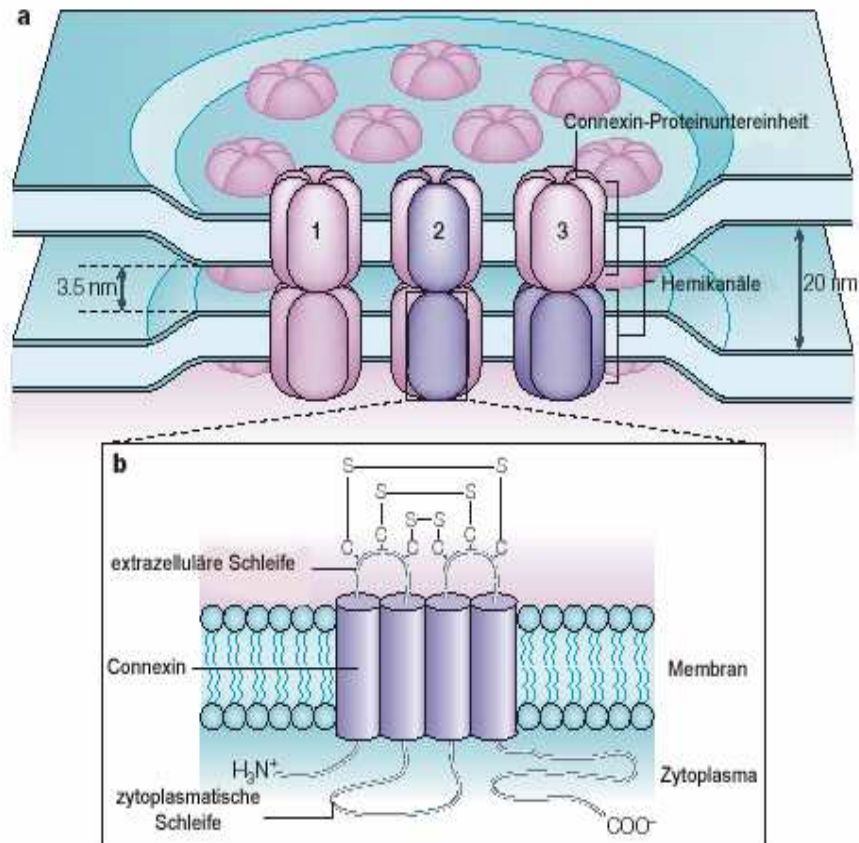


Abb.1.: Schema zweier über Gap Junctions gekoppelter Zellen (a) und die Struktur eines Connexins (b) (verändert nach Söhl et al. 2005).

(a) Gap Junctions verbinden die Cytoplasmata benachbarter Zellen und sorgen so für metabolische und elektrische Kopplung der Zellen untereinander. In Gap Junction gekoppelten Bereichen nähert sich die Membran bis auf einen Spalt von 2-4nm. Gap Junctions bestehen aus Halbkanälen, die jeweils in der Membran benachbarter Zellen liegen. Dabei besteht ein Halbkanal oder Connexon aus sechs Untereinheiten, den Connexinen. Connexone können aus Connexinen desselben Typs (homomer (1)) oder aus verschiedenen Connexinen (heteromer (2)) aufgebaut sein. Des Weiteren können sich Gap Junction Kanäle aus Connexonen des gleichen Typs (homotypisch (1)), oder unterschiedlicher Typen (heterotypisch (3)) bilden.

(b) Ein Connexin durchspannt die Membran viermal, besitzt eine zyttoplasmatische Schleife, zwei extrazelluläre Schleifen, sowie den cytoplasmatisch gelegenen N- und C-Terminus. Die Anordnung dreier Cysteinreste (C) auf beiden cytoplasmatischen Schleifen ist hoch konserviert und man nimmt an, dass sie an der Zusammenlagerung zweier Halbkanäle beteiligt sind. Die Sekundärstruktur der Schleifen wird über intramolekulare Disulfidbrücken (-S-) stabilisiert.

1.1.3 Regulation von Gap Junctions

Reguliert werden kann die interzelluläre Kommunikation über Connexine auf zwei Ebenen: kurzfristig über die Modulation der Kanaleigenschaften, langfristig über die Syntheserate und die Halbwertszeit des Proteins (Laird 1996; Lampe and Lau 2000).

Einen möglichen Regulationsmechanismus bietet die Phosphorylierung, die sowohl die Kanaleigenschaften als auch die Halbwertszeit von Gap Junctions beeinflussen kann (Yeager and Nicholson 1996; Lampe and Lau 2000). So korreliert ein bestimmtes Phosphorylierungsmuster von Cx43 sowohl mit veränderten Kanaleigenschaften, als auch mit einer geringeren Halbwertszeit des Proteins (Dobrowolski et al. 2007).

Neben der Phosphorylierung bestimmen eine Reihe weiterer Faktoren die Öffnungswahrscheinlichkeit von Connexin Kanälen. So zeigen Gap Junction Kanäle spannungssensitive Öffnungswahrscheinlichkeiten, wobei hohe transjunktionale Spannungen zum Kanalverschluss führen (Brink 2000). Außerdem wird die Öffnungswahrscheinlichkeit über die intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]$) moduliert (Rose and Loewenstein 1975). Des Weiteren zeigt der intra- und extrazelluläre pH-Wert Auswirkungen auf den Öffnungszustand der Kanäle (Trexler et al. 1999; Sonntag et al. 2009). Nicht zuletzt können die Eigenschaften durch die Zusammensetzung von Connexonen aus unterschiedlichen Connexinen reguliert werden (Elfgang et al. 1995).

Einen möglichen Mechanismus der Kanalmodulation beschreibt das Partikel-Rezeptor-Modell. Nach diesem Modell verändert die carboxyterminale Domäne bei interzellulärer pH-Wert Erhöhung ihre Konformation und verschließt so den Kanal (Homma et al. 1998), ähnlich einem Stopfen. Dieses Modell scheint jedoch auf nicht alle Connexine anwendbar zu sein (Eckert et al., 2002) und wird durch Strukturanalysen an Cx26 erweitert. Dieses Connexin scheint die Kanalpore nicht mit der carboxyterminalen Domäne sondern mit der aminoterminalen Domäne zu verschließen (Maeda et al. 2009). Ein weiterer diskutierter Mechanismus ist das Iris-Blenden-Modell, nach dem sich die Connexine eines Connexons gegeneinander verschieben und so den Kanal schließen (Unwin et al., 1987; Spray et al., 1984).

1.1.4 Connexine als Halbkanäle

Neben der Bildung von Gap Junctions konnte die Funktionalität von ungepaarten Connexin-Halbkanälen *in vitro* nachgewiesen werden (Stout et al. 2002; Dobrowolski et al. 2007; Sonntag et al. 2009). Es wurde gezeigt, dass Halbkanäle an der Glutamat Freisetzung in Astrocyten (Ye et al. 2003), an der Modulation von Horizontalzellen (Kamermans et al. 2001), an der Weiterleitung von Ca^{2+} Wellen in Astrocyten (Stout et al. 2002) und im Innenohr (Anselmi et al. 2008) sowie an cADPR vermittelten Signalwegen (Bruzzone et al. 2001) beteiligt sind. Dobrowolski et al. (2008) wiesen sogar nach, dass erhöhte Halbkanalaktivität von mutiertem Cx43 mit dem humanen Phänotyp von ODDD in Verbindung gebracht werden kann.

Die *in vivo* Funktionalität von Connexin Halbkanälen unter physiologischen Bedingungen wird jedoch kontrovers diskutiert. Halbkanäle besitzen hohe Leitfähigkeiten (Stout et al. 2002) und deren Öffnung kann zu markomolekularen Strömen führen, die die Integrität der Zelle zerstören und deren Tod herbeirufen (Paul et al. 1991).

Zudem wurden 2001 von Baranova et al. (2004) Pannexine, eine Genfamilie, die in Vertebraten exprimiert wird und Halbkanäle ausbilden kann (Bruzzone et al. 2005), beschrieben. Die Familie besteht aus drei Genen (Pannexin1, Pannexin2, Pannexin3), die keine Sequenzhomologien zu Connexinen aufweisen, die aber eine ähnliche Topologie, mit vier Transmembrandomänen, einer Cytoplasmatischen Schleife und intrazellulär gelegenen C- und N-termini besitzen. Sie weisen von Connexinen unterschiedliche Kanaleigenschaften auf, überlappen jedoch teilweise in ihrer Permeabilität für bestimmte Moleküle, ihrer pharmakologischen Sensitivität und ihrem Expressionsort mit Connexinen. So wird diskutiert, ob die beschriebenen Halbkanaleffekte auf Connexine oder Pannexine zurückzuführen sind (Locke and Harris 2010).

1.2 Der Skelettmuskel

Der Skelettmuskel ist ein Organ mit der Fähigkeit zur Kontraktion/Relaxation. Diese Eigenschaft ermöglicht es dem Organismus, eine Fülle unterschiedlichster Bewegungen auszuführen. Der Skelettmuskel besteht aus Bündeln von Muskelfasern, Syncytien, die durch Fusion einer Vielzahl von Muskelvorläuferzellen entstehen (s.Abb.4). Jede Faser ist dabei von einer Basalmembran, dem Endomysium umgeben (s.Abb.2), die ein Aneinandergleiten der Fasern gewährleistet (Bloom and Fawcett 1968). Außerdem isoliert das Endomysium die einzelnen Fasern elektrisch und verhindert so die Ausbreitung depolarisierender Ströme von Faser zu Faser. Diese Eigenschaft ist zentral für die unterschiedliche Rekrutierung motorischer Einheiten (Bagshaw 1993). Als motorische Einheit bezeichnet man Fasern, die vom selben Motoneuron innerviert werden. Der Skelettmuskel setzt sich aus einer Vielzahl motorischer Einheiten zusammen, von denen immer nur eine bestimmte Anzahl bei der Muskelkontraktion rekrutiert bzw. innerviert werden. Da die Fasern einer motorischen Einheit über den gesamten Faserquerschnitt verteilt liegen, würde bei elektrischer Kopplung der Fasern, die motorische Einheit als funktionales Element aufgehoben werden (Carlson and Wilkie 1974).

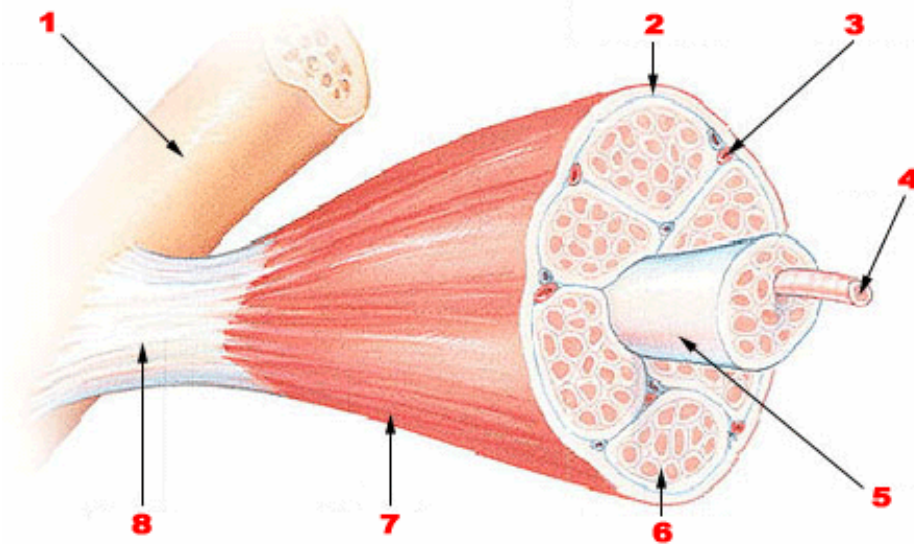


Abb.2.: Schema eines Skelettmuskels

Der Skelettmuskel (7) ist von einer derben Bindegewebsschicht, dem Epimysium (2) umgeben. Dieses läuft zu den Enden in Sehnen aus (8), die den Muskel an das Skelett (1) verankern. Der Muskel seinerseits besteht aus Faserbündeln, die wiederum von einer Basalmembran, dem Perimysium (5) umgeben werden. Innerhalb dieser Bündel wird wiederum jede Muskelfaser (4) von einer Basalmembran, dem Endomysium (6), umhüllt. Gefäße (3) versorgen den Muskel mit Nährstoffen. (Abb. modifiziert nach www.nhi.gov.)

1.2.1 Der kontraktile Apparat

Die Kontraktion/Relaxation einer Skelettmuskelfaser wird ermöglicht durch die in ihm vorhandenen kontraktile Elemente, die Myofibrillen genannt werden. Myofibrillen sind lange Ketten aneinander gereihter Sarkomere, die von Z-Scheiben getrennt werden. Ein Sarkomer enthält die kleinsten Einheiten des kontraktile Apparats bestehend aus Aktin- und Myosinfilamenten. Ausgehend von den Z-Scheiben ziehen Aktinfilamente in das Innere der Sarkomere, wo sie mit den Myosinfilamenten überlappen. Myosinfilamente interagieren mit ihren globulären Domänen (den Myosinköpfen) mit den Aktinfilamenten. Diese Interaktion befähigt letztlich den Muskel zur Kontraktion (Dudel 2001).

Wie die Interaktion von Myosin und Aktin zur Muskelkontraktion führt, erklärt die Querbrückentheorie. Nach dieser Theorie geschieht folgendes: Die Myosinköpfe heften an Aktin, die daraufhin abwinkeln und so die Aktinfilamente in die Sarkomermittte ziehen. Dies führt zur Kontraktion des Muskels. Anschließend lösen sich die Myosinköpfe und der Muskel kann relaxieren (Gordon et al. 1966). Der Querbrückenzyklus ist abhängig von der Bindung und Hydrolyse von ATP an den Myosinköpfen, denen eine ATPase Aktivität zu eigen ist. Die Kinetik der ATP Umsatzrate entscheidet dabei über die Dauer der Aktin/Myosin Interaktion und somit über die Kontraktionszeit einzelner Fasern. Die Umsatzrate der ATPase ist Grundlage der Unterscheidung zwischen schnellen und langsamen Myosin Isoformen (bzw. Fasern) (Bassel-Duby and Olson 2006).

Grundvoraussetzung für eine Interaktion von Myosin und Aktin ist die $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung, wie sie im Zuge einer Kontraktion auftritt, da die Bindungsstelle von Myosin an Aktin durch das Protein Troponin verdeckt wird. Erst nach Kalzium Bindung an Troponin verschiebt sich das Protein, die Bindungsstelle von Myosin an Aktin wird frei und erlaubt so eine Interaktion (Cooke 1986).

1.2.2 Die Elektro-Chemische Kopplung

Der Prozess, der von einer elektrischen Erregung zu einem chemischen Signal, nämlich der Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ aus intrazellulären Speichern und folglich zur Kontraktion und Relaxation einer Muskelfaser führt, wird als Elektro-Chemische Kopplung bezeichnet (Bagshaw 1993; s.Abb.4).

Innervation einer Muskelfaser über ein Motoneuron führt zur Ausbildung eines Aktionspotentials an der motorischen Endplatte der Faser. Dieses breitet sich über die gesamte Faser und wird von regelmäßigen Einstülpungen der Plasmamembran, den T-Tubuli, in das Faserinnere geleitet (s. Abb.3).

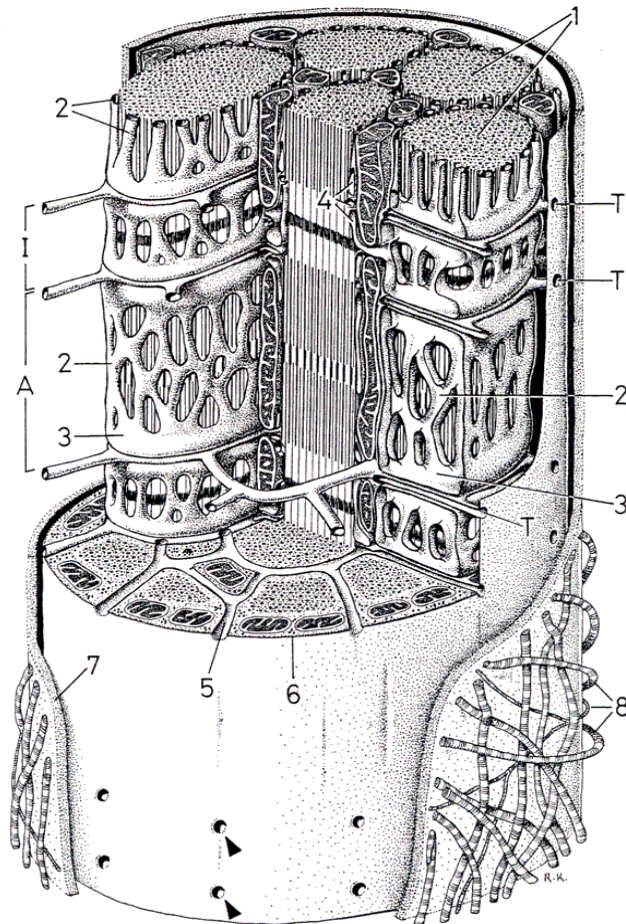


Abb.3.: Schema einer Skelettmuskelfaser.

Jede Skelettmuskelfaser ist von einer Bindegewebschicht (8) umgeben, die die Faser isoliert. Einstülpungen der Plasmamembran, die sich um jede Myofibrille (1) winden, werden als T-Tubuli (T, Pfeile) bezeichnet. Sie gewähren die Weiterleitung von Strömen ins Faserinnere. Flankiert werden T-Tubuli von terminalen Zisternen (3) des Sarkoplasmatischen Retikulums (2). Der Spalt zwischen T-Tubuli und den terminalen Zisternen beträgt ca. 15nm. (Abb. Aus William F. (1991): "Review of medical physiology", 15th Edition, Prentice-Hall International (UK) Limited, London.)

T-Tubuli, die jede Myofibrille umschlingen, sind auf ganzer Länge beidseitig von terminalen Zisternen, spezialisierten Bereichen des Endoplasmatischen Retikulums, umgeben. An diesen Kontaktstellen (T-Tubuli/ terminale Cisterne) wird das elektrische Signal in ein chemisches umgewandelt: Dihydropyridin Rezeptoren (DHPR),

Spannungssensoren in der T-Tubuli Membran, aktivieren nach Depolarisation Ca^{2+} Freisetzungskanäle (RyR – Ryanodine Rezeptoren) in den terminalen Zisternen. Diese setzen Kalzium aus dem Endoplasmatischen Retikulum frei, der Muskel kontrahiert.

Freigesetztes Kalzium wird anschließend über spezielle Ca^{2+} Pumpen (SERCA: Sarcoplasmatische Endoplasmatische Ca^{2+} ATPase) zurück in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums geleitet, der Muskel relaxiert (Dudel 2001).

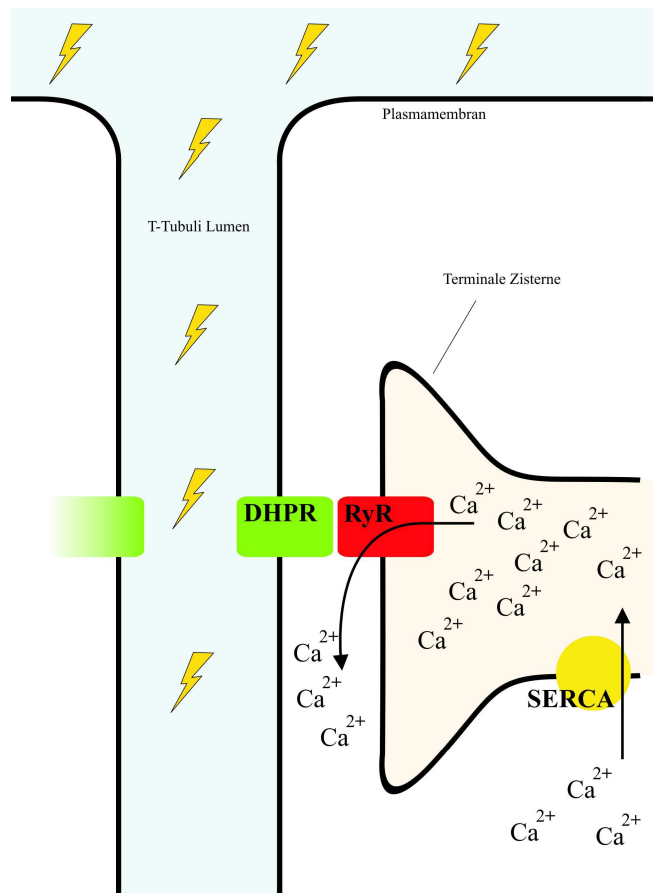


Abb. 4: Schema der Elektro-Chemischen Kopplung im Skelettmuskel.

Motoneuron-Innervation führt zur Depolarisation der Skelettmuskelfasermembran. Die elektrische Erregung wird über T-Tubuli in das innere der Faser geleitet. Dihydropyridin Rezeptoren in der T-Tubuli Membran aktivieren daraufhin spannungsabhängig Ryanodin Rezeptoren, die in der Membran terminaler Zisternen lokalisiert sind. Aktiviert setzen Ryanodin Rezeptoren Kalzium aus dem Lumen des Sarkoplasmatischen Retikulums frei. Der Muskel kontrahiert. Sarkoplasmatische Kalzium ATPasen (SERCA) pumpen anschließend freigesetztes Kalzium in das Lumen des Sarkoplasmatischen Retikulums zurück. Der Muskel erschlafft.

1.2.3 Fasertypen

Die Skelettmuskulatur eines Organismus setzt sich aus einer Vielzahl von Muskelgruppen zusammen. Jeder Muskel wiederum besteht aus einer Vielzahl von Muskelfasern, die sich ihrerseits in ihren biochemischen, metabolischen und physiologischen Eigenschaften unterscheiden. Diese Faser-Heterogenität ist charakteristisch für jeden Muskel und bestimmt am Ende dessen Kontraktions- und Ermüdungseigenschaften (Williams et al. 1996).

Man unterscheidet zwischen zwei Haupttypen von Fasern (vgl. 1.2.1): schnell und langsam kontrahierende. Langsame Fasern exprimieren ausschließlich Myosin Typ I (MHCI), haben hohe Ermüdungsresistenz, sind reich an Mitochondrien, werden von vielen Kapillaren durchzogen, und gewinnen ihre Energie vornehmlich aus oxidativem Metabolismus. Diese Fasern übernehmen Aufgaben anhaltender und dauerhafter Aktivität, darunter Körperhaltung und Atmung (Pette and Staron 2000).

Schnelle Fasern hingegen arbeiten vorwiegend glykolytisch und ermüden rasch. Sie übernehmen Aufgaben, die Schnelligkeit und Kraft erfordern. Diese Fasern exprimieren ausschließlich Typ II Myosin (MHCII), von dem es drei Isoformen gibt: IIa, IIx, IIb. Dabei weisen Typ IIb Fasern Ähnlichkeiten in Kontraktionsdauer, Ermüdungsresistenz etc. mit Typ I Fasern auf (Bassel-Duby and Olson 2006).

Der einzelne Muskel besteht immer aus einer Mischung unterschiedlicher Fasertypen. So setzt sich z.B. der Soleus, ein langsam kontrahierender Muskel, aus 90% Typ I Fasern aber auch aus 10% Typ II Fasern zusammen (Calabria et al. 2009). Dabei kann sich die Faserkomposition eines Muskels als Antwort auf Veränderungen der ihm gestellten Anforderungen (Training) ändern.

1.2.4 Faserplastizität

Im adulten Skelettmuskel wird die Faserkomposition vorrangig über die Aktivität des Muskels und damit über das Innervationsmuster der ihn innervierenden Motoneurone bestimmt (Schiaffino et al. 2007). Ändert sich diese als z.B. Antwort auf äußere Anforderungen (Training), so ändert sich auch seine Faserkomposition. Dieser Adaptionsmechanismus umfasst eine Vielzahl von Signalwegen und betroffenen

Zielgenen. Die bis dato beschriebenen Signalwege sind in Kalzium abhängige und Kalzium unabhängige unterteilbar (Bassel-Duby and Olson 2006).

Kalzium abhängige Signalwege dekodieren bestimmte Motoneuron Aktivitätsmuster, indem sie auf Kalzium Fluktuationen, die während einer Kontraktion auftreten, reagieren. Darunter fallen MEF2/Histondeacetylase-, Ca/NFAT-, CAMKII-, PKC- und PKCmu/PKD-vermittelte Signalwege (Bassel-Duby and Olson 2006; Schiaffino et al. 2007). Beispielhaft soll hier der Ca/NFAT Signalweg angeführt werden. Dieser Signalweg wird vor allem durch $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung geringer Frequenz aktiviert (Dolmetsch et al. 1997), so wie sie vornehmlich in langsamen Muskeln auftaucht (McCullagh et al. 2004; Calabria et al. 2009). Der Signalweg beginnt mit der Bindung von Kalzium an Calmodulin. Calmodulin seinerseits aktiviert Calcineurin, eine Phosphatase, die ihrerseits den Transkriptionsfaktor NFAT dephosphoryliert. NFAT gelangt daraufhin in den Zellkern, wo er im Verband mit anderen Transkriptionsfaktoren die Expression bestimmter Zielgene reguliert. Im Skelettmuskel ist dieser Signalweg für die Aufrechterhaltung des langsamen Fasertyps verantwortlich (Parsons et al. 2003; Parsons et al. 2004). So führt z.B. die Blockierung des Signalwegs zur Verminderung der Anzahl langsamer Fasern (Bigard et al. 2000).

Im Gegensatz dazu stehen eine Reihe Kalzium unabhängiger Signalwege z.B. Ras/MAPK- und PI3/Akt/mTOR-vermittelte Signalwege, die den Muskelphänotyp modulieren können (Schiaffino, Bassel-Duby and Oslon). Diese Signalwege werden durch Bindung extrazellulärer Liganden z.B. IGF-1 (Rommel et al. 2001) oder Thyroidhormone (Fitts et al. 1980) an Rezeptoren aktiviert und regulieren so die Genexpression im Skelettmuskel.

1.3 DIE EMBRYONALE SKELETTMUSKELENTWICKLUNG (MYOGENESE)

1.3.1 Ein Überblick

Die Skelettmuskulatur der Vertebraten bildet sich aus proliferierenden Muskelvorläuferzellen (Myoblasten). Diese differenzieren und fusionieren zu Myotuben, multinukleären Syncytien, die kontraktionsfähig sind und schließlich zu adulten Skelettmuskelfasern reifen (s.Abb.5; Hawke and Garry 2001; Parker et al. 2003).

Muskelvorläuferzellen entstehen aus paraxialen mesodermalen Kompartimenten, den Somiten. Somiten gliedern sich in eine ventrale Region, das Sklerotom und in eine dorsale, das Dermomyotom (Hawke and Garry 2001). Aus dem Sklerotom entsteht das Skelett, aus dem Dermomyotom die Dermis und die Skelettmuskulatur.

Die Skelettmuskelentwicklung beginnt ab Embryonaltag (ED) 8.5. Ab ED 12 sind erste multinukleäre Myotuben gebildet. Ein Teil der Zellen differenziert *in situ*, ein anderer Teil wandert in den Embryo, um die spätere Rumpf- und Gliedmaßenmuskulatur zu bilden.

Eine zentrale Rolle beim Differenzierungsprozess nehmen Myogene Regulator Faktoren (MRF), d.h. Transkriptionsfaktoren mit basischer Helix-Loop-Helix Domäne ein (Edmondson and Olson 1993). Dazu zählen MyoD, Myf5, Myogenin und MRF4. MyoD und Myf5, frühe MRFs, kennzeichnen den Eintritt in die Entwicklung mesodermaler Zellen zu Muskelvorläuferzellen. Myogenin und MRF4, späte MRFs, sind während der terminalen Differenzierung aktiv (Zammit et al. 2006).

Die Transkriptionsfaktoren bilden Heterodimere mit ubiquitär eprimierten E-Box Proteinen, um so an E-Boxen in regulatorischen Regionen Muskelspezifischer Gene zu binden und deren Transkription zu regulieren (Edmondson and Olson 1993).

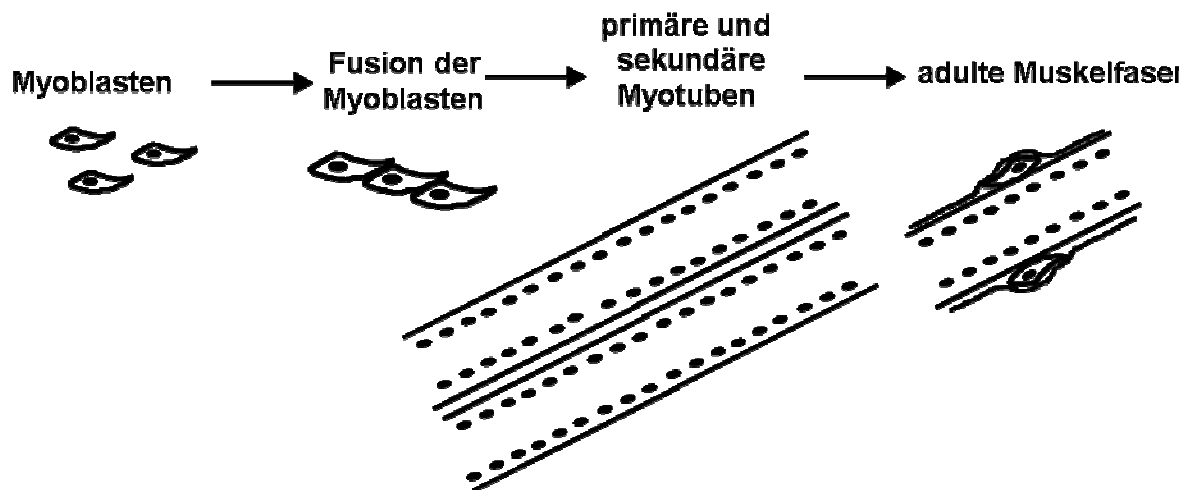


Abb.5.: Schema des Myogenesprozesses.

Aus mesodermalen Zellen des Dermomyotoms entwickelt sich ein Pool proliferierender Muskelvorläuferzellen, die Myoblasten. Mit fortschreitender Differenzierung treten sie aus dem Zellzyklus aus, lagern sich zusammen und fusionieren zu Myotuben, die weiter zu adulten Muskelfasern reifen. Die Expression von MyoD und Myf5 charakterisiert die frühe Phase der Myogenese. Myogenin und MRF4 hingegen sind unabdingbar für den Prozess der Fusion. Reife bzw. adulte Muskelfasern sind von einer Basalmembran, dem Epimysium umgeben. Zwischen Faser und Epimysium liegen Satellitenzellen, die ruhende Stammzellen des Skelettmuskels. (Abb. verändert nach Maltzahn, Doktorarbeit 2008).

1.3.2 Die Fusion von Myoblasten

Eine Vielzahl molekularer Mechanismen koordiniert die Myogenese, an deren Ende die Fusion von Myoblasten zu Myotuben steht. So ist die Expression der frühen MRFs MyoD und Myf5 unabdingbar für die Entstehung proliferierender Muskelvorläuferzellen (Myoblasten). Mit fortschreitendem Differenzierungsprozess beginnt die Expression von Myogenin und MRF4 und damit die terminale Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben. Die Myoblasten treten aus dem Zellzyklus aus, lagern sich zusammen, reorganisieren ihr Cytoskelett und beginnen mit der Expression muskelspezifischer und fusionsrelevanter Proteine (Parker et al. 2003). Während dieser Phase sinkt das Membranpotential und bewirkt so die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, die eine unabdingbare Voraussetzung für die Fusion stellt (Koch et al. 2006). Zudem sind Myoblasten synaptisch erregbar und können Aktionspotentiale weiterleiten (Constantin and Cronier 2000). Tatsächlich sind Motoneurone schon früh im werdenden Muskel zu finden, deren Aktivität wichtig, aber nicht zentral für die normale Muskelentwicklung ist (Harris 1981). Zugleich könnten purinerge Signalwege am Differenzierungsprozess teilnehmen (Cseri et al. 2002; Araya et al. 2004). Nicht zuletzt spielt intrazelluläre Kopplung über Gap Junctions, die während der gesamten fötalen Skelettmuskelentwicklung vorhanden sind und in einer Reihe von Studien belegt und beschrieben wurden, eine Rolle (Constantin and Cronier 2000; Araya et al. 2005; von Maltzahn et al. 2006).

Elektronenmikroskopische Studien von Ling et al. (1992) an Ratten konnten Gap Junctions zwischen Myoblasten, Myotuben und Myoblasten/Myotuben nachweisen. Die Funktionalität der Gap Junctions wurde nachfolgend in Farbstoffkopplungs- und Elektrophysiologischen Analysen bestätigt (Ross et al. 1987; von Maltzahn et al. 2004; Gorbe et al. 2005).

Welche Connexine sind für die Gap Junction Kopplung verantwortlich? Beschrieben ist bis dato die Expression dreier Connexine während der Myogenese: Cx40, Cx43 und Cx39. Cx43 wird ausschließlich in proliferierenden Myoblasten vor Verschmelzung (Gorbe et al. 2005), Cx39 hingegen ausschließlich in Myotuben exprimiert (von Maltzahn et al. 2006; Trovato-Salinaro et al. 2009)). Cx40 wurde im Myotom, dem embryonalen Intercostalmuskel, und in regenerierendem Skelettmuskel nachgewiesen (Trovato-Salinaro et al. 2009).

1.3.3 Die Funktion von Connexinen während der Myogenese

Expressionsanalysen von Cx43 zeigten, dass das Protein ausschließlich in Myoblasten vor der Fusion exprimiert wird. Untersuchungen zur Rolle von Cx43 während der Myogenese zeigten, dass Ablation (Araya et al. 2005) oder iRNS vermittelte Herunterregulation (Squecco et al. 2006) des Proteins die Fusion von Myoblasten zu Myotuben drastisch verringerte. Überexpression von Cx43 in Myoblasten hingegen beschleunigte die Myotubenbildung (Suzuki et al. 2001). Im Gegensatz dazu beobachteten Reinecke et al. (2004) eine erhöhte Sterblichkeit von Cx43 überexprimierenden Myoblasten während der Differenzierung. Überexpression von Cx43 in Myotuben zeigte hingegen keine Auswirkung. Gabe von Gap Junction Blockern führte gar zur vollständigen Verhinderung des Fusionsprozesses (Proulx et al. 1997). Diese Studien bestätigten eine Rolle von Cx43 in Myoblasten vor der Fusion. Anzuführen bleibt, dass Cx43 ablatierte Mäuse Skelettmuskulatur ausbilden (Theis, Doktorarbeit 2001). Dies steht im Kontrast zu den aufgeführten *in vitro* Analysen. Analysen zu Expression von Cx39 während der Myogenese zeigen, dass Cx39 ausschließlich in Myotuben embryonaler und neonataler Muskeln zu finden ist. Die Expression von Cx39 kann jedoch schon ab ED11.5 nachgewiesen werden, zu einem Zeitpunkt an dem sich noch kaum Myotuben gebildet haben (Fürst et al. 1989). Da Cx43 in Myotuben kaum bis gar nicht mehr exprimiert wird, liegt es nahe, die Kopplung zwischen Myotuben auf Gap Junctions, bestehend aus Cx39, zurückzuführen. Die Funktion der Gap Junction Kopplung von Myoblasten vor Fusion ist nicht genau bekannt. Gorbe et al. (2005) zeigten, dass verstärkte Gap Junction Kopplung mit dem Austritt aus dem Zellzyklus einhergeht. Die Zellen, so die Autoren, werden synchronisiert um koordiniert fusionieren zu können. Araya et al. (2004) schlagen Schrittmacherzellen vor, von denen Differenzierungssignale ausgehen, die über Gap Junctions weitergeleitet werden. Welche Funktion Gap Junctions in Myoblasten auch einnehmen, *in vitro* scheint eine Gap Junction Kopplung unabdingbar für die Erlangung der Fusionskompetenz zu sein (Proulx et al. 1997).

Auch die Funktion der Gap Junction Kopplung zwischen Myotuben, die vornehmlich über Cx39 vermittelt wird, ist nicht genau bekannt. Cx39 defiziente Mäusen zeigen beschleunigte Myogenese und Regeneration, einhergehend mit einer früh in der Entwicklung einsetzenden Expression von MyoD, Myogenin, sowie einer erhöhten Expression von Cx43 (von Maltzahn, persönliche Mitteilung).

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Expression und Funktion von Connexinen während der Skelettmuskelentwicklung und in adulten Skelettmuskelfasern der Maus.

Der adulte Skelettmuskel galt als eines der wenigen Gewebe, in dem keine Gap Junctions und folglich keine Connexine exprimiert werden. Jede Muskelfaser ist elektrisch isoliert, was die Ausbreitung depolarisierender Ströme von Faser zu Faser verhindert. Diese Isolation ist Grundvoraussetzung für die einwandfreie Funktion des Skelettmuskels. Über eine Mauslinie, die Cx43 ektopisch in Muskelfasern exprimiert, sollte die elektrische Isolation der Fasern aufgehoben werden, um die Auswirkung auf die Skelettmuskelphysiologie untersuchen zu können.

Zudem konnte in dieser Arbeit erstmalig die endogene Expression eines Connexins, des Cx45, im adulten Skelettmuskel nachgewiesen werden. Die endogene Expression sollte über verschiedene Methoden bestätigt und die Lokalisation des Cx45 Proteins innerhalb der Skelettmuskelfaser bestimmt werden.

Die Skelettmuskulatur der Vertebraten entsteht in Somiten aus mesodermalen Zellen. Diese entwickeln sich zu proliferierenden Myoblasten. Myoblasten fusionieren zu Myotuben, die schließlich zu adulten Muskelfasern reifen. Während der Skelettmuskelentwicklung war die Expression von Cx43, Cx40 und Cx39 beschrieben. Cx43 wird in Myoblasten vor der Fusion; Cx39 und Cx40 werden in Myotuben exprimiert. Ablation von Cx43 führt zur Verzögerung der Skelettmuskelentwicklung. Ablation von Cx39 hingegen beschleunigt die Skelettmuskelentwicklung. Die Cx43 Proteinmenge ist dabei erhöht. So wäre es möglich, dass Cx43 die Funktion von Cx39 übernimmt. An Cx39/Cx43 doppelt defizienten Mäusen sollte deshalb die Skelettmuskelentwicklung analysiert werden, um den möglichen kompensatorischen Mechanismus auszuschalten und die Funktion von Cx39 aufzudecken.

2 Methoden

2.1 Arbeiten mit DNS

2.1.1 Isolierung genomischer DNS aus Schwanzspitzen

Zur Genotypisierung von Geweben wird ein Stück der Schwanzspitze in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 500 µl Laird Puffer versetzt und Ü.N. bei 56°C lysiert. Am nächsten Tag werden die Trümmer abzentrifugiert (10 Minuten; 10.000rpm). Der Überstand wird in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach Inkubation auf dem Schüttler für 5 Minuten wird die ausgefallene DNS abzentrifugiert (s.o). Das Pellet wird getrocknet und in der gewünschten Menge Puffer aufgenommen.

2.1.2 Die Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die selektive Vervielfältigung eines DNS Abschnittes. Dabei dienen spezifische Oligonukleotide, die an der Matrize hybridisieren der Polymerase als Startpunkte.

Die PCR setzt sich aus der Wiederholung dreier Phasen zusammen: der Denaturierungs-, der Hybridisierungs,- und der Synthesephase. Zu Beginn der PCR wird das Reaktionsgemisch auf 94°C erhitzt, dabei trennen sich die komplementären Matrizen. Die erste Denaturierungsphase sollte verlängert sein, damit alle Matrizenmoleküle einzeln vorliegen. Es folgt die Hybridisierung der Startermoleküle. Die Synthesephase wird bei 72°C durchgeführt. Danach folgt wiederum eine Denaturierungsphase. Am Ende empfiehlt sich eine verlängerte Synthesephase, damit alle Produkte zu Ende synthetisiert werden.

Die Hybridisierungstemperatur der Primer ist abhängig von deren Schmelztemperatur. Bei dieser Temperatur liegen 50% der DNS Moleküle einzelsträngig vor. Diese lässt sich wie folgt berechnen: $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$. Üblicherweise wählt man dann eine Hybridisierungstemperatur, die 1-2°C unter der Schmelztemperatur liegt. Das Reaktionsgemisch einer PCR enthält neben der Polymerase, den Primern, und der Matrize $MgCl_2$ sowie ein Nucleotidgemisch, bestehend aus allen Basen.

2.1.3 PCR-Programme zur Genotypisierung von Mäusen

PCR zum Nachweis des Cx39KO Transgens

Primer Sequenzen:

Cx39for: TGGGTGAATGGAGAGGCTAG
 neofor: AATAGCCTCTCCACCCAAGC
 3'Hrev: GACCGTCTTGACCTCAGGTTC

Amplikon: wt -670bp
 tg -870bp

Reaktionsansatz:

5 µl 5x PCR Puffer
 2 µl MgCl₂
 0,5 µl dNTP (10mM each)
 0,5 µl Cx39for (100pmol)
 0,5 µl neofor (100pmol)
 0,5 µl 3'Hrev (100pmol)
 0,2 µl Taq
 1 µl DNS
 14,4 µl H₂O
 25µl

Reaktionsprogramm:

94°C 5' |
 94°C 1' |
 60°C 1' | x29
 72°C 2' |
 72°C 5' |
 Ende

PCR zum Nachweis des Cx43tetOeGFP Transgens

Primer Sequenzen:

EGFPB2: GAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTG
 Cx43-rev2: GCTGGCTTGCTTGTTGTAATTGCG

Amplikon: ~1,9kb

Reaktionsansatz:

5 µl 5x PCR Puffer
 2 µl MgCl₂
 0,4 µl dNTP (10mM each)
 0,25 µl EGFP2B (100pmol)
 0,25 µl Cx43-rev2 (100pmol)
 0,2 µl Taq
 1 µl DNS
 16,9 µl H₂O
 25µl

Reaktionsprogramm:

94°C 5' |
 94°C 30'' |
 69°C 2' | x35
 72°C 1' |
 72°C 10' |
 Ende

PCR zum Nachweis des Cx45flox Transgens

Primer Sequenzen:

15Fcfor: GGATTAAAGTGTGTCACCACTCTTGGC
13Frev: CTCTAGGAACACTGTAACCTGAGATGTCCC
lipX3rev: AAGAACGGCCACAACCTCTGGTAACAGGAAG

Amplikon: wt- 389bp
fl- 473bp
del- 620bp

Reaktionsansatz:

5 µl 5x PCR Puffer
2 µl MgCl₂
0,2 µl dNTP (10mM each)
0,2 µl 15Fcfor (100pmol)
0,2 µl 13Frev (100pmol)
0,2 µl lipX3rev (100pmol)
0,1 µl Taq
1 µl DNS
16,5 µl H₂O
20µl

Reaktionsprogramm:

94°C 4' |
94°C 1' |
67°C 1' | x35
72°C 1' |
72°C 10'
Ende

PCR zum Nachweis des MCKtTA Transgens

Primer Sequenzen:

tet23: GCGGACCCACTTTCACATTTAAG
tet27: CGCTGTGGGGCATTCTTACTTTAG

Amplikon: 220bp

Reaktionsansatz:

5 µl 5x PCR Puffer
2 µl MgCl₂
0,3 µl dNTP (10mM each)
0,25 µl tet23 (100pmol)
0,25 µl tet27 (100pmol)
0,2 µl Taq
1 µl DNS
16 µl H₂O
25µl

Reaktionsprogramm:

94°C 5' |
94°C 1' |
60°C 1' | x29
72°C 1' |
72°C 10'
Ende

PCR zum Nachweis des Myo-Cre Transgens

Primer Sequenzen:

myogen-113sence: TGTGCAGCAACAGCTTAGAG
MH63Cre: AGGCTAAGTGCCTTCTCTACAG

Amplikon: ~ 1kb

Reaktionsansatz:

5 µl 5x PCR Puffer
2 µl MgCl₂
0,5 µl dNTP (10mM each)
0,2 µl myogen-113sence (100pmol)
0,2 µl MH63Cre (100pmol)
0,2 µl Taq
1 µl DNS
14,4 µl H₂O
25µl

Reaktionsprogramm:

94°C 3' |
94°C 30'' |
55°C 30'' | x39
72°C 30'' |
72°C 5' |
Ende

PCR zum Nachweis des Cx45eGFP Transgens

Primer Sequenzen:

Cx45GFPfor: ATGGCTCAGGAACGCTTG
Cx45GFPprev: CAGCTCCACCTTCAGAGTCC

Amplikon: ~ 1kb

Reaktionsansatz:

5 µl 5x PCR Puffer
1,5 µl MgCl₂
1 µl dNTP (10mM each)
1 µl Cx45GFPfor (100pmol)
1 µl Cx45GFPprev (100pmol)
0,5 µl Taq
1 µl DNS
13 µl H₂O
25µl

Reaktionsprogramm:

94°C 5' |
94°C 1' |
58°C 1' | x30
72°C 2' |
72°C 5' |
Ende

2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht das Auftrennen von DNS und RNS nach ihrer Größe. Dabei werden die negativ geladenen DNS Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Agarosematrix. Agarose ist ein Polysaccharid, das durch Aufkochen gelöst wird und während des Abkühlens zu einem Netzwerk geliert. Je kleiner ein DNS Moleküle, desto schneller kann es durch dieses Netzwerk wandern. Die Agarose wird in TBE (x0,75) erhitzt bis sie gelöst ist, wobei sich die Auflösung der Trennung über die eingesetzte Agarosemenge steuern lässt (1% w/v = 150nm Porengröße, 0,16% w/v = 500nm Porengröße). Zur Sichtbarmachung der DNS Fragmente gibt man dem Agarosegel Ethidiumbromid bei. Dieses Molekül interkaliert in die DNS und kann unter einem UV Transilluminator betrachtet werden. Die Proben werden mit 6xLadepuffer versetzt und anschließend im elektrischen Feld aufgetrennt.

2.2 Arbeiten mit RNS

RNA ist sehr anfällig gegenüber enzymatischer und spontaner Hydrolyse. Bei Arbeiten mit RNA sollte man daher die Proben bei 4°C halten und möglichst eine Kontamination mit RNase vermeiden. Dazu werden autoklavierte Materialien verwendet, Handschuhe getragen, und mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) versetzte Lösungen verwendet.

2.2.1 RNA Aufreinigung aus Geweben

Aufgereinigt wird die RNA mit Hilfe des TRIZOL Reagenzes, einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Während der Lyse stabilisiert das Reagenz die RNA, während es Gewebe und Zellen auflöst. Die Proben werden mit 2,5 ml TRIZOL versetzt und mit dem Homogenisatorstab homogenisiert. Vor Homogenisierung einer neuen Probe wird der Stab mit DEPC Wasser gewaschen, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Proben können bei -70°C aufbewahrt werden. Nun werden die Proben mit 2,5 ml Chloroform versetzt, kurz invertiert und abzentrifugiert (15 min 4°C 15.000rpm). Es bildet sich eine organische Phase und eine wässrige Phase, in der sich die RNA befindet. Die wässrige Phase wird abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die RNA wird nun mit 1,25 ml Isopropanol (kurz invertieren) gefällt und abzentrifugiert (15min 4°C 15.000rpm). Daraufhin wird vorsichtig der Überstand verworfen. Das Pellet

wird mit 80% Ethanol gewaschen (1,25ml), abzentrifugiert und bei RT getrocknet. Danach wird das Pellet in DEPC Wasser aufnehmen und im Wasserbad gelöst (10 min 65°C). Die RNA wird bei -70°C gelagert.

2.2.2 RNA Aufreinigung aus Zellen

Die Zellen (ca.90% konfluent) werden trypsiniert, mit Medium versetzt, abzentrifugiert, und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 2,5 ml TRIZOL erfolgt die Lyse der Zellen. Die RNA Isolierung erfolgt wie in 3.1.4. beschrieben.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Hierbei dient die unterschiedliche Absorption von Nukleinsäuren und Proteinen zur Konzentrations-, und Reinheitsgradbestimmung. Purin und Pyrimidin absorbieren bei 260nm, Proteine bei 280nm UV-Licht. Die Absorption der Probe wird bei 260nm und 280nm gegen eine Referenzprobe bestimmt (TE-Puffer). Eine Absorptionseinheit (optische Dichte =1) entspricht bei einem Strahlengang von 1cm einer DNS Konzentration von 50µg/ml und einer RNS Konzentration von 40µg/ml. Der Quotient A_{260}/A_{280} gibt Auskunft über die Reinheit der Probe und sollte für Nukleinsäuren bei ca. 2 liegen.

2.2.4 RT-PCR

Die RT-PCR dient dem Nachweis von Transkripten in einem Gesamt-RNA Pool von Zellen oder Geweben. Dabei schreibt die Reverse Transkriptase RNA in cDNS um, die ihrerseits als Matrize einer spezifischen PCR Reaktion dienen kann. Oligo-dTs, die mit Poly-(A)-Schwänzen der Transkripte hybridisieren, dienen hierbei als Oligonukleotidstartermoleküle. Es werden 2 µg RNA mit 1 µl Oligo-dT (0,5 µg/µl) versetzt und auf ein Reaktionsvolumen von 12 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Danach erfolgt die Denaturierung für 10 min bei 72°C im Wasserbad. Die Anlagerung der Oligo-dTs erfolgt durch 2minütige Inkubation auf Eis. Nun gibt man 1 µl dNTP's (10 mM), 1 µl RNasin® (40 U/µl), 2 µl DTT (0,1 M), 4 µl 5 x Puffer und 1 µl SuperskriptT^M II Reverse Transkriptase (200 U/µl) zum Reaktionsansatz, der für 50 Minuten bei 42°C inkubiert wird. Es folgt die Denaturierung bei 72°C für 15min. Die cDNS kann bei -70°C gelagert werden.

2.3 Proteinanalytik

2.3.1 Herstellung von Gewebelysaten

Die entnommenen Gewebe werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, pulverisiert, und in 1xComplete aufgenommen. Zur weiteren Homogenisierung werden die Proben sonifiziert und anschließend abzentrifugiert (5 min 8.000rpm 4°C). Der Überstand wird in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß, bei -20°C lagerbar, überführt.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten

Die Konzentrationsbestimmung wird mit Hilfe eines Reagenziensatzes (BicinchoninicAcid (BCA) Protein Assay Kit (Sigma)) durchgeführt. Die Methode beruht auf der Fähigkeit von Proteinen Kupfersulfat zu reduzieren, welches dann mit BCA komplexiert. Die Absorption dieses Komplexes liegt bei 562nm, wobei die Absorption proportional zur Proteinkonzentration ist.

2.3.3 SDS-Page: Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese

In der SDS-Page können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Mittels des Detergenz SDS, welches an hydrophobe Bereiche der Aminosäuren bindet, erhalten alle Proteine eine negative Nettoladung. Obwohl SDS denaturierend wirkt, bedarf es β -Mercaptoethanol (Reduktionsmittel) um inter-, und intramolekulare Disulfidbrücken zu reduzieren. Die Proteine liegen nun (weitestgehend) linear vor und können auf ein Gel aufgetragen werden. Die Elektrophorese findet in 1xElektrophoresepuffer statt. Es wird eine Stromstärke von 20mA angelegt.

Das Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammel-, und einem Trenngel (Zusammensetzung s. nachfolgende Tabelle) . Im Sammelgel kommt es zur Fokussierung der Proteine. Dies geschieht, indem sich die Proteinfront zwischen den Leit- und Folge-Ionen sammelt. Da im Sammelgel ein leicht saurer pH-Wert herrscht, laufen Chlorid-Ionen vorraus, Glycin (Nettoladung =0) folgt. Beim Übertritt ins engporigere Trenngel (pH-basisch) erhält Glycin eine negative Ladung und überholt die Proteinfront. Die Proteine werden nun nach ihrer Masse aufgetrennt.

Durch Anfärben des Gels mit Commassie-Blau können die einzelnen Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 50ng Protein.

Zusammensetzung	Sammelgel (8 %)	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)
Acrylamid-Stamm-Lsg.	1,0 ml	4 ml	4,8 ml
Sammelgelpuffer	(4 x) 1,9 ml	-	-
Trenngelpuffer (4 x)	-	3,75 ml	3,75 ml
A. bidest	7,1 ml	7,25 ml	6,45 ml
TEMED	10 µl	20 µl	20 µl
APS (10 %)	100 µl	200 µl	200 µl

2.3.4 Immunoblot

Die Methode ermöglicht den Nachweis bestimmter Proteine in Lysaten von ganzen Organen.

Die Proteine (zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennt) werden hierbei auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, und können anschließend über Antikörper nachgewiesen werden.

Nach Elektrophorese werden folgende Komponenten übereinander gelegt: Schaumstofflappen, 3MM Papier, SDS Gel, Nitocellulosemembran, 3MM Papier, Schaumstofflappen. Alle Komponenten sollten zuvor mit Transferpuffer getränkt und möglichst luftblasenfrei übereinander geschichtet werden. Beim Einlegen in die Blotkammer ist die Membran in Richtung Anode zu positionieren. Der Transfer erfolgt 2h bei 4°C und 100V.

Durch Immunoreaktion werden spezifisch Proteine auf der Nitrocellulosemembran nachgewiesen. Zum Absättigen unspezifische Bindungen wird die Membran zuerst in Blockierlösung für 1h inkubiert. Es folgt die Inkubation mit der Primär-Antikörperlösung (2h oder Ü.N. 4°C) und anschließendem Abwaschen unspezifisch gebundener Antikörper mit Waschblotpuffer (2x5 min; 2x10 min). Darauf folgt die Inkubation der Membran mit der Sekundär-Antikörperlösung (1h RT), sowie auch hier das Abwaschen unspezifisch gebundener Antikörper mit Waschblotpuffer (2x5min, 2x10min). Die Membran wird nun für 5min mit der Chemilumineszens-Lösung inkubiert. Anschließend legt man einen RX

Film (Fuji) auf und entwickelt diesen nach verschiedenen Expositionszeiten.

2.3.5 Ponceau-Färbung

Ein gelungener Transfer der Proteine kann durch eine Poceau-Färbung der Membran nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze liegt bei 100 ng Protein.

2.3.6 Auftrennung von MHC Isoformen mittels SDS-Page

Im adulten Skelettmuskel werden vier MHC Isoformen exprimiert die über eine SDS-Page aufgetrennt und mittels Silberfärbung nachgewiesen werden können (Talmadge and Roy 1993).

2.3.7 Herstellung der Gewebelysate zur MHC Auftrennung

Die in Tissue Tec eingebetteten Skelettmuskeln werden mit einem Kryostaten in 10 μ m (~20 Schnitte) geschnitten und in 200 μ l Homogenisierungspuffer gelöst. Nach Zentrifugation (10 Minuten; 10.000rpm) wird der Überstand abgenommen und das Pellet 200 μ l Waschpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (s.o.). Den Überstand erneut verwerfen und das Pellet in je nach Menge der Schnitte in mindestens 20 μ l Resuspendierungspuffer aufnehmen.

2.3.8 SDS-Page zur MHC Isoformenauftrennung

Die MHC Isoformen werden über ein Minigelsystem bei R.T. aufgetrennt (s. Material). Das Gel wird wie ein Standardgel gegossen, man fügt lediglich 30% Glycin bei. Zur Analyse werden 10 μ l MHC Lysat in A. bidest im Verhältnis 1:1 verdünnt, mit Lämmli Puffer versetzt und aufgetragen. Die Gelelektrophorese wird bei 10mA für 5 Stunden durchgeführt. Nach dem Gellauf folgt die Silberfärbung des Gels.

2.3.9 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid Gelen

Nach Lauf des Gels wird dasselbe zuerst in Fixierungslösung für 30 Minuten - und anschließend in Sensitivierungslösung für 30 Minuten inkubiert. Nach 2 x 10 minütigem

waschen wird das Gel 20 Minuten in Färbelösung gelegt. Nach 3 x 5 minütigem waschen des Gels in Waschlösung, folgt die Färbereaktion in Entwicklungslösung. Die Färbereaktion wird durch Inkubation des Gels in der STOP Lösung herbeigeführt. Das Gel kann nun ausgewertet werden.

2.4 Isolation primärer Mausmyoblasten

Primäre Myoblasten können sowohl aus embryonalem als auch aus adultem Skelettmuskelgewebe gewonnen werden. Die erhaltenen Kulturen bestehen immer aus einer Mischung von Fibroblasten und Myoblasten. Durch bestimmte Kulturbedingung/Techniken kann jedoch das Wachstum von Myoblasten in solchen gemischten Kulturen gefördert werden. Präparation embryonaler Skelettmuskel führt zu einer hohen Ausbeute an Zellen die sehr schnell proliferieren. Die Präparation adulter Skelettmuskeln führt zu einer deutlich geringeren Zellausbeute, doch sind in diesen Kulturen weniger Fibroblasten vorhanden.

2.4.1 Isolation primärer Maus Myoblasten aus embryonalen Skelettmuskeln

Embryonen (ab ED16.5) werden durch Abtrennung des Kopfes getötet. Die Hinterbeine und das Zwerchfell, welches grob zerrupft wird, herauspräparieren und in eiskaltem PBS sammeln. Anschließend die Muskeln in ein 1,5ml Eppendorf Gefäß überführen und 750 µl Kollagenase/Dispase (~2ml/1mg Gewebe) hinzufügen. Die Muskeln bei 37°C für 45 Minuten verdauen. Alle 15 Minuten die Lösung mit einer Pipette resuspendieren. Nach 45 Minuten Inkubation 150µl Trypsin hinzufügen resuspendieren und weitere 15 Minuten inkubieren. Die Lösung bei 300 rcf für 5 Minuten zentrifugieren, den Überstand verwerfen das Pellet in F10 Medium resuspendieren. Anschließend wird die Zellsuspension 1:6 auf Fibronectin beschichtete Vertiefungen von 1 cm² Schalen ausgesät (24-well Platten). Nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ sind alle Myoblasten aus den Zelltrümmer ausgewachsen und das Medium kann erneuert werden.

2.4.2 Isolation primärer Maus Myoblasten aus adulten Skelettmuskeln

Die zu präparierende Maus sollte nicht zu alt sein, da die Ausbeute an Myoblasten mit steigendem Alter geringer wird.

Nach Tötung der Maus durch einen Genickbruch, werden die Hinterbeinmuskulatur und das Zwerchfell entfernt. Die Muskeln grob mit einer Schere zerkleinern und in 1,5 ml Kollagenase/Dispase (~2ml/1mg Gewebe) aufnehmen. Es folgt eine 60 minütige Inkubation der Lösung bei 37°C. Alle 15 Minuten resuspendieren. Anschließend 250 µl Trypsin hinzufügen und weiter 20 Minuten bei gelegentlicher Resuspendierung inkubieren. Die Zellsuspension in 5 ml F10 Medium aufnehmen und über ein Zellsieb filtern um grobe Trümmer zu entfernen. Anschließend wird die Suspension bei 300 rcf für 10 Minuten zentrifugiert. Den Überstand verwerfen und das Pellet anschließen in F10 Medium aufnehmen. Die Zellsuspension auf eine mit Fibronectin beschichtete 9 cm² Schale aussäen. Nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ sind alle Myoblasten aus den Zelltrümmer ausgewachsen und das Medium kann erneuert werden.

2.5 Kultivierung primärer Mausmyoblasten

2.5.1 Beschichtung der Schalenböden mit Fibronectin

Primäre Myoblasten müssen stets auf Fibronectin beschichteten Schalenböden kultiviert werden, da sich die Zellen sonst während der Differenzierung ablösen. Dazu die Böden mit der Fibronectinlösung bei R.T. für 30 Minuten inkubieren und mit PBS waschen. Diese Arbeiten ausschließlich mit einer Pipette ausführen, da sonst die Fibronectinmatrix zerstören werden könnte.

2.5.2 Kultivierung primärer Maus Myoblasten

Die Zellen werden alle 2-3 Tage mit F10 Medium gefüttert. Dabei darf niemals das Medium vollständig abgesaugt werden, da sich die Myoblasten sonst sofort ablösen. Bei 50%-60% Konfluenz müssen die Zellen passagiert werden um eine Differenzierung in Myotuben zu verhindern. Die Gabe von Differenzierungsmedium führt zur Fusion von Myoblasten zu kontraktile Myotuben. Differenziert können die Zellen bis zu zwei Wochen kultiviert werden.

2.5.3 RT-PCR

Die RT-PCR dient dem Nachweis von Transkripten in einem Gesamt-RNA Pool von Zellen oder Geweben. Dabei schreibt die Reverse Transkriptase RNA in cDNS um, die ihrerseits als Matrize einer spezifischen PCR Reaktion dienen kann. Oligo-dTs, die mit Poly-(A)-Schwänzen der Transkripte hybridisieren, dienen hierbei als Oligonukleotid-startermoleküle. Es werden 2 µg RNA mit 1 µl Oligo-dT (0,5 µg/µl) versetzt und auf ein Reaktionsvolumen von 12 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Danach erfolgt die Denaturierung für 10 min bei 72°C im Wasserbad. Die Anlagerung der Oligo-dTs erfolgt durch 2minütige Inkubation auf Eis. Nun gibt man 1 µl dNTP's (10 mM), 1 µl RNasin® (40 U/µl), 2 µl DTT (0,1 M), 4 µl 5 x Puffer und 1 µl SuperskriptT^M II Reverse Transkriptase (200 U/µl) zum Reaktionsansatz, der für 50 Minuten bei 42°C inkubiert wird. Es folgt die Denaturierung bei 72°C für 15min. Die cDNS kann bei -70°C gelagert werden.

2.6 Kalziumbildung

Intrazelluläres Kalzium kann über Kalzium sensitive Farbstoffe nachgewiesen werden. Kalziumbindung führt dabei zur Verschiebung der Emmissionswellenlänge des Farbstoffes. Die die Verschiebung der Emissionswellenlänge kann vermessen werden und spiegelt qualitativ Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ wieder.

In dieser Arbeit wurde der Kalzium Farbstoff FURA 2 AM verwand. Der Farbstoff ist Membranpermeabel und erst die Abspaltung der atoxymethyl- Gruppe (AM) durch endogene Esterasen lässt den Farbstoff Membran impermeabel werden.

2.6.1 Beladung der Zellen mit FURA 2 AM

Die Beladung der Zellen erfolgte in Ringerlösung, da im Medium enthaltenes Serum zur Abspaltung der AM-ester Gruppe führen kann. Beladen wurden die Zellen in Ringerlösung versetzt mit 7,5 µm FURA-2AM und 0,75 µm Pleuronic für 20 Minuten bei 37°C und 5% CO₂.

Nach mehrmaligem waschen der Zellen mit Ringerlösung wurden sie vermessen.

2.6.2 Kontamination der Kalziummessungen durch eGFP

Die Anregungs- und Emissionwellenlängen von eGFP und FURA 2 sind ähnlich. Dies führt zur Kontamination der FURA 2 Messungen und kann zu deutlichen Fehlinterpretationen der Experimente führen (Bolsover et al. 2001). So wurde die Methode von Ainscow et al. (2000) zur Auswertung der Daten verwendet. In dieser Arbeit wurde die während einer Kontraktion hervorgerufene $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung als maximaler Referenzwert verwendet.

2.7 *Ex vivo* Mikroinjektion von Farbstoffen in Skelettmuskelfasern

Zur Iontophoretischen Injektion von Neurobiotin in Skelettmuskeln *ex vivo* wurden der Soleus und EDL Muskeln verwendet. Nach Tötung der Mäuse durch einen Genickbruch wurden die Muskeln aus den Hinterbeinen präpariert und 20 Minuten in eiskalter Ringerlösung inkubiert. Nachfolgend wurden die Muskeln zwischen eine Büroklammer geklebt und in die Messkammer überführt. Die Injektion erfolgte in Ringerlösung bei R.T. Der Farbstoff wurde mit 0,5 nA bei 1Hz für 5 Minuten injiziert. Um die Viabilität der Fasern zu prüfen, wurde während der Injektion stets das Membranpotential der injizierten Fasern gemessen. Es wurden nur solche Fasern zur Auswertung herangezogen, welche während der Injektion mindestens ein Membranpotential von -30 mV besaßen (Maltzahn, Doktorarbeit 2008). Die Präparate wurden nach der Injektion kurz in PBS⁻ gewaschen, 30 Minuten in einer Glutaraldehydlösung fixiert und abermals 3 x 5 Minuten in PBS⁻ gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Avidin gekoppelter Meerrettich-Peroxidaselösung für 2 Stunden. Überschüssiger Lösung wurde daraufhin durch Waschen in PBS⁻ entfernt. Der Nachweis der Peroxidase erfolgte mittels des Reagenziensatzes „Histo-Green POD Substrat Kit“ (Linaris).

2.8 Histologische Techniken

2.8.1 Herstellen von Kryoschnitte

Diese Methode erlaubt das Schneiden von tiefgefrorenen Geweben ohne vorherige Fixierung. Besonders im Hinblick auf anschließende Immunfluoreszenzenanalysen ist dies vorteilhaft.

Das Gewebe wird auf den Objektträger mit Tissue Tec festgefroren und dieser in das Gefriermikrotom (HM 500 OM, MICROM) gespannt. Die Kühlraumtemperatur wird auf -20°C eingestellt, die Objekttemperatur auf -19°C . Es werden Schnitte von 12-20 μm Dicke angefertigt, die auf einem Objektträger aufgenommen wurden. Nachdem diese 20min an der Luft getrocknet sind, werden die angefertigten Objekte bei -70°C aufbewahrt.

2.8.2 Immunofluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ermöglicht es Proteine, in fixierten Geweben und Zellen zu untersuchen. So können Aussagen über die Lokalisation eines Proteins in den Zellen, sowie dessen Expressionsgrad getroffen werden.

Die Gewebeschnitte werden für 10min in PFA fixiert und anschließend mit PBS gewaschen (3x5 min). Bei Bedarf folgt die Kernfärbung mit Propidiumiodid (1:25000 in PBS) und anschließendes Waschen (5min in PBS). Der Farbstoff interkaliert mit der DNS. Da dies jedoch auch mit RNA geschähe, werden die Schnitte zuvor einem RNase-Verdau ausgesetzt (RNase 2000; 1:100 in PBS).

Unspezifische Bindungen werden durch Inkubation in Blockierungslösung (5% BSA in PBS) für 45 min abgesättigt. Die Primär-Antikörperlösung wird anschließend 1h bei RT (oder Ü.N. bei 4°C) inkubiert und mit PBS⁻ (3x5 min) gewaschen. So werden unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Darauf folgt die Inkubation der Schnitte mit der Sekundär-Antikörperlösung für 1h und nachfolgendes Abwaschen unspezifisch gebundener Antikörper mit PBS⁻ (3x5min). Die Sekundär-Antikörper tragen einen Fluoreszenzfarbstoff, der angeregt durch einen Laser oder UV-Licht (bestimmter Wellenlänge) fluoresziert und unter dem Mikroskop (LSM 510 META, Zeiss) sichtbar wird.

2.8.3 HE-Färbung

Mittels der Hämatoxylin-Eosin Färbung werden Zellkerne blau und das Cytoplasma rot angefärbt. Die in H₂O aufgenommenen Schnitte werden für ca. 2 min in der Hämatoxylinlösung inkubiert. Danach folgt das bläuen unter laufendem lauwarmen Leitungswasser. Die Schnitte werden dann für 20 min in 0,1% Eosinlösung gefärbt und anschließend kurz mit Leitungswasser gewaschen. Die gefärbten Präparate werden in Entellaneingedecktelt.

2.8.4 Statistische Auswertung

Zur Statistichen Auswertung wurde der T-test herangezogen. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant, ein p-Wert kleiner 0,005 als hoch signifikant bezeichnet.

3 Material

3.1.1 Allgemeine Lösungen

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

PBS ⁻ (pH 7,2)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ für die Kultur von He137-Zellen 20 min autoklavieren.
SDS-Stammlösung (10 %)	10%ige (w/v) Natriumdodecylsulfatlösung
TBS (pH 7,5)	10 mM Tris 50 mM NaCl
Tris-HCl (pH 7,4)	1 M Tris in 1 M HCl ansetzen
DEPC-H ₂ O	A. bidest mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat versetzen, 1 h autoklavieren
dNTP-Mix (10 mM)	je 0,1 Vol. 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP 0,6 Vol. TE-Puffer (pH 8,0) bei -20°C lagern.
Proteinase K-Lösung (20µg/µl)	20 mg Proteinase K in 1 ml A. bidest lösen; Aliquots bei -20°C lagern.

Material

Lysozym-Stammlösung (10µg/µl)	10 mg Lysozym in 1 ml A. bidest lösen; Aliquots bei -20°C lagern.
RNase 2000	100 mg RNase A 1 ml RNase T (1 x 10 ⁵ U) 49 ml RNase-Puffer 15 min kochen, langsam abkühlen lassen und in 2 ml-Aliquots bei -20°C lagern.
TE-Puffer (pH 8)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA 20 min autoklavieren
Laird Puffer	100 mM Tris-HCl 200 mM NaCl 5 mM EDTA 0,2 % (w/v) SDS vor Gebrauch Zugabe von 3 µl Proteinase K-Lsg.
DNS-Ladepuffer (6x)	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30% Glyzerin
dNTP-Mix	je 0,1 Vol. 0,1 M dATP, dCTP, dGTP, dTTP 0,6 Vol. TE-Puffer
5x First-Strand Puffer	250 mM Tris-HCl (pH 8,3) 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂
MgCl ₂ -Lösung	25 mM MgCl ₂ (Promega)
10x PCR-Puffer	kommerziell (Promega)

Material

TE-Puffer
10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
1mM EDTA
20 Minuten autoklaviert

3.1.2 Lösungen für die Zellkultur

D10-Medium
DMEM
10% fötales Kälberserum
(30 min bei 56°C hitzeinaktiviert)
5 ml Pen/Strep Stammlösung

F-10 Medium für primäre
Myoblasten
400 ml F-10 Medium
100 ml Pferdeserum
5 ml PIS
50 µl bFGF

D10-Medium zur
Differenzierung
DMEM
10% fötales Kälberserum
5 ml PIS

PIS-Stammlösung
0,6% Penicillin G
1,0% Streptomycinsulfat
pH 8,2

Versine-Trypsin-Lösung
8,0 g NaCl
0,4 g KCl
1,0 g Glukose
0,2 g EDTA
16 ml Trypsinlösung (2,5% in PBS⁻)
ad. 1l
pH 7,5

Material

Pen/Strep-Stammlösung	0,6% Penicillin G 1,0% Streptomycinsulfat pH 8,2
Versine-Trypsin-Lösung	8,0 g NaCl 0,4 g KCl 1,0 g Glukose 0,2 g EDTA 16 ml Trypsinlösung (2,5% in PBS ⁻) ad. 1l pH 7,5

3.1.3 Lösungen für den Immunoblot

APS (10 %)	10 % APS (Ammoniumpersulfat)
Blockierungslösung (Immunfluoreszenz)	4 % (w/v) BSA in PBS ⁻
Blockierungslösung (Immunoblot)	5 % (w/v) Magermilchpulver (Sucofin) in Waschpuffer
CoomassieBrillantBlue TM -Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 10 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Methanol Lösung durch Faltenfilter filtrieren
Coomassie-Entfärber	10 % (v/v) Essigsäure 30 % (v/v) Methanol
Elektrophoresepuffer (10x)	0,25 M Tris-Base 1,92 M Glyzin 1 % (w/v) SDS pH 8,3

Material

Lämmli-Probenpuffer (4x)	250 mM Tris 12 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glyzerin 0,04 % (w/v) Bromphenolblau 20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol pH 6,8
Lämmli-Puffer (4x)	12% (w/v) SDS 250mM Tris 40 % (v/v) Glyzerin
Ponceau-Färbelösung (lichtgeschützt lagern)	0,2 % (w/v) Ponceau S 1 % (v/v) Essigsäure
Sammelgelpuffer (Lösung D)	0,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8 Lagerung bei 4°C
Waschpuffer	8,5 mM Tris-HCl 1,7 mM Tris-Base
Transferpuffer	20 mM Tris 150 mM Glyzin 20 % Methanol (pH 8,1 - 8,3)

3.1.4 Lösungen für die Silberfärbung

Die Lösungen stets frisch ansetzen und bei R.T. dunkel lagern.

Fixierungslösung	100 ml Ethanol 25 ml Essigsäure ad 250 ml mit dest. Wasser
Waschlösung	dest. Wasser
Sensitivierungslösung	75 ml Ethanol 1,25 ml Glutaraldehyd 10 ml Natriumthiosulfat 17 g Natriumacetat ad 250 ml mit dest. Wasser
Färbelösung	25 ml Silbernitrat (2,5% w/v) 0,1 ml Formaldehyd (37% w/v) in 250 ml dest. Wasser
Entwicklerlösung	6,25 g Natriumcarbonat 0,05 ml Formaldehyd in 250 ml dest. Wasser
Stopplösung	3,65 g EDTA-Na ₂ 250 ml dest. Wasser

3.1.5 Lösungen für die Mikroinjektion/Kalziumbildgebung

Ringerlösung	115 mM NaCl 4,7 mM KCl 1,8 mM CaCl 1,2 mM K_2HOP_4 1,2 mM $MgSO_4$ 20 mM $NaCO_3$ 5 mM Glucose 10 mM HEPES pH 7,6
Ethidiumbromid-Lösung	5 μ g/ml 1:2 in KCl
Glutaraldehyd-Lösung	1 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS^- , Lösung wird vor dem Experiment frisch angesetzt
KCl-Stammlösung	1 M KCl
LiCl-Stammlösung	1 M LiCl
Lucifer-Yellow-Lösung	4 % (w/v) Lucifer-Yellow sterilfiltrieren und bei 4°C lichtgeschützt lagern
Meerrettich-PO-Lösung Peroxidase	0,1 % (v/v) Avidin D gekoppelte Meerrettich- in PBS^- Lösung immer frisch ansetzen
Neurobiotin-Lösung	6 % (w/v) Neurobiotin 0,4 % Rhodamin-3-Isothiocyanat Dextran 0,1 M Tris pH 7,6 Lagerung lichtgeschützt bei 4°C
Triton-X-100-Lösung	2 % (v/v) Triton-X-100 in PBS^-

3.1.6 Verwandte Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Brutschrank BB6220	Heraeus
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Elektrophoresekammer Perfect blue™	PeqLab
Elektrophoresekammer Mighty-Small II SE250/SE260 mit SE245	Hofer
Feinwaage Navigator	Ohaus
Fluorometer Genios	Tecan
Geltrockner M583 Gel Dryer	Bio-Rad
Heizblock DRI-Block DB3	Techne
Heizgerät TRZ 3700 (Mikroinjektion)	Zeiss
Image Master® VDS	Pharmacia Biotech
Inkubator 6000	Heraeus
Inkubationskammer Knusperbox	Stollwerk
Kapillarenzieher horizontal P-97	Sutter Instruments
Kolbenhubpipette Pipetman (20, 200, 1000 µl)	Gilson
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf
Kühlzentrifuge J2-21 mit Rotor JA20	Beckman
Kühlzentrifuge Multifuge primoR	Heraeus
Magnetrührer MR 2002	Heidolph
Mikromanipulator	Eppendorf
Mikroskop IM 35	Zeiss
Mikroskop LSM 510	Zeiss
Mikroskop mit Epifluoreszenz, Axiophot	Zeiss
Mikrowelle MW 800	Continent
PCR-Maschine PTC-200	Biozym
PCR-Maschine PTC-100	Biozym
PCR-Maschine Primus 96 plus	MWG AG Biotech
Peristaltische Pumpe P-1	Amersham
Pipettierhilfe vac-petus	Faust
Pipettierhilfe accu-jet	Brand
Polytron-Homogenisatorstab	Kinematica

Material

Semi-Dry-Blotkammer	BioRad
Spannungsgerät Bio-Rad 1000/500	Bio-Rad
Spannungsgerät LKB GPS 200/400	Pharmacia
Spektralphotometer DU 640	Beckmann
TILL Imaging System	Till Photonics
Überkopf-Inkubator roto-mix	NeoLab
Überkopf-Inkubator roto-mix	NeoLab
Ultraschallbad Transsonic T460	Elma
UV-Transilluminator Image Master VDS	Pharmacia
Wasserbad E100	Lauda
Wasserbad PC	Julabo
Wasserbad Shake Temp SW21	Julabo

3.1.7 Reagenziensätze

Bichinonic Acid Kit for Protein Determination	Sigma
DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II	Roche
Jetstar Plasmid Midi Kit 50	JETstar
Megaprime-DNA labeling system	Amersham
Perfectprep [®] Gel Cleanup Kit	Eppendorf
pGEM-T Easy Vector System I	Promega
Restore [™] Western Blot Stripping	Pierce
RNAeasy Mini Kit	Qiagen
SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce

3.1.8 Primäre Antikörper

Antigen	Antikörpertyp	Herkunft	Verdünnung	Referenz
Actinin				
Cx39	polyklonal	Kaninchen	1:100	von Maltzahn et al. 2004
Cx43	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Schlieker, Diplomarbeit 2000
Cx45	polyklonal	Kaninchen	1:500	U. Jannsen Bienhold, Oldenburg
Tubulin	polyklonal	Maus	1:10000	Chemicon
Living colors eGFP	polyklonal	Kaninchen	1:500	Clontech
My32	monoklonal	Maus	1:1000	Sigma
SERCA	monoklonal	Maus	1:500	Abcam
RyR	monoklonal	Maus	1:500	Abcam
DHPR (IID5E1)	monoklonal	Kaninchen	1:100	DSHB

3.1.9 Sekundäre Antikörper

	Herkunft	Antigen	Verdünnung	Referenz
Alexa 488	Ziege	Kaninchen	1:1000	MoBiTec
Alexa 594	Ziege	Kaninchen	1:1000	MoBiTec
Cy2	Ziege	Kaninchen	1:200	Dianova
Peroxidase	Ziege	Maus	1:1000	Dianova
Peroxidase	Ziege	Kaninchen	1:1000	Dianova

3.1.10 Mauslinien

Bezeichnung	Kurzbeschreibung	Referenz
C57BL/6	Inzuchtstamm, schwarz	Charles River
Cx43CFP	Mauslinie zur Expression des CFP unter Kontrolle des Cx43 Promotors	Joachim Degen
Cx43tetOeGFP	Mauslinie zur Expression des Cx43 und eGFP über das TetOFF System	Döring, Dissertation 2005
Cx45lacZ	Mauslinie zur Expression des lacZ Gens unter Kontrolle des Cx45 Promotors	Krüger et al. 2000
MCKtTA	Mauslinie zur Expression des Tet-Transaktivators unter Kontrolle des MCK Promotors	Ahmad et al. 2000

4 Ergebnisse

4.1 Ektopische Expression von Cx43 in adulten Skelettmuskelfasern

Ein zentraler Bestandteil der einwandfreien Funktion eines Muskels ist die elektrische Isolation der einzelnen Skelettmuskelfasern (Dennis et al. 1981). Connexine, bzw. Gap Junctions koppeln Zellen metabolisch und elektrisch untereinander und so galt der adulte Skelettmuskel als eines der wenigen Gewebe, welches keine Connexine exprimiert (Gilula 1987). Um die Bedeutung der elektrischen Isolation innerhalb der Muskelphysiologie zu studieren, sollte die elektrische Isolation über die ektopische Expression des Connexin43 in adulten Skelettmuskelfasern aufgehoben werden.

4.1.1 Erzeugung der Mauslinie zur skelettmuskel-spezifischen ektopischen Expression von Cx43

Verpaart wurden die Cx43tetOeGFP Mauslinie (Döring, Doktorarbeit, 2005) mit der MCKtTA Mauslinie (Ahmad et al. 2000), um Cx43 ektopisch im adulten Skelettmuskel exprimieren zu können. Der Tetrazyklin Transaktivator (tTA), unter Kontrolle des skelettmuskel-spezifischen Muskel-Kreatin-Kinase Promotors (MCK), aktiviert die bidirektionale Expression von Cx43 und des Reportergens eGFP.

Spezifische Funktionalität des Systems wurde bereits in der dieser Arbeit vorhergehenden Diplomarbeit (Wulf, Diplomarbeit 2006) gezeigt. Mäuse, die Cx43 ektopisch im Skelettmuskel exprimierten, ließen keinen offensichtlichen Phänotyp erkennen.

Untersucht wurden jeweils ein schnell kontrahierender Muskel, der EDL Muskel (Extensor Digitorum Longus; lat.: langer Zehenstrecker) und ein langsam kontrahierender Muskel, der Soleus Muskel (lat.: Schollenmuskel). Die Analysen zeigten, dass in beiden Muskeltypen Cx43 und eGFP ektopisch exprimiert werden konnte (s.Abb. 7 u. 8). In Wildtyp Muskeln wurde weder Cx43 noch eGFP nachgewiesen.

Im Folgenden werden Mäuse, die Cx43 ektopisch im Skelettmuskel exprimieren, als Transgen bezeichnet.

4.1.2 Immunfluoreszenz-Analysen an Cx43 ektopisch exprimierenden Skelettmuskeln

Um die Lokalisation von Cx43 innerhalb Transgener Skelettmuskelfasern zu bestimmen, wurden Immunfluoreszenz-Analysen an Kryoschnitten mittels Cx43 Antikörpern durchgeführt. Es zeigte sich, dass Cx43 Signale in Transgenen Skelettmuskelfasern im gesamten Bereich der Plasmamembran zu finden waren. Die Signale waren dabei weitgehend gleichmäßig über die Membran verteilt und nicht auf bestimmte Regionen beschränkt (s. Abb.7). Außerdem waren Cx43 Signale vereinzelt und unregelmäßig innerhalb der Fasern erkennbar. Dies könnte auf eine Lokalisation des Proteins in intrazellulären Vesikeln deuten.

Der Soleus, ein langsam kontrahierender Muskel mit geringem Muskelfaser-Durchmesser, zeigte deutliche Unterschiede in Intensität der eGFP Signale (Reportergen), beim Vergleich der einzelnen Fasern eines Muskels untereinander (s.Abb.7 D). Im EDL, einem schnell kontrahierendem Muskel mit großem Faser-Durchmesser, wurden eGFP Signale in allen Fasern mit ähnlicher Intensität nachgewiesen (s.Abb.7 B).

Da die Fasern im Muskel aneinander liegen, und Cx43 in der Membran lokalisiert war, konnte eine Kopplung der Fasern durch Gap Junctions nicht ausgeschlossen werden.

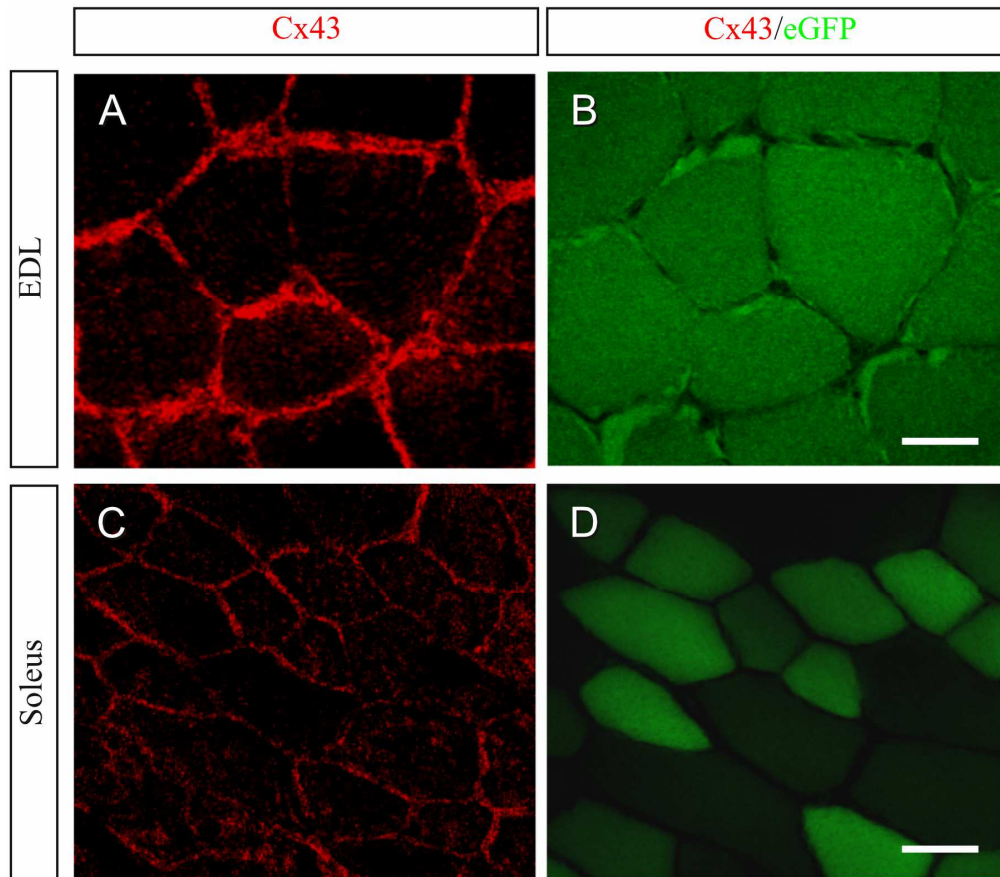


Abb.7.: Immunfluoreszenz-Analysen an Querschnitten adulter Cx43 ektopisch exprimierender Skelettmuskeln.

Verwendet wurden Antikörper gegen Cx43. EGFP konnte direkt nachgewiesen werden. Bilder A und C zeigen Aufnahmen des Cx43 Signals, B und D Aufnahmen des eGFP Signals. In beiden Muskeltypen (Soleus: langsam kontrahierend; EDL: schnell kontrahierend) sind Cx43 Signale vornehmlich im Bereich der Plasmamembran zu finden. Zudem sind vereinzelt und unregelmäßig Cx43 Signale innerhalb der Fasern erkennbar, die auf eine Lokalisation von Cx43 in intrazellulären Vesikeln deuten könnten. Immunfluoreszenz-Analysen an Wildtyp Muskeln zeigten weder Signale für Cx43 noch eGFP (Daten nicht gezeigt). Maßstabsbalken: 10µm.

4.1.3 Immunoblot-Analysen Cx43 ektopisch exprimierender Skelettmuskelfasern

Im Immunoblot können drei Phosphorylierungsmuster von Cx43 nachgewiesen werden (P0, P1, P2; s.Abb.8; vgl. HM1), wobei das Muster mit bestimmten Funktionen von Cx43 korreliert werden kann (Lampe et al. 2006). Analysen an Cx43 ektopisch exprimierenden- (tg) Skelettmuskellysaten, sollten Aufschluss über das Cx43 Phosphorylierungs-Muster und somit Hinweise auf dessen Funktionalität geben.

Zum einen zeigte sich, dass Cx43 und eGFP Signale nur in Transgenen Lysaten (tg) und nicht in Wildtyp Lysaten (wt) nachgewiesen wurde. Zum anderen war ektopisch exprimiertes Cx43 in Skelettmuskeln nur bis zur P1 Stufe phosphoryliert (s. Abb. 8). Im Gegensatz dazu konnten in HM1 Zellysaten, einer embryonalen Maus Stammzell-Linie, die funktionale Cx43 Gap Junction ausbilden, alle drei Phosphorylierungsstufen nachgewiesen werden.

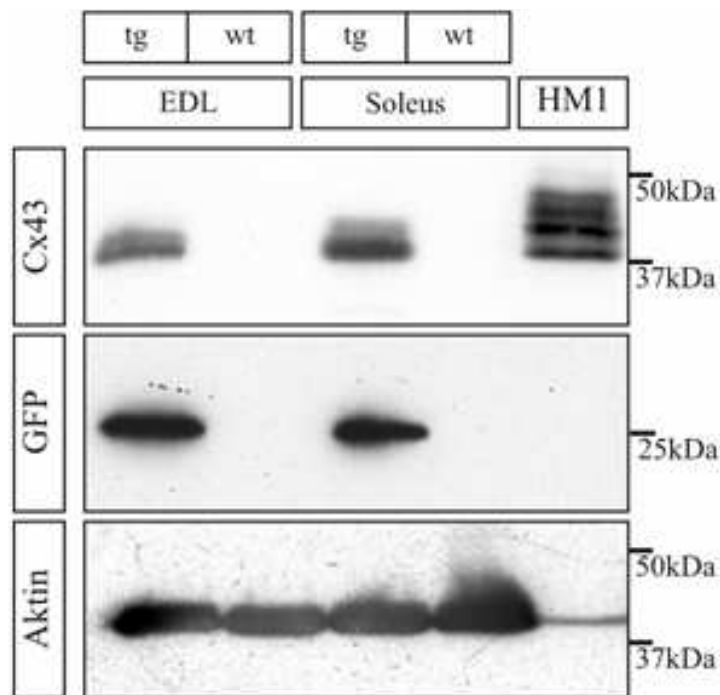


Abb.8.: Immunoblot-Analysen von Cx43 ektopisch exprimierenden- (tg) und Wildtyp Skelttmuskellysaten.

Verwendung fanden Antikörper gegen Cx43, GFP und Aktin. Aufgetragen wurden Muskellysate des EDL und Soleus von Cx43 ektopisch exprimierenden- (tg) und Wildtyp Lysaten (wt), des Weiteren als Kontrolle ein HM1 Zellysate. Ektopisch exprimiertes Cx43 war nur bis zur P1 Stufe phosphoryliert.

4.1.4 Mikroinjektion von Neurobiotin in Cx43 ektopisch exprimierende Skelettmuskelfasern

Der Nachweis einer möglichen Gap Junction Kopplung in Cx43 ektopisch exprimierenden Skelettmuskelfasern sollte über die Mikroinjektion von Neurobiotin erfolgen. Neurobiotin ist ein Molekül mit einer molekularen Masse von 287kDa und permeabel für die meisten Connexin Kanäle, darunter Cx43 (Elfgang et al. 1995). Die Ausbreitung von Neurobiotin in benachbarte Fasern sollte eine mögliche Gap Junction Kopplung nachweisen. Viabilität der injizierten Fasern wurde dabei stets durch Messung des Membranpotentials während der Injektion geprüft (s. Kapitel 2.7).

Es zeigte sich, dass Neurobiotin, injiziert in Fasern des EDL - (Abb.9 A) oder des Soleus Muskels, nicht in benachbarte Fasern diffundierte, eine metabolische Gap Junction Kopplung demnach ausgeschlossen werden konnte. Über diese Methode konnte jedoch nicht vollständig eine elektrische Kopplung der Fasern untereinander ausgeschlossen werden. Ionen, die elektrische Ströme tragen, sind um ein vielfaches kleiner als Neurobiotin, und könnten mögliche Cx43 Gap Junctions trotzdem passieren.

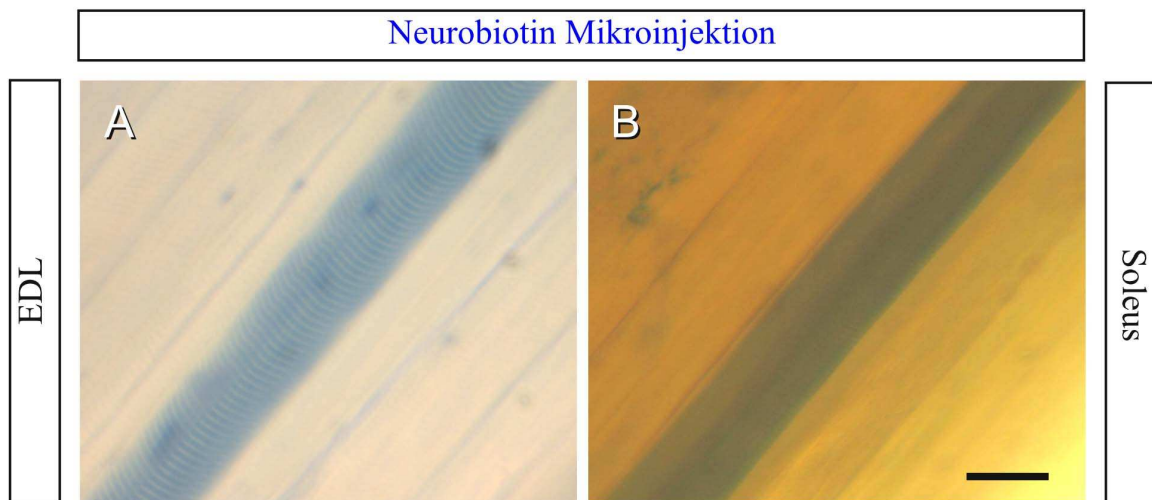


Abb.9.: Ex vivo Mikroinjektion von Neurobiotin in Cx43 ektopisch exprimierende Skelettmuskeln.

Neurobiotin wurde für 20 Minuten in eine Muskelfaser injiziert, wobei die Viabilität der Faser stets durch Messung des Membranpotentials geprüft wurde. Anschließend wurde der Muskel fixiert und Neurobiotin immunhistochemisch nachgewiesen (s. Abschnitt 2.7). Cx43 ektopisch exprimierende Muskeln zeigten weder im EDL (A) noch im Soleus (B) eine Ausbreitung von Neurobiotin in benachbarte Muskelfasern. Auch in Wildtyp Muskeln konnte keine Diffusion von Neurobiotin in benachbarte Muskelfasern nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Maßstabsbalken: 20µm.

4.1.5 ATP-Freisetzungsuntersuchungen an Cx43 ectopisch exprimierenden Skelettmuskelfasern

Zur Untersuchung der Funktionalität von ectopisch exprimiertem Cx43 in Skelettmuskeln wurden ATP-Freisetzungsuntersuchungen durchgeführt. ATP kann Cx43 Halbkanäle passieren und in relativer Quantität nachgewiesen werden. Mögliche Cx43 Halbkanäle im Skelettmuskel wurden dabei durch Kalziumentzug im Medium geöffnet (Kang et al. 2008). Es zeigte sich, dass Cx43 ectopisch exprimierende Muskeln (Abb.10. schwarze Balken) signifikant mehr ATP freisetzen als Wildtyp Muskeln, denen Cx43 fehlte (Abb.9. weiße Balken). D.h.: sowohl Cx43 bildet funktionale Halbkanäle im Skelettmuskel als auch, dass bereits endogen ATP permeable Kanäle im Skelettmuskel aktiv sind, deren Öffnung durch Kalziumentzug hervorgerufen werden kann.

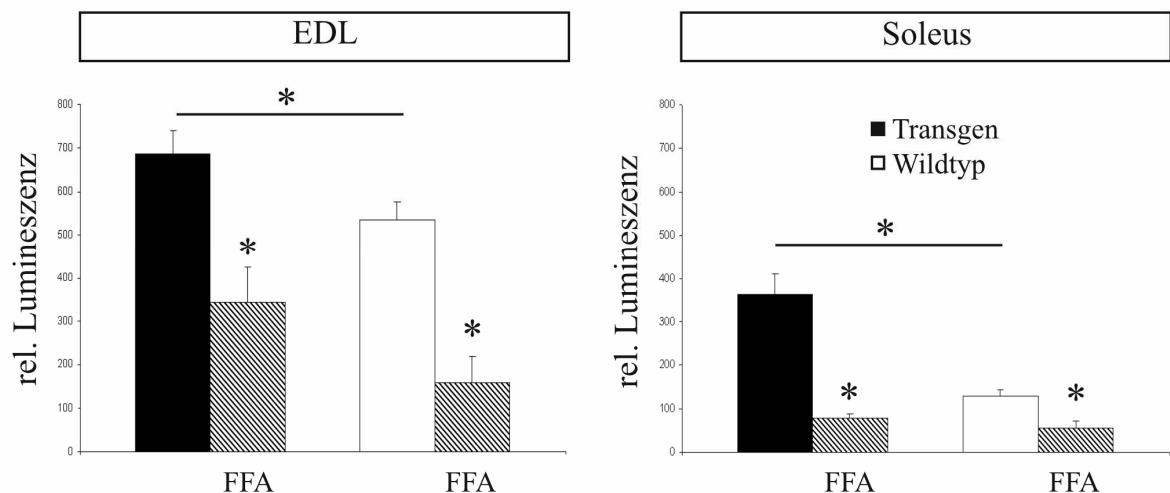


Abb.10.: Untersuchungen zur ATP-Freisetzung an Cx43 ectopisch exprimierenden - (tg; schwarze Balken) und Wildtyp (wt; weiße Balken) EDL und Soleus Muskeln.

Die Skelettmuskeln wurden in physiologischer Lösung inkubiert und anschließend die Öffnung von Halbkanälen über Kalziumentzug stimuliert. Nach 20 Minuten Inkubation wurde die ATP Menge in der Badlösung chemiluminometrisch vermessen. Cx43 ectopisch exprimierende Muskeln (n=8) setzen signifikant mehr ATP frei als Wildtyp Muskeln (n=7). Applikation des Halbkanalblocker FFA (100µM für 10 Minuten) führte in allen Fällen (wt: n=7; tg: n=5) zur signifikanten Verminderung freigesetzten ATPs (*: p<0,05).

Die freigesetzte ATP Menge war im Cx43 ektopisch exprimierendem EDL war um das 1,3-fache, im Soleus um das 3,3-fache jeweils im Vergleich zu Wildtyp Muskeln erhöht. Unabhängig vom Genotyp wurde vom EDL, einem schnell kontrahierenden Muskel, (tg u. wt) stets mehr ATP freigesetzt als vom Soleus, einem langsam kontrahierenden Muskel. Applikation des Halbkanal-Blockers FFA (flufenamic acid) reduzierte die Menge an freigesetztem ATP in allen Fällen signifikant (Abb.10. graue Balken). Trotz Applikation des Halbkanal-Blockers konnte die ATP Freisetzung nicht vollständig verhindert werden (s. graue Balken). Dies lässt vermuten, dass Konzentration und Dauer der Halbkanal-Blocker Applikation zu gering waren (Harris and Locke 2010), um alle möglichen Halbkanäle vollständig zu blockieren.

4.1.6 Kraft-Frequenz Messungen an Cx43 ektopisch exprimierenden Skelettmuskelfasern

Zur Bestimmung der Kontraktionscharakteristika von Cx43 ektopisch exprimierenden Skelettmuskeln wurden Isometrische Kraft-Frequenz Messungen in Kooperation mit Frau Dr. Daniela Wenzel (AG Fleischmann) durchgeführt. Dabei wurde der Muskel mit bestimmten Frequenzen stimuliert und die resultierende Kraft gemessen.

Abb.11. zeigt, dass Cx43 ektopisch exprimierende Skelettmuskeln (tg; rote Kurven) bei bestimmten Frequenzen höhere relative Kraft entwickelten im Vergleich zu Wildtyp Muskeln (wt; schwarze Kurven).

Im EDL war dies bis zu Frequenzen von 50 Hz, (93% der Maximal-Kraft) und im Soleus bei Frequenzen bis zu 20 Hz (79% der Maximal-Kraft) der Fall (s. Abb.11).

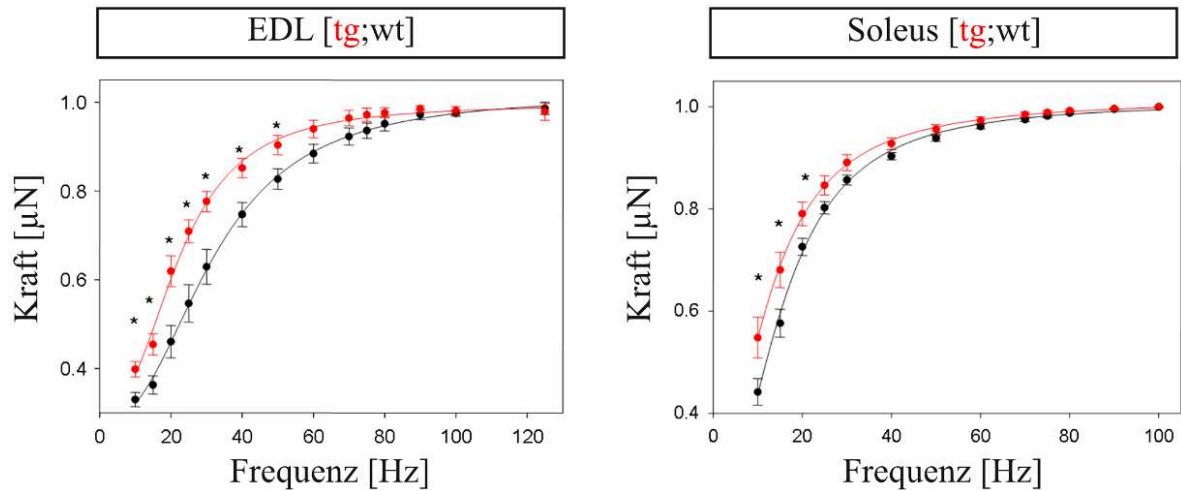


Abb.11.: Kraft-Frequenz Messungen an Cx43 ektopisch exprimierenden- (tg) und Wildtyp (wt) Muskeln.

Sowohl der EDL als auch der Soleus Muskel Cx43 ektopisch exprimierend (tg, rote Kurve) zeigten gegenüber Wildtyp Muskeln (wt, schwarze Kurve) signifikant erhöhte Kraftentwicklung bei bestimmten Frequenzen (*: $p < 0,05$; EDL –tg: $n=6$, wt: $n=5$; Soleus –tg: $n=7$; wt: $n=9$).

4.1.7 Untersuchung der MHC Isoformen Expression an Cx43 ektopisch exprimierende Skelettmuskelfasern

Die Zusammensetzung der MHC Isoformen ist für jeden Muskeltyp charakteristisch und bestimmt u.a. dessen Kontraktionseigenschaften (Schiaffino et al. 2007). Im adulten Muskel werden vier Isoformen exprimiert, die nach der Kinetik der ATP-Umsatzrate an den Myosinköpfen eingeteilt werden. Der EDL exprimiert ausschließlich die schnellen MHC Isoformen MHC IIa, IIx und IIb, der Soleus, neben MHC IIx und MHC IIb vorrangig die langsame Isoform MHC I (Pette and Staron 2000).

Analyse der MHC Zusammensetzung an Cx43 ektopisch exprimierenden EDL zeigten, dass die Expression der MHC IIb Isoform im Vergleich zum Wildtyp EDL Muskel signifikant erhöht war (s. Abb. 12). Im Soleus Muskel zeigte die MHC Zusammensetzung keine signifikante Veränderung in Cx43 ektopisch exprimierenden Skelettmuskeln im Vergleich zu Wildtyp Muskeln (s. Abb. 13).

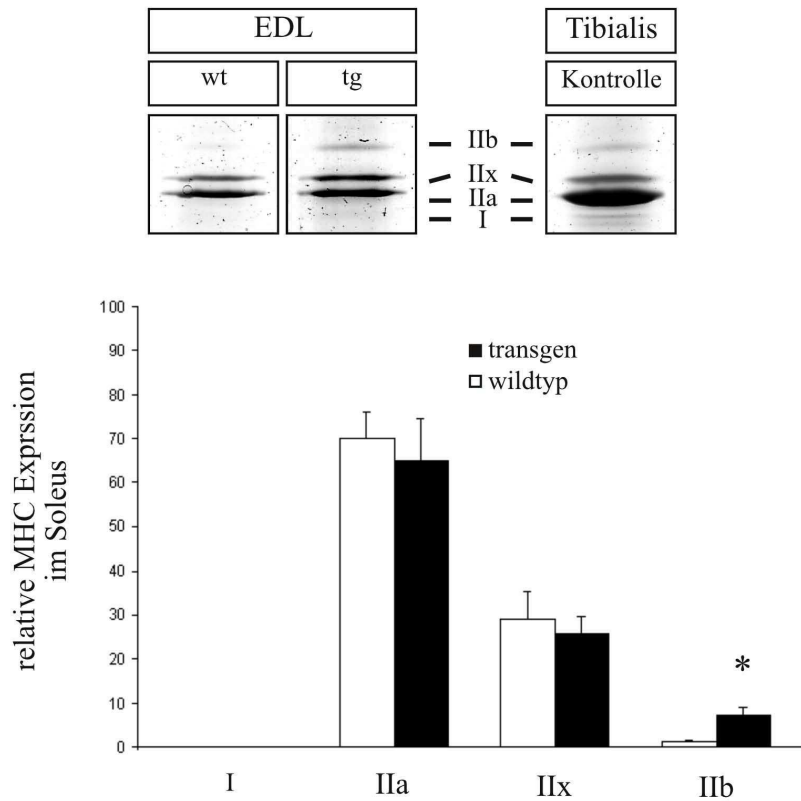


Abb.12.: Analyse zur MHC Isoformen Expression im EDL Muskel.

Untersucht wurden Cx43 ektopisch exprimierende (tg) - und Wildtyp Muskeln (wt). (A) Representative Bilder einer elektrophoretischen Analyse der MHC Isoformen im EDL. Exprimiert werden MHC IIa, IIx und IIb. Die MHC I Isoform wird im EDL nicht exprimiert. Ein Wildtyp Tibialis anterior Muskel diente als Standard. (B) Quantifizierung der elektrophoretischen Analysen zeigten eine signifikant erhöhte MHC IIb Expression in Cx43 ektopisch exprimierenden EDL Muskeln (*: $p < 0.05$; wt u. tg: $n = 4$).

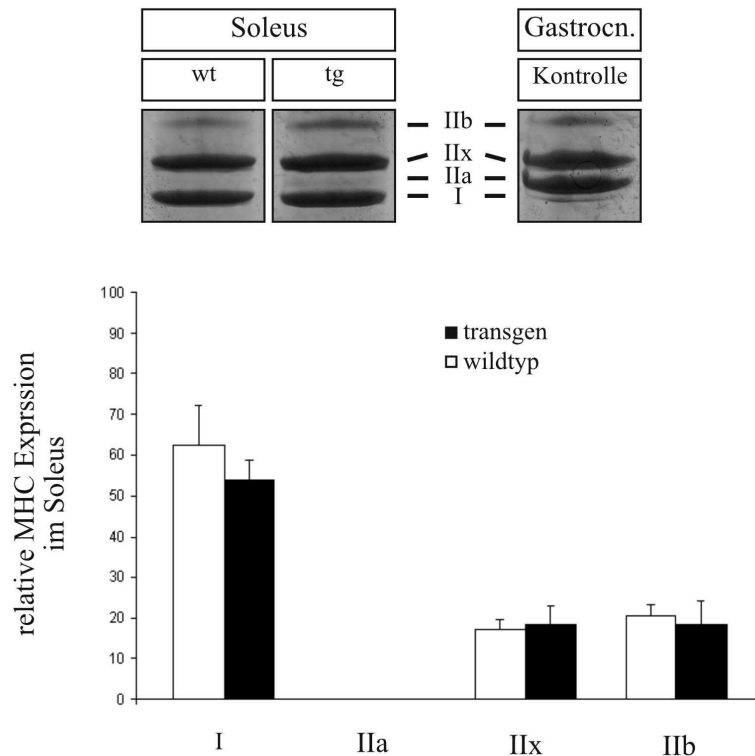


Abb.13.: Analyse zur MHC Isoformen Expression im Soleus Muskel.

Untersucht wurden Cx43 ektopisch exprimierende (tg) - und Wildtyp Muskeln (wt). (A) Representative Bilder einer elektrophoretischen Analyse der MHC Isoformen im Soleus, in dem die MHC I, IIx und IIb, jedoch nicht MHC IIa Isoformen exprimiert werden. MHC IIa wird nur in einer sehr geringen Menge und nicht quantifizierbar exprimiert. Ein Wildtyp Gastrocnemius Muskel diente als Standard. (B) Quantifizierung der elektrophoretischen Analyse. Die Untersuchungen zeigen keine signifikanten Unterschiede in der MHC Isoformen Expression in Cx43 ektopisch exprimierenden (tg) und Wildtyp (wt) Soleus Muskeln (*: $p > 0.05$; wt u. tg: $n=4$).

4.1.8 Kalzium Bildung an Cx43 ektopisch exprimierenden primären Skelettmuskelzellen

Cx43 ektopisch exprimierende Skelettmuskeln zeigten einen veränderten Kontraktionsphänotyp. Zudem konnte in Cx43 ektopisch exprimierenden EDL Muskeln eine veränderte Gentranskription (s.Abb. 12) festgestellt werden, die den Kontraktionsphänotyp (s.Abb. 11) erklären könnte. Veränderungen des Kontraktionsphänotyps sind Adaptionsmechanismen des Skelettmuskels. Diese Mechanismen umfassen unter anderem purinerge Signalwege die Kalzium vermittelt die Genexpression im Skelettmuskel regulieren (Valdes et al. 2008). Um die durch purinerge Signalwege hervorgerufenen Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ zu charakterisieren und damit den veränderten

Kontraktionsphänotyp mechanistisch erklären zu können, wurden Kalzium Messungen mittels eines ratiometrischen Farbstoffes (FURA2 AM) an Cx43 ektopisch exprimierenden primären Myotuben durchgeführt, die aus der Hinterbeinmuskulatur adulter Mäuse gewonnen wurden. Stimuliert wurde die $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung durch Applikation von ATP (100 μ M).

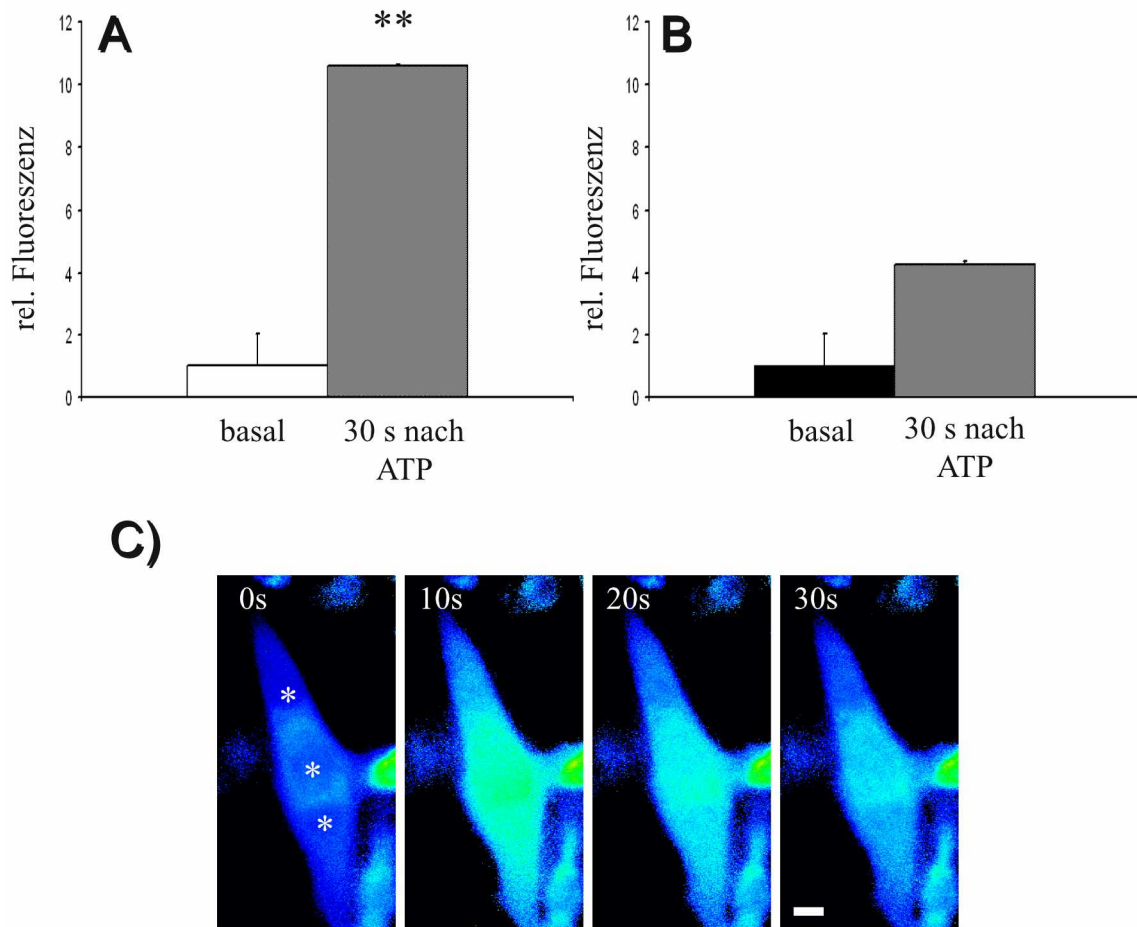


Abb.14.: Kalzium-Bildgebung an primären Skelettmuskelzellen nach ATP Stimulation.

Normierte relative $[Ca^{2+}]_i$ vor und 30 Sekunden nach ATP Stimulation. Vermessen wurden Wildtyp Myotuben (A; n=5) sowie Cx43 ektopisch exprimierende Myotuben (B; n=4). **: p<0,005. B) Representative Bilder der FURA 2AM Fluoreszenz einer primären Wildtyp Myotube nach Stimulation. *-Kerne. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Applikation von ATP führte sowohl in Wildtyp Myotuben als auch in Cx43 ektopisch exprimierenden Myotuben zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. In primären Wildtyp Myotuben war die $[Ca^{2+}]_i$ 30 Sekunden nach Stimulation noch hoch signifikant um das 11-fache gegenüber der basalen $[Ca^{2+}]_i$ erhöht (Abb.14 A). In primären Cx43 ektopisch exprimierenden Myotuben war 30 Sekunden nach Applikation von ATP die $[Ca^{2+}]_i$ lediglich um das 4-fache und statistisch nicht signifikant gegenüber der basalen $[Ca^{2+}]_i$ erhöht (Abb.14. B).

Die basale $[Ca^{2+}]_i$ war in Cx43 ektopisch exprimierenden Myotuben und Wildtyp Myotuben nicht signifikant unterschiedlich.

Die Experimente zeigten, dass die Kalzium Homöostase nach ATP Stimulation in Cx43 ektopisch exprimierenden Myotuben gegenüber Wildtyp Myotuben verändert war.

4.2 Die endogene Expression von Cx45 in adulter Skelettmuskulatur der Maus

Adulte Skelettmuskelfasern sind elektrisch isoliert und galten deshalb als eines der wenigen Gewebe, in denen keine Gap Junctions exprimiert werden (Gilula 1987).

In der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen durchgeführt worden, die die endogene Expression von Cx45 in adulten Skelettmuskeln der Maus beschreiben und im Folgenden vorgestellt werden.

4.2.1 Analysen an Cx45lacZ Reporter Mäusen zum Nachweis der Cx45 Promotoraktivität in Skelettmuskelfasern

Zur Untersuchung der Cx45 Expression in adulter Skelettmuskulatur wurden lacZ Färbungen an Querschnitten von Cx45lacZ Mäusen (Krüger et al. 2000) durchgeführt. In diesen Mäusen ist die kodierende Region von Cx45 durch ein kernständiges lacZ Reportergen ausgetauscht.

Die Analysen zeigten, dass lacZ positive Signale deutlich innerhalb adulter Skelettmuskelfasern nachweisbar waren und demnach der Cx45 Promotor in adulten Skelettmuskelfasern aktiv ist (s.Abb. 15). Die Signale lagen zumeist in der Peripherie der Fasern in Bereichen, in denen die Zellkerne in Skelettmuskelfasern lokalisiert sind.

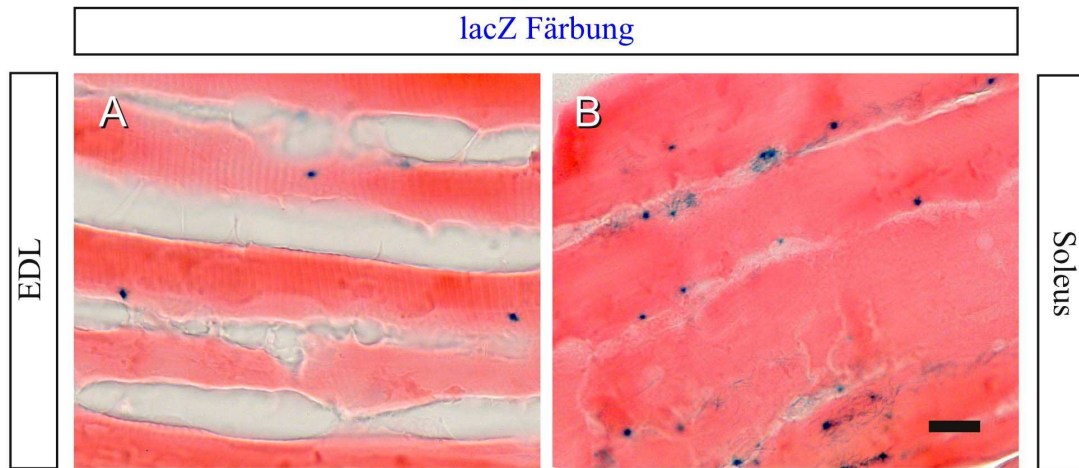


Abb.15.: LacZ Färbungen an Querschnitten adulter Skelettmuskulatur von Cx45lacZ Reportermäusen.

LacZ Signale waren deutlich innerhalb adulter Skelettmuskelfasern zu finden. Maßstabsbalken: 20 μm .

4.2.2 RT-PCR und Immunoblot Analysen an C₂C₁₂ Zellen

Die C₂C₁₂ Zelllinie ist eine Maus Myoblasten Zelllinie, die als Modell der Skelettmuskel-Differenzierung dient. *In vitro* können die Zellen zu kontraktile Myotuben differenziert werden. Um die Cx45 Expression in dieser Zelllinie zu untersuchen, wurden RT-PCR und Immunoblot Analysen zum Nachweis des Cx45 durchgeführt.

Da Cx45 in Gefäßen, die die Muskulatur durchziehen und versorgen, exprimiert wird, konnten durch die Analysen an C₂C₁₂ kontaminierende Effekte ausgeschlossen werden.

RT-PCR Analysen mittels Primern, die einen Teil der kodierenden Region von Cx45 flankieren, wiesen Cx45 Transkript in undifferenzierten und differenzierten C₂C₁₂ Zellen nach. Das Cx45 Signal in undifferenzierten C₂C₁₂ Zellen war dabei deutlich schwächer als das in differenzierten (s.Abb.16 A). Über eine β -Aktin RT-PCR konnten genomische Verunreinigungen der verwendeten cDNS ausgeschlossen werden.

Anschließend sollten Immunoblot-Analysen Cx45 auf Proteinebene in C₂C₁₂ Zellen nachweisen. Unter Verwendung von spezifischen Antikörpern (Maxeiner, Doktorarbeit 2004) waren Signale für Cx45 nur im Tibialis anterior und in differenzierten C₂C₁₂ Zellen nachweisbar. In undifferenzierten C₂C₁₂ Zellen wurden keine Cx45 Signale, auch nicht nach längerer Exposition, erkannt (s.Abb.16 B).

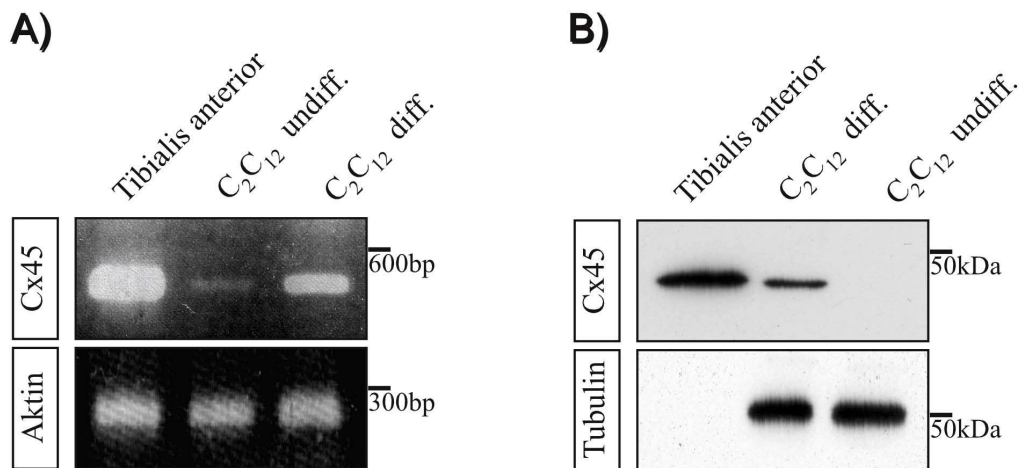


Abb.16.: RT-PCR (A) und Immunoblot (B) Analysen an adulter Skelettmuskulatur (Tibialis Anterior), undifferenzierten und differenzierenden C₂C₁₂ Zellen.

Zum Nachweis des Cx45 Transkripts wurden RT-PCR Analysen an cDNS von Skelettmuskeln und C₂C₁₂ Zellen durchgeführt. Verwendung fanden Primer, die einen Teil der kodierenden Region des Cx45 Gens flankieren und bei Anwesenheit der mRNS zu einem Amplikon von 450bp führten. Eine β -Aktin RT-PCR zeigte, dass die verwendete cDNS gespleißt (243 bp) und frei von genomischen Verunreinigungen war (330 bp). Die Immunoblot-Analysen wurden unter Verwendung von Cx45 Antikörpern durchgeführt. Der Tubulinabgleich zeigt, dass gleiche Mengen an Zelllysaten aufgetragen wurden. Die Signalstärke von Cx45 im Tibialis Anterior überstieg die von Tubulin um ein Vielfaches, sodass weniger Protein aufgetragen werden musste und deshalb kein Tubulin Signal im Tibialis Anterior Lysat sichtbar ist.

4.2.3 Immunfluoreszenz-Analysen an C₂C₁₂ Zellen

Immunfluoreszenz-Analysen mittels Cx45 Antikörpern zeigten Cx45 Signale in Myotuben und differenzierenden Myoblasten (Abb.17 C). Die Signale schienen dabei diffus im gesamten Cytoplasma verteilt und nicht an bestimmten Stellen der Plasmamembran angehäuft, wie es für Gap Junction Plaques typisch wäre. In undifferenzierten C₂C₁₂ Zellen dagegen konnten keine Cx45 Signale nachgewiesen werden (Abb.17 A).

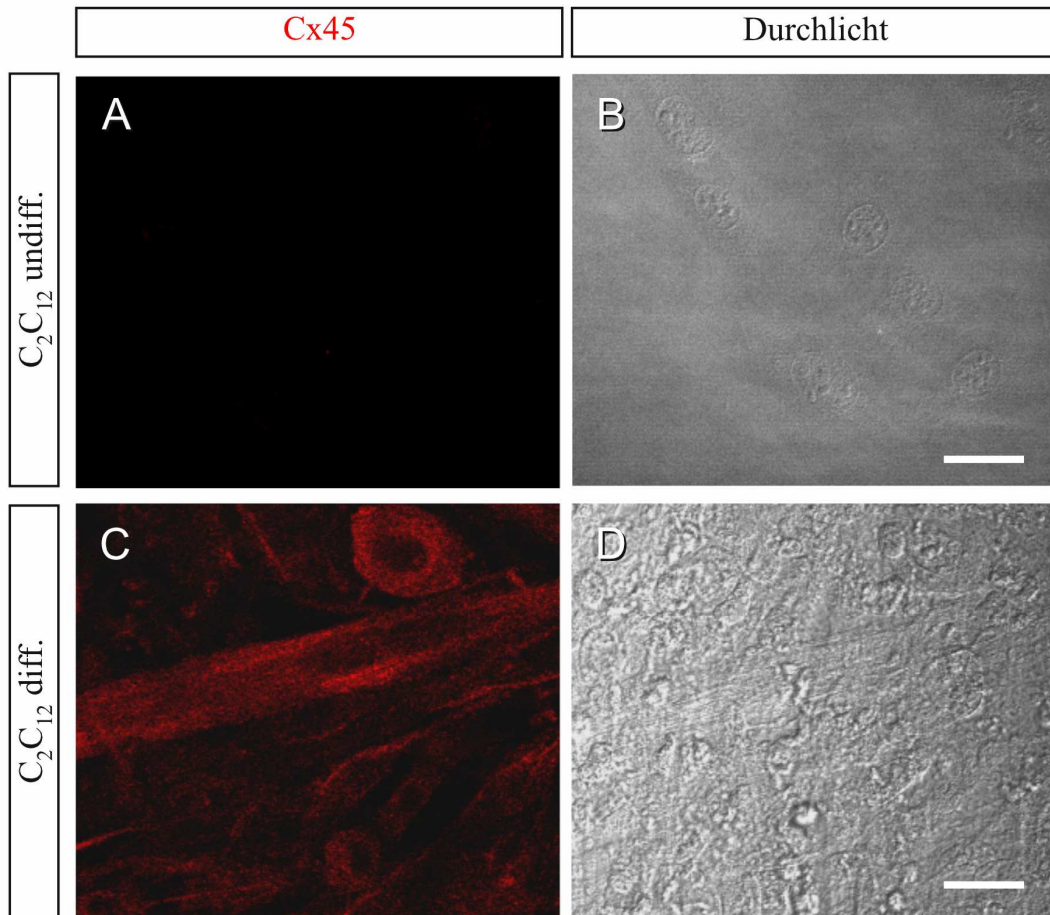


Abb.17.: Immunfluoreszenz-Analysen mittels Cx45 Antikörpern an undifferenzierten (A u. B) und differenzierenden C₂C₁₂ Zellen (C u. D).

Cx45 Signale konnten ausschließlich in differenzierenden Myoblasten bzw. Myotuben nachgewiesen werden (C). In B und D sind die Durchlichtaufnahmen der jeweiligen Fluoreszenzaufnahmen zu sehen. Maßstabsbalken: 20 μ m.

4.2.4 Immunfluoreszenz-Analysen zur Lokalisation von Cx45 in adulten Skelettmuskelfasern

Zur Bestimmung der genauen Lokalisation von Cx45 wurden Immunfluoreszenz-Analysen an Längsschnitten adulter Skelettmuskulatur durchgeführt und das Signalmuster mit dem bekannter Skelettmuskelproteine verglichen (Abb. 18). Untersucht wurden verschiedene Muskeln. Representativ sind in diesem und im Folgendem Abschnitt Präparate adulter Soleus Muskeln gezeigt.

Immunfluoreszenz-Analysen mittels Antikörpern gegen Cx45 zeigten ein Signalmuster, dass längs der Faserrichtung verlief (Abb18. A). Der Abstand von Bande zu Bande betrug ca. 1 μ m.

Signale, die unter Verwendung von Antikörpern gegen DHPR (Dihydropyridin-Rezeptor) nachgewiesen wurden, ließen auch Doppelbanden längs der Faserrichtung erkennen (Abb.18 B). Der Dihydropyridin-Rezeptor befindet sich in T-Tubuli Membranen, Einstülpungen der Plasmamembran in die Muskelfasern.

Auch die Verwendung von Antikörpern gegen den RyR (Ryanodin Rezeptor), einem Protein, das in terminalen Zisternen des Sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist, die T-Tubuli flankieren, führte zu Signalen quergestreifter Doppelbanden (s.Abb.18 C).

Das Signalmuster, das unter Verwendung von Antikörpern gegen SERCA (Sarko-Endoplasmatische Kalzium ATPase) nachgewiesen wurde, zeigte eine Querbandung, die jedoch nicht paarig angeordnet war (s. Abb.18 D). SERCA befindet sich im Sarkoplasmatischen Retikulum -ausgeschlossen sind hier die terminalen Zisternen- und pumpt unter ATP Verbrauch Ca^{2+} , das während einer Kontraktion ausgeschüttet wird, zurück ins Lumen des Sarkoplasmatischen Retikulums.

Aktinin ist in Z-Scheiben zu finden, die Sarkomere begrenzen. Signale, die unter Verwendung von Antikörpern gegen Aktinin nachgewiesen wurden, zeigten durchgehende und deutlich voneinander getrennte Querstreifen mit einem Abstand von ca. $2\mu\text{m}$ (s.Abb.18 E).

Das Durchlichtbild einer längsgeschnittenen Muskelfaser ließ das in der Literatur gut beschriebene quergestreifte Muster sich abwechselnder A- und I-Banden erkennen, die durch die verschiedenen Lichtbrechungsindizes in bestimmten Regionen des kontraktile Apparates entstehen (s.Abb.18 F).

Signale mittels Antikörpern gegen DHPR und RyR ähnelten denen die mittels Cx45 Antikörpern nachgewiesen wurden.

Immunfluoreszenz-Analysen an Kontrollpräparaten (hier wurde nur der jeweilige sekundäre Antikörper verwendet (s. Abschnitt 3.1.10 u. 3.1.11) ließen keine Signale in Skelettmuskelfasern erkennen (Daten nicht gezeigt).

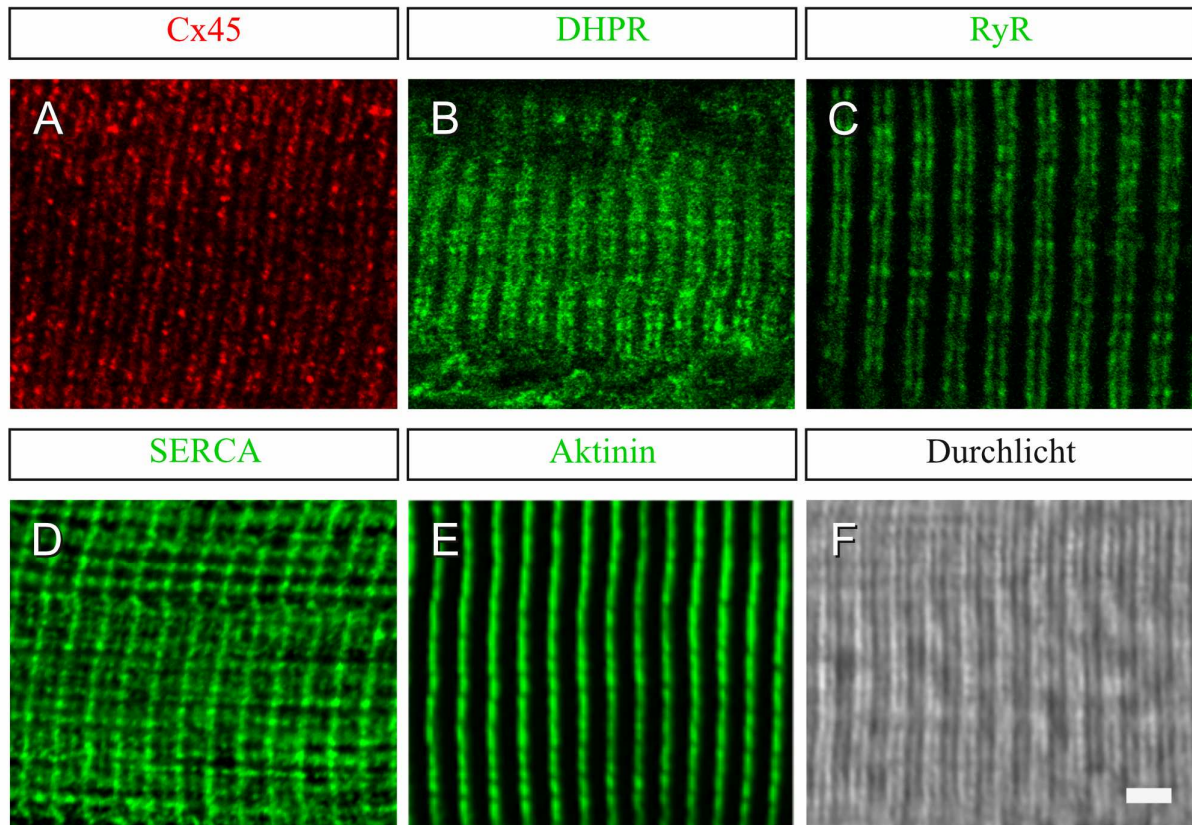


Abb.18.: Immunfluoreszenz-Analysens an Querschnitten adulter Soleus Skelettmuskulatur.

Verwendet wurden Antikörper gegen Cx45 (A), DHPR (B), RyR (C), SERCA (D) und Aktinin (E). Bild F zeigt eine Durchlichtaufnahme. Cx45 Signale und Signale der zwei Marker DHPR (B) und RyR (C) ähneln sich. Maßstabsalken: 2 μm .

4.2.5 KO-Immunfluoreszenz-Analysen mittels Antikörpern gegen Cx45 und DHPR

Ko-Immunfluoreszenz-Analysen mittels Cx45 und DHPR Antikörpern sollten die Lokalisation von Cx45 im adulten Sklettmuskel genauer zu bestimmen helfen. Cx45 Antikörper wurde bei diesen Analysen direkt an Alexa 594 gekoppelt, da beide Antikörper aus Kaninchen stammen. Sowohl Cx45 als auch DHPR zeigten quergestreifte Signale die überlappten (s.Abb 19). Dies deutet auf eine räumliche Nähe beider Proteine. Aufgrund der Fixierungsprotokolle konnten keine Ko-Immunfluoreszenz-Analysen mittels Cx45 und RyR durchgeführt werden.

Aufgrund der Präparatqualität und des schwachen Cx45 Signals konnten Doppelbanden nur undeutlich nachgewiesen werden (vgl. Abb. 18).

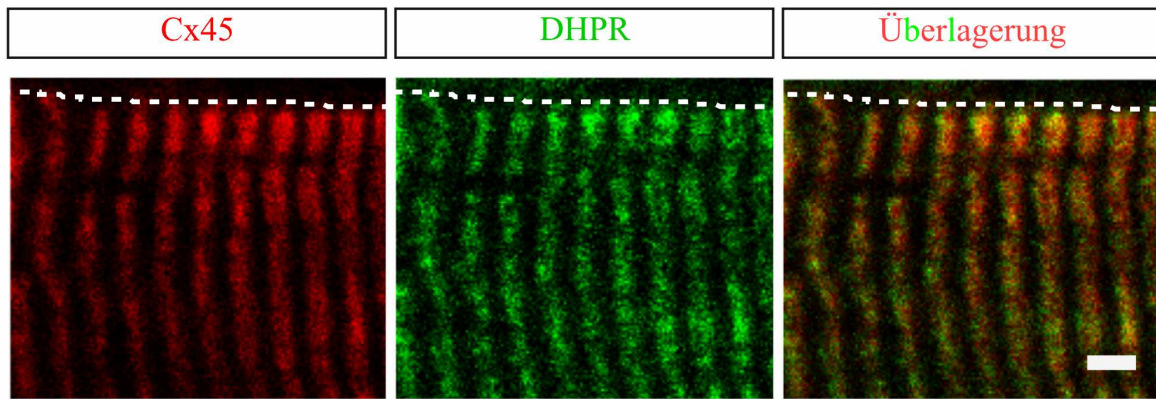


Abb.19.: KO-Immunfluoreszenz-Analysen an Querschnitten adulter Soleus Skelettmuskelfasern.

Verwendet wurden Antikörper gegen Cx45 und DHPR. Der Cx45 Antikörper wurde direkt an Alexa 594 gekoppelt. Dies führte zu einem relativ schwachen Cx45 Signal. Beide Signale überlappten. Weder Cx45- noch DHPR Signale waren in der Plasmamembran (gepunktete Linien) der Fasern zu finden. Aufgrund der Fixierungsprotokolle konnten keine Ko-Immunfluoreszenz-Analysen mittels Cx45 und RyR durchgeführt werden. Maßstabsbalken: 2 μ m.

4.2.6 Immunfluoreszenz-Analysen von Cx45 während der Myogenese

Zur Analyse der Cx45 Expression während der Myogenese wurden Immunfluoreszenzen an Kryoschnitten verschiedener embryonaler Stadien durchgeführt (s.Abb 20). Neben Antikörpern gegen Cx45 wurden My32 Antikörper verwendet. My32 Antikörper erkennen alle schnellen MHC Isoformen. Diese werden ab dem Stadium terminal differenzierender Myoblasten exprimiert (Constantin and Cronier 2000). So konnte überprüft werden, ob sich nachgewiesene Cx45 Signale im Bereich sich bildender bzw. bereits differenzierter Skelettmuskeln befanden.

Die Untersuchungen zeigten in allen My32 positiven Bereichen auch Cx45 Signale. Dieses Expressionsmuster war ausnahmslos in allen untersuchten embryonalen Stadien von ED11.5 (Daten nicht gezeigt) bis ED16.5 zu finden. Die Signale für Cx45 und My32 überlappten und waren im gesamten Cytoplasma verteilt (s.Abb. 20 A-F). Vergleichend wurden an Embryonen ED13.5 Immunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen Cx39 durchgeführt. Cx39 wird exklusiv während der Myogenese und der Skelettmuskel Regeneration exprimiert (von Maltzahn et al. 2004). Im Gegensatz zu den Cx45 Signalen waren die Signale für Cx39, wie für Gap Junctions typisch, punktiert (s. Abb 20 G-I).

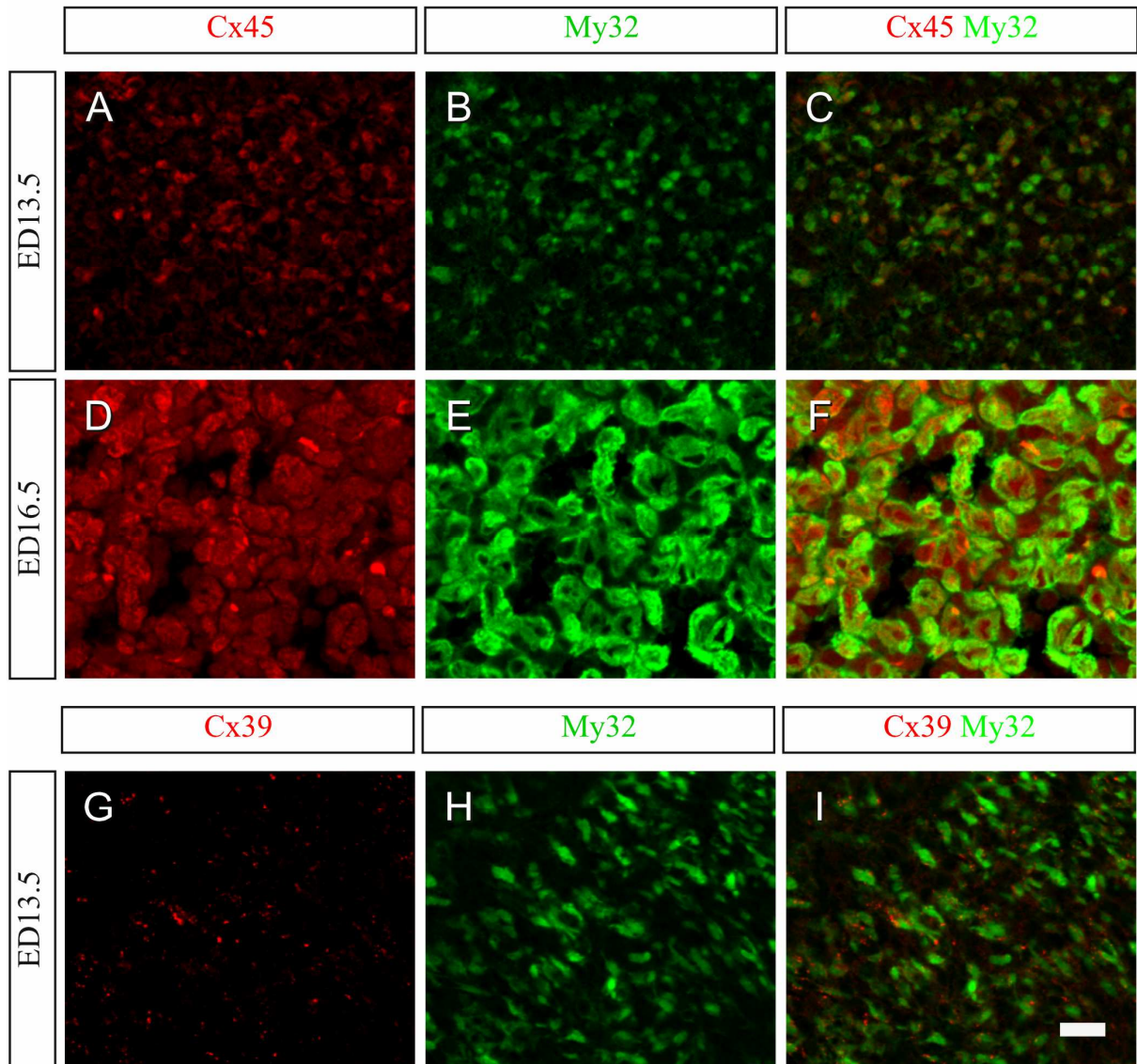


Abb.20: Immunfluoreszenz-Analysen an Kryoschnitten von Embryonen ED13.5 und ED16.5.

Verwendet wurden Antikörper gegen Cx45, Cx39 und My32. Cx45 konnte an ED13.5 und ED16.5 nachgewiesen werden (A, D). Diese Signale überlappten mit denen des Skelettmuskel Markers My32 (C, F). In G das Signalmuster von Cx39 an ED13.5. Maßstabsbalken: 20 µm.

4.3 Untersuchungen zur Myogenese an Cx39 und Cx43 doppelt defizienten Embryonen

Im Gegensatz zur adulten Skelettmuskulatur, in der bis dato keine Connexin Expression beschrieben wurde, werden während der Myogenese Cx43, Cx40 und Cx39 exprimiert (Trovato-Salinaro et al. 2009).

In Cx39 defizienten Mäusen ist die Myogenese und die Regeneration beschleunigt (Julia von Maltzahn, persönliche Mitteilung). Die Menge an Cx43 Protein ist während dieser Prozesse signifikant erhöht. Analysen an Cx39 und Cx43 defizienten Embryonen sollten klären, ob und in welcher Weise der Myogeneseprozess gestört ist und welche Rolle Cx39 und Cx43 in diesem Prozess einnehmen.

4.3.1 Immunfluoreszenz-Analysen an Cx39 und Cx43 doppelt defizienten Embryonen

MyoD und Myogenin sind Transkriptionsfaktoren, die eine zentrale Rolle während des Myogenese-Prozesses einnehmen. MyoD wird dabei in aktivierten Satellitenzellen (Myoblasten), Myogenin während der terminalen Differenzierung und Fusion der Myoblasten zu Myotuben exprimiert. Immunfluoreszenz-Analysen sollten Aufschluss über die Expression und Lokalisation dieser Transkriptionsfaktoren geben und somit aufzeigen, ob die Myogenese in Cx39/Cx43 doppelt defizienten Embryonen verändert war.

Die Analysen von Embryonen an ED13.5 (Abb.21 A-F) zeigten Signale für MyoD und Myogenin in dorsalen Kompartimenten. Beide Signale waren kernlokalisiert (Abb.20. C und F) und überlappten meist, wobei einige Kerne nur MyoD, andere nur Myogenin positiv waren (Abb.21. A-F). Es konnten keine deutlichen Unterschiede in Expression und Lokalisation von MyoD und Myogenin in Cx39/Cx43 defizienten- im Vergleich zu Cx39 defizienten Embryonen ED13.5 festgestellt werden.

Auch in Embryonen ED16.5 waren Signale für MyoD und Myogenin nachweisbar. Signale für MyoD waren kernlokalisiert (Abb.21 G-M). Auch die Analysen an Embryonen ED16.5 zeigten keine Unterschiede der MyoD/Myogenin Expression und Lokalisation in Cx39/Cx43 doppelt defizienten- im Vergleich zu Cx39 einfach defizienten Embryonen.

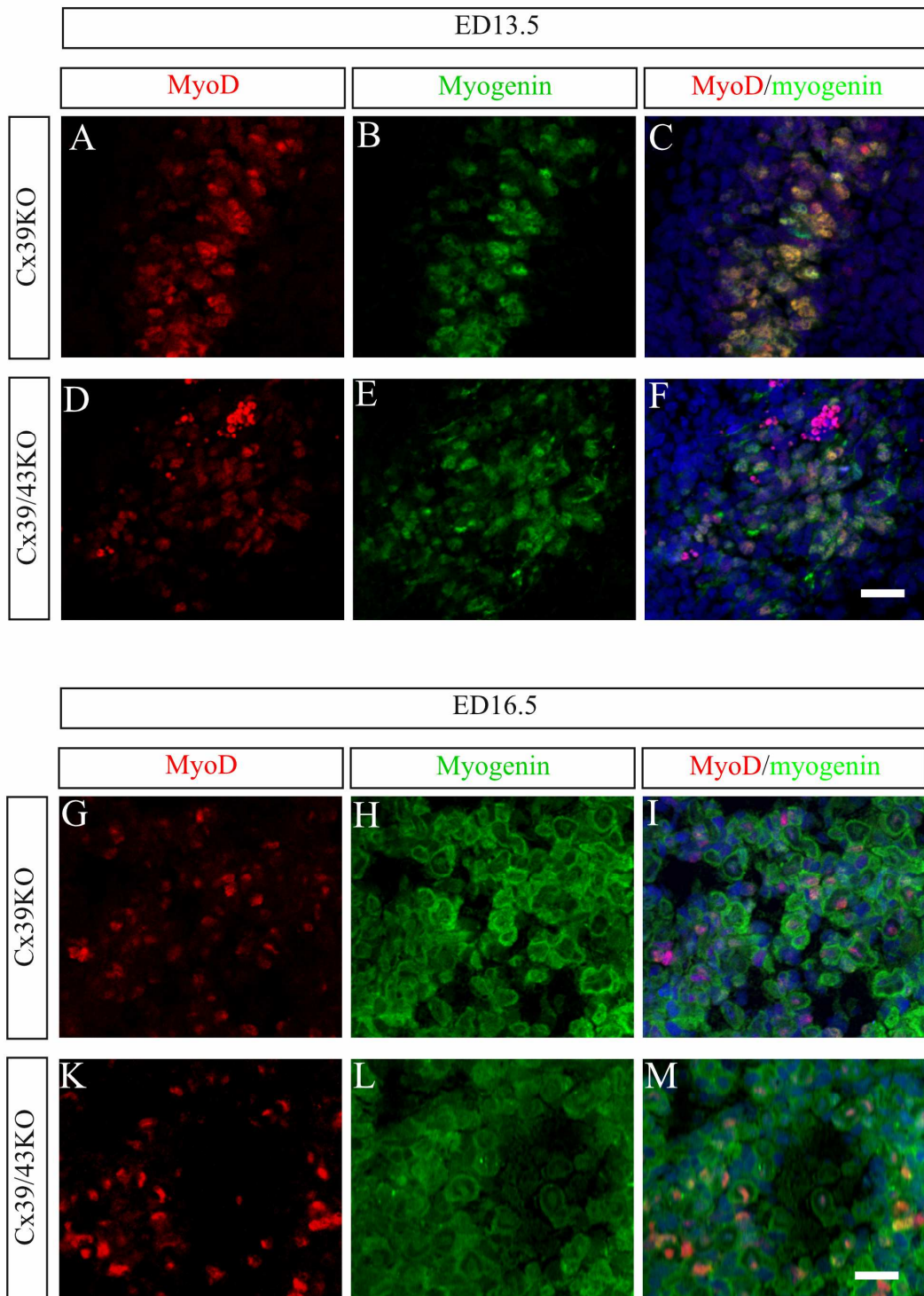


Abb.21.: Immunfluoreszenz-Analysens an Embryonen ED13.5 und ED 16.5.

Verwendung fanden Antikörper gegen MyoD und Myogenin. Die Aufnahmen an Embryonen ED13.5 zeigen dorso-rostralen Bereiche, an ED16.5 Bereiche der Intercostalmuskulatur. In C, F, I und M sind die Zellkerne mittels SYTO blau gefärbt. Maßstabsbalken: 20 µm.

4.3.2 HE-Färbungen und Gesamtansichten an Cx39 und Cx39/Cx43 doppelt defizienten Embryonen

HE-Färbungen an Cx39 und Cx39/Cx43 doppelt defizienten Embryonen ED16.5 sollten der histologischen Untersuchung des Myogeneseprozesses dienen.

Die Aufnahmen, in Bereichen der Körperwand-Muskulatur, zeigten Zellen mit hohem Durchmesser (20 μm), zentral gelegenem Kern und einem großen Kern/Cytoplasma Verhältnis (Abb.22 A u. B). Angeordnet zu Grüppchen wurden diese Zellen von kleineren Zellen umschmiegt. Es konnten keine Unterschiede in Cx39 und Cx39/Cx43 defizienten Embryonen an ED16.5 festgestellt werden. Gesamtansichten der Embryonen zeigten keine augenscheinlichen Unterschiede zwischen den beiden Genotypen, die beide bewegungsfähig waren (Abb. 22 C u. D).

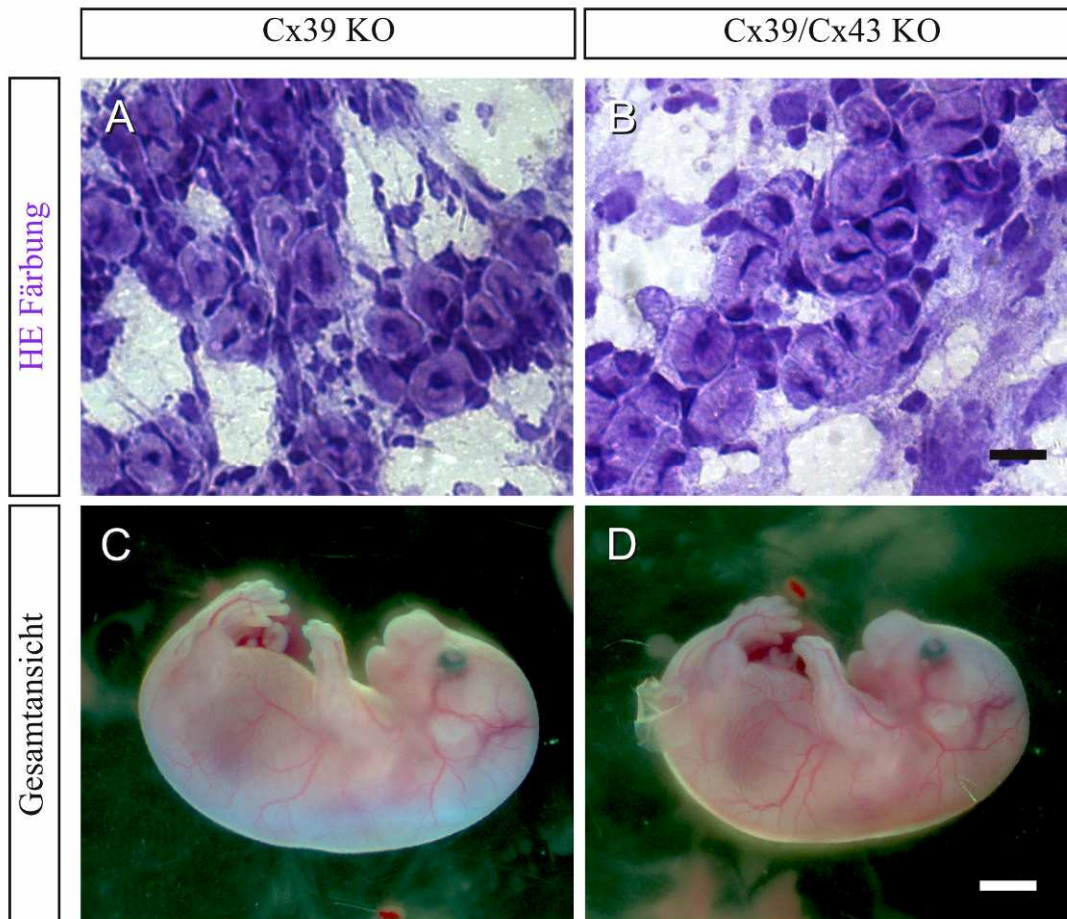


Abb.22.: HE-Färbungen an Schnitten (A,B) und Gesamtansichten (C, D) von Cx39 (A, C) und Cx39/Cx43 (B, D) defizienten Embryonen ED16.5.

Die Aufnahmen der HE gefärbten Schnitte stammen aus Bereichen der Körperwand-Muskulatur. Maßstabsbalken in A und B: 20 μm ; C-D: 1 mm.

5 Diskussion

5.1 Die ektopische Expression von Cx43 im adulten Skelettmuskel

Ein zentraler Bestandteil der einwandfreien Funktion eines Muskels ist die elektrische Isolation der einzelnen Skelettmuskelfasern (Dennis et al. 1981). Connexine, bzw. Gap Junctions koppeln Zellen metabolisch und elektrisch untereinander und so galt der adulte Skelettmuskel als eines der wenigen Gewebe, welches keine Connexine exprimiert (Gilula 1987).

Um die Bedeutung der elektrischen Isolation innerhalb der Muskelphysiologie zu studieren, sollte die elektrische Isolation über die ektopische Expression des Connexin43 in adulten Skelettmuskelfasern aufgehoben werden.

5.1.1 Das Transgene System zur ektopischen Expression von Cx43 im Skelettmuskel

Verpaarung der Cx43tetOeGFP Mauslinie (Döring, Doktorarbeit, 2005) mit der MCKtTA Mauslinie (Ahmad et al. 2000) führte zur skelettmuskelspezifischen Expression von Cx43. Die Mäuse zeigten keinen augenscheinlichen Phänotyp. Im Laufe der Arbeit wurde jedoch beobachtet, dass das MCKtTA Promoterkonstrukt äußerst heterogen aktiv war. Die Expression von Cx43 und eGFP unterschied sich stets von Individuum zu Individuum unabhängig vom Verwandtschaftsgrad der Tiere. Ob diese, auch von Ahmad et al. (2000) beobachtete Mosaikexpression auf den Integrationsort der Transgenen Konstrukte (Phelps et al. 1994) oder auf die Verwendung eines bicistronischen Transgens per se zurück zu führen ist (Furth et al. 1994), bleibt spekulativ. Nichts desto trotz führte das heterogene Expressionsmuster zu hohen statistischen Schwankungen der Experimente, die die Interpretation der Ergebnisse erschwerten.

5.1.2 Die Lokalisation von ekto­pisch exprimiertem Cx43 im Skelettmuskel

Immunfluoreszenz-Analysen mittels Cx43 Antikörpern wiesen ekto­pisch exprimiertes Cx43 in der Plasmamembran adulter Skelettmuskelfasern nach (s. Abb. 7). Die Signale zeigten in der Plasmamembran keine punktuellen Anhäufungen, wie es für Gap Junctions typisch ist, sondern waren relativ homogen über die gesamte Plasmamembran verteilt.

Das homogene Cx43 Signalmuster in der Plasmamembran könnte Hinweise auf die Funktion von Cx43 als Halbkanal geben. Abseits dieser Spekulation schloss das Signalmuster nicht die Ausbildung von Gap Junctions aus. Mikroinjektion von Farbstoffen, die Gap Junction Kanäle passieren können, zeigten jedoch keine Diffusion in benachbarte Fasern, sodass eine metabolische Gap Junction Kopplung über ekto­pisch exprimiertes Cx43 in Skelettmuskelfasern ausgeschlossen werden konnte (s. Abb. 9). Elektrische Gap Junction Kopplung konnte über diese Methode nicht ausgeschlossen. Eine Gap Junction Kopplung in adulten Skelettmuskelfasern –elektrisch und metabolisch– ist jedoch aus folgenden Gründen unwahrscheinlich. 1. Jede Muskelfaser ist von einer Basalmembran (Endomysium) umgeben, die eine physische Barriere zwischen den Fasern bildet. 2. Kopplung der Fasern würde eine distinkte Rekrutierung von motorischen Einheiten verhindern, da sich depolarisierende Ströme auf benachbarte Fasern oder sogar den gesamten Muskel ausbreiten könnten. 3. Kontraktion der Fasern führt zur Stauchung der Membran, die Gap Junction Plaques wahrscheinlich aufbrechen würden.

Vereinzelt und unregelmäßig waren zudem Cx43 Signale innerhalb der Muskelfasern nachweisbar. Dies könnte auf die Lokalisation von Cx43 in intrazellulären Vesikeln deuten. Ausgeschlossen werden kann zudem nicht, dass sich ein kleiner Teil des ekto­pisch exprimierten Cx43 Proteins in T-Tubuli oder Membranen des Sarkoplasmatischen Retikulums befand. Der Großteil der Signale waren jedoch, wie erwähnt, in der Plasmamembran zu finden, sodass der Phänotyp wahrscheinlich auf diese Cx43 „Population“ zurückzuführen ist.

5.1.3 Cx43 ektopisch im Skelettmuskel exprimiert zeigt ungewöhnliche Eigenschaften

Da Gap Junction Kopplung in Cx43 ektopisch exprimierenden Skelettmuskeln nicht nachgewiesen werden konnte, wurden weitere Untersuchungen zur Funktionalität von Cx43 durchgeführt.

ATP Freisetzungstudien sollten dem Nachweis von Cx43 Halbkanälen dienen. Die Untersuchungen zeigten eine signifikant erhöhte ATP Ausschüttung in Cx43 ektopisch exprimierenden Muskeln im Vergleich zu Wildtyp Muskeln. Die von Applikation von FFA (flufenamic acid), einem Halbkanal Blocker, verminderte die ATP Ausschüttung sowohl von Cx43 ektopisch exprimierenden Muskeln als auch von Wildtyp Muskeln signifikant. Die Analysen deuteten zum einen auf eine Halbkanalaktivität von Cx43 zum anderen konnten endogene ATP permeable Kanäle in adulten Skelettmuskelfasern nachgewiesen werden.

Immunoblot Studien zeigten des Weiteren, dass Cx43 nur bis zur P1 Stufe phosphoryliert wurde.

Dieses Phosphorylierungsmuster im Zusammenhang mit erhöhter ATP Ausschüttung wurde bereits in einer Studie von Dobrowolski et al. (2007) beschrieben. Die Autoren untersuchten vier Cx43 Mutationen, die bei Patienten mit dem Phänotyp von ODDD (Occludentodigitale Dysplasie) assoziiert sind und zu deutlichen Veränderungen in den Eigenschaften von Cx43 führten. Eine der untersuchten Mutationen, die Austauschmutation G138R in der cytoplasmatischen Schleife von Cx43 gelegen, führte dabei zu Eigenschaften, ähnlich denen, die für ektopisch exprimiertes Cx43 im Skelettmuskel in dieser Arbeit beschrieben wurden. Cx43G138R transfiziert in HeLa Zellen wurde zur Membran transportiert, zeigte jedoch nicht das typische Plaquemuster, sondern war über große Bereiche der Membran verteilt (vgl. 1.2.2). Das mutierte Protein bildete keine funktionalen Gap Junction aus, zeigte jedoch eine erhöhte ATP Ausschüttung, und damit erhöhte Halbkanalaktivität. Immunoblot Untersuchungen ließen zudem nur die Phosphorylierung von Cx43G138R bis zur P1 Stufe erkennen.

Die Autoren vermuteten, dass die in der cytoplasmatischen Schleife gelegene Mutation zur verstärkten Bindung der cytoplasmatischen Schleife an den C-Terminus von Cx43 führt. Diese Bindung, so die Autoren, verschließe zum einen die Gap Junction Pore, zum anderen maskiere die Bindung Phosphorylierungsstellen von Kinasen. Dies erkläre das im

Immunblot nachgewiesene Phosphorylierungsmuster von Cx43G138R. Die Phosphorylierung moduliert ihrerseits die Permeabilität und den Öffnungszustand von Cx43 Halbkanälen (Saez et al. 2005; Bao et al. 2007).

Cx43 ektopisch im Skelettmuskel exprimiert ist nicht mutiert (d.h. Wildtyp). Studien Cx43 überexprimierender primärer Myoblasten zeigten zudem, dass Cx43 Gap Junctions ausbilden kann (Roell et al. 2007; Phillip Sasse, persönliche Mitteilung). Deshalb ist es erstaunlich, dass Wildtyp Cx43 im Skelettmuskel exprimiert ähnliche Eigenschaften wie mutiertes Cx43 aufweist. Diese können im Wildtyp Connexin nicht durch Konformationsänderungen erklärt werden und müssen demnach in der Unmöglichkeit des Wildtyp- und des mutierten Connexins Gap Junctions auszubilden (die ja beiden gemein ist) zu finden sein. Wie die Studie von Dobrowolski et al. (2007) anführte, ist weder Überexpression noch verlängerte Halbwertszeit der mutierten Cx43 Proteine eine Erklärung für die beobachteten Eigenschaften.

Untersuchungen mittels phosphospezifischen Antikörpern zeigten, dass Cx43 zur P1 Stufe phosphoryliert ausschließlich in der Plasmamembran und in geringem Maße in Gap Junctions Plaques zu finden ist, Cx43 zur P2 Stufe phosphoryliert hingegen ausschließlich in Gap Junction Plaques (Lampe et al. 2006). Mit folgender These soll die erhöhte Halbkanalaktivität, das spezielle Phosphorylierungsmuster und das Fehlen von Gap Junction Kopplung von Cx43 ektopisch exprimiert im Skelettmuskel erklärt werden. Die Ausbildung funktionaler Gap Junction Kopplung könnte zur P2 Phosphorylierung von Cx43 führen. Wird eine funktionale Gap Junction Kopplung aufgrund struktureller oder physischer Unwägbarkeiten verhindert, so bleibt das Signal zur P2 Phosphorylierung aus. Cx43, zur P1 Stufe phosphoryliert, häuft sich in der Membran an. Zum einen bilden sich deshalb keine typischen Anhäufungen in der Plasmamembran. Zum anderen könnte sich, durch die Akkumulation von Cx43 (in diesem Fall zur P1 Stufe phosphoryliert) in der Plasmamembran, die Öffnungswahrscheinlichkeit von Halbkanälen erhöhen, wie von Verselis and Bukauskas (2002) vorgeschlagen wurde.

5.1.4 Bildet Cx43 funktionale Halbkanäle?

Ausbildung funktionaler Gap Junctions durch ektopisch exprimiertes Cx43 scheint im Skelettmuskel nicht möglich. Eine Basalmembran, die jede Faser umgibt und isoliert, verhindert die Paarung zweier Connexone in gegenüber liegenden Membranen. Diese und

die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Eigenschaften lassen die Funktion von Cx43 als Halbkanal zwingend in Erscheinung treten.

Doch wie bereits erwähnt, wird die Öffnung von Connexin Halbkanälen angezweifelt. Ihre Aktivität kann zu makromolekularen Strömen führen, die die Integrität der Zelle zerstören (Paul et al. 1991). Des Weiteren sind die beschriebenen Öffnungsstimuli zum direkten *in vitro* Nachweis von Connexin Halbkanälen, der Entzug extrazellulären Kalziums und/oder eine starke Depolarisation der Membran, nur unter bestimmten Bedingungen *in vivo* vorhanden (Bennett et al. 2003; Goodenough and Paul 2003). So liegt die physiologische extrazelluläre Kalziumkonzentration in millimolaren Bereichen (~1,5mM). Depolarisation der Membran findet nur in wenigen elektrisch erregbaren Geweben statt. Darunter fällt jedoch u.a. der Skelettmuskel.

Die Eigenschaften von Cx43 Halbkanälen sind in einer Studie von Contreras et al. (2003) in transfizierten HeLa untersucht und beschrieben worden. Cx43 Halbkanäle sind bei Ruhemembranpotential (-14mV) und physiologischen extrazellulären $[Ca^{2+}]$ (1,8mM) geschlossen. Sie öffneten jedoch während starker Depolarisation der Membran um +60mV. Ein Aktionspotential im Skelettmuskel führt zur Depolarisation der Membran um 100mV auf bis zu +30mV (Bagshaw 1993). Das Spitzenpotential von +30mV liegt zwar unter dem Wert, der zur Öffnung von Cx43 Halbkanälen in der Studie von Contreras et al. (2003) beschrieben wurde, dennoch könnte addierend die Deformation der Membran während einer Kontraktion mechanisch die Öffnung von Cx43 stimulieren (Goodenough and Paul 2003). Zudem ist Cx43 in einer Weise phosphoryliert, die per se eine Aktivität von Halbkanälen fördert (s.Kapitel 5.1.4). Zwar wurde auch in dieser Arbeit die Halbkanalaktivität von Cx43 im Skelettmuskel nur indirekt und durch die Reduktion extrazellulären Kalziums, d.h. in nicht physiologischer Umgebung, stimuliert, dennoch trifft ektopisch exprimiertes Cx43 im Skelettmuskel auf Bedingungen, die –zumindest theoretisch- eine Öffnung von Halbkanälen begünstigen.

Könnte die Öffnung der Halbkanäle die Zellintegrität zerstören? Cx43 Halbkanäle können zwei Öffnungszustände ausbilden; im weit geöffneten Zustand beträgt die Leitfähigkeit 220pS, im weniger geöffneten 75pS (Contreras et al. 2003). Die Autoren wiesen nach, dass Cx43 Halbkanäle häufiger im weniger geöffneten Zustand aktiv waren, was die Diffusionsmenge von Molekülen durch die Kanäle begrenzt und dadurch eine Öffnung weniger zerstörerisch für die Zelle sein könnte. Auch unstimuliert zeigten Cx43 HeLa Zellen Farbstoffaufnahme, die ein Hinweis auf unregelmäßige und kurze Öffnung der

Kanäle unter Ruhebedingungen (Ruhemembranpotential, 1,8mM extrazelluläre $[Ca^{2+}]$) geben könnte. Contreras et al. (2003) gelang es jedoch nicht, diese zufälligen Öffnungen elektrophysiologisch nachzuweisen, d.h. die Öffnung von Cx43 Halbkanälen sollte auch unter Ruhebedingungen erfolgen, jedoch äußerst selten oder sehr kurz. Abschließend bleibt anzumerken, dass die erhöhte ATP Ausschüttung von Cx43 ectopisch exprimierenden Skelettmuskeln durch Applikation eines in der Literatur verwandten Halbkanalblockers FFA signifikant vermindert werden konnte. Auch dies spricht dafür, dass die beobachteten Effekte Cx43 Halbkanälen zu zuschreiben sind und nicht etwa vesikulären oder apoptotischen Mechanismen der ATP Freisetzung geschuldet sind.

5.1.5 Cx43 ectopisch im Skelettmuskel exprimiert verändert die Kontraktionseigenschaften des Muskels

Cx43 überexprimierende Skelettmuskeln zeigten veränderte Kontraktionscharakteristika. Bei bestimmten Stimulationsfrequenzen entwickelten sie mehr Kraft im Vergleich zu Wildtyp Muskeln. Dieser Umstand spiegelte sich in einer Linksverschiebung der jeweiligen Kraft-Frequenzkurve wieder. Untersuchungen der MHC Zusammensetzung, welche die Kontraktionseigenschaften eines Muskels bestimmen (Pette and Staron 2000), zeigten, dass in Cx43 ectopisch exprimierenden EDL Muskeln die Expression der MHCIIb Isoform signifikant erhöht war. Cx43 ectopisch exprimierende Soleus Muskeln zeigten keine Veränderungen der MHC Zusammensetzung.

MHCIIb ist die langsamste der schnellen MHC Isoformen. Langsame MHC Isoformen (MHCI, MHCIIb) besitzen langsame ATP Umsatzraten an ihren Myosinköpfen. Dies führt zu relativ langen Einzelkontraktionen, die schneller verschmelzen und so schneller (unvollständige) Tetani ausbilden (Krutki et al. 2008). D.h. bei gegebenen (supramaximalen) Stimulationsfrequenzen entwickeln Fasern, die langsamere MHC Isoformen exprimieren, mehr Kraft als solche, die schnellere Isoformen exprimieren. Dies führt zur Linksverschiebung der Kraft Frequenzkurve (Tang et al. 2004). Die verstärkte Expression der langsamen MHCIIb Isoform in Cx43 ectopisch exprimierenden EDL Muskeln könnte demnach die veränderten Kontraktionscharakteristika (die Linksverschiebung der Kraft-Frequenzkurve) erklären.

In Soleus Muskeln waren hingegen keine Veränderung der MHC Expression nachweisbar. Wie ist das erklärbar? Veränderungen der Kontraktionscharakteristika eines Muskels

stellen Anpassungsmechanismen an veränderte Bedingungen. (physiologisch oder ektopisch). Diese Mechanismen sind vielfältig und unterscheiden sich je nach Muskeltyp (Tang et al. 2004).

Der EDL Muskel passt sich den durch die ektopische Cx43 Expression hervorgerufenen Veränderungen durch verstärkte Expression der langsamen MHCIIb Isoform an. Der Soleus Muskel exprimiert jedoch schon stark langsame MHC Isoformen, sodass dieser Anpassungsmechanismus schon ausgeschöpft sein könnte und andere Mechanismen greifen mögen. Johansson et al. (2003) beobachteten in Thyroidhormonrezeptor1 α/β defizienten Mäusen eine Linksverschiebung der Kraft-Frequenzkurve im Soleus Muskel (nicht jedoch im EDL), die begleitet war von einer erhöhten Expression der SERCA2a. Da die SERCA2a Kalzium langsamer in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulum pumpt, bleibt die $[Ca^{2+}]_i$ länger erhöht. Dies verlängert das Zeitfenster der Aktin/Myosin Querbrückeninteraktion, was die Kontraktionsdauer verlängert (Fitts et al. 1980). Dieser oder ähnliche Mechanismen könnten in Cx43 ektopisch exprimierenden Soleus Muskeln Linksverschiebung der Kraft-Frequenzkurve geführt haben.

5.1.6 Die intrazelluläre Kalziumkonzentration reguliert die Gentranskription im Skelettmuskel

Buvinic et al. (2009) zeigten *in vitro*, dass Myotuben nach elektrischer Stimulation ATP freisetzen und dies, vermittelt über purinerge Rezeptoren, zu einer lang anhaltenden $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung führte. Diese lang anhaltenden Kalziumsignale sind wahrscheinlich an der Genregulation im Muskel beteiligt.

Um den veränderten Phänotyp Cx43 ektopisch exprimierender Skelettmuskeln mechanistisch erklären zu können, wurden intrazelluläre Kalziumtransienten nach ATP Applikation vermessen. Die Versuche zeigten, dass in Cx43 ektopisch exprimierenden Myotuben nach ATP Applikation die $[Ca^{2+}]_i$ nach 30 Sekunden nicht signifikant und nur noch um das 4-fache gegenüber der unstimulierten $[Ca^{2+}]_i$ erhöht war. Im Gegensatz zu Wildtyp Myotuben, deren $[Ca^{2+}]_i$ 30 Sekunden nach ATP Applikation noch hoch signifikant um das 10-fache des Ruhewertes erhöht blieb.

Wie oben erwähnt, ist intrazelluläres Kalzium als sekundärer Botenstoff letztlich beteiligt an der Genregulation im Skelettmuskel (Valdes et al. 2008). Die Veränderungen der Kalzium Transienten in Cx43 ektopisch exprimierenden Myotuben könnten demnach eine

Erklärung für den Kontraktionsphänotyp liefern. So könnte im EDL die veränderte $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation zu Veränderungen in Kalzium vermittelten Signalwegen und letztlich zur verstärkten Expression der MHCIIb Isoform führen. Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, sind im Soleus Muskel wahrscheinlich andere Proteine, die am kontraktile Prozess teilnehmen, durch die veränderten Kalzium transient beeinflusst.

Die veränderte $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung nach Stimulation in Cx43 ektopisch exprimierenden Myotuben könnte auf eine Desensitivierung purinerge Rezeptoren zurückzuführen sein (Vassort 2001). Die ektopische Expression von Cx43 und dessen Halbkanalaktivität im Skelettmuskel könnte zu einem ATP Leck führen. Durch die Bindung von ATP an P2R desensitiviert der/die Rezeptor/en, sodass auf einen physiologischen Stimuli freigesetztes ATP zwar an P2R bindet, die Rezeptoren aber nicht mehr vollständig aktiviert. Dies wiederum führt zu Veränderungen in den purinerg vermittelten Signalwegen, die u.a. die Genregulation im Skelettmuskel steuern (s. Abb. 23; Im Unterschied zu Cx45 oder Pannexin1 ist Cx43 in der Plasmamembran lokalisiert).

5.2 Die endogene Expression von Connexin45 in adulten Skelettmuskelfasern

Die elektrische Isolation der Muskelfaser ist von zentraler Bedeutung für die distinkte Rekrutierung einzelner motorischer Einheiten und damit für die einwandfreie Funktion des Muskels. Da Connexine Zellen elektrisch koppeln, ist es keinesfalls verwunderlich, dass bis zu diesem Zeitpunkt keine Expression von Connexinen in der adulten Skelettmuskulatur beschrieben ist (Gilula 1987).

In dieser Arbeit konnte jedoch erstmalig die endogene Expression eines Connexins, des Connexins45, in adulten Skelettmuskelfasern nachgewiesen und beschrieben werden. Untersuchungen an Cx45lacZ Mäusen zeigten LacZ positive Signale innerhalb adulter Skelettmuskelfasern und wiesen somit eine Cx45 Promoteraktivität in Muskelfasern nach. Immunfluoreszenz-Analysen mittels Cx45 Antikörpern zeigten Signale, die in Doppelbanden angeordnet waren und quer zur Faserrichtung lagen. RT-PCR, IF und IB-Analysen an C₂C₁₂ Zellen bestätigen die endogene Expression von Cx45 in adulten Skelettmuskeln.

Zudem wurde Cx45 mittels Immunfluoreszenzanalysen embryonal, während der Skelettmuskelentwicklung ab ED 11.5 bis ED 16.5 nachgewiesen.

5.2.1 Die Lokalisation von Connexin45

Immunfluoreszenz-Analysen mittels Cx45 Antikörpern ließen ein für Connexine völlig untypisches Signalmuster erkennen. Die Cx45 Signale waren nicht etwa in der Plasmamembran zu finden, wie für ektopisch exprimiertes Cx43 gezeigt, sondern innerhalb der Faser lokalisiert. Dies könnte auf ein Sortierungssignal in der Gjc1 (Cx45) Sequenz deuten, welches Cx45 zu T-Tubuli- und/oder zu Membranen der terminalen Zisternen leitet (Flucher et al. 2000). Dieses Signal ist jedoch wahrscheinlich nicht in der Gja1 (Cx43) Sequenz vorhanden, sodass das Cx43 ektopisch im Muskel exprimiert, wie für Connexine typisch, zur Plasmamembran transportiert wird.

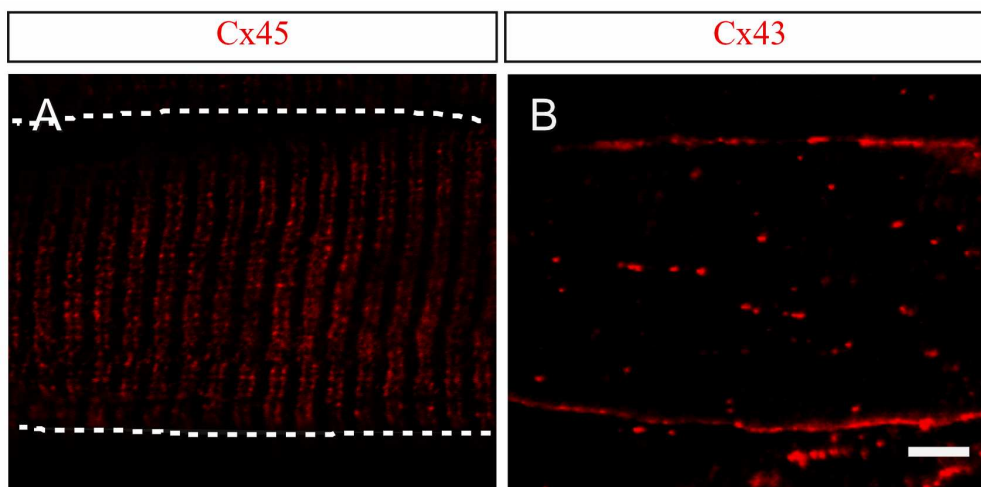


Abb. 23: Immunfluoreszenz-Analysen an Kryo-Längsschnitten adulter Soleus Skelettmuskelfasern.

Verwendet wurden Antikörper gegen Cx45 (A) und Cx43 (B). Cx45 Signale sind innerhalb der Faser und nicht in Bereichen der Plasmamembran zu finden (A, gestrichelte Linie). Cx43 ektopisch exprimiert in adulten Skelettmuskelfaser ist vornehmlich in Bereichen der Plasmamembran zu finden. Innerhalb der Fasern waren auch Cx43 Signale nachweisbar, welche auf Cx43 in intrazellulären Kompartimenten zurückgeführt werden könnten. Maßstabsbalken: 6 μ m.

Cx45 Signale in der Muskelfaser zeigten Doppelbänder, die sich, quer zur Faserrichtung liegend, durch den gesamten Faserquerschnitt zogen. Dieses Doppelbandenmuster erinnerte an die Muster, welche unter Verwendung von Antikörpern gegen DHPR und RyR nachgewiesen wurden. DHPR ist in T-Tubuli Membranen, RyR in terminalen Zisternen lokalisiert. So lag die Vermutung nahe, dass Cx45 in einer der beiden Membranen zu finden ist. Tatsächlich zeigten Ko-Immunfluoreszenz Untersuchungen unter Verwendung von Cx45 und DHPR Antikörpern eine deutliche Überlappung beider

Signale und erhärteten diese Vermutung. Die Immunfluoreszenz-Analysen mittels Cx45 Antikörpern legten folglich nahe, dass Cx45 in T-Tubuli Membranen und/oder in Membranen der terminalen Zisternen lokalisiert ist.

Der Abstand der terminalen Zisternen zur T-Tubuli Membran beträgt etwa 15nm (Franzini-Armstrong 1975). Die maximale Auflösungsgrenze konfokaler Lasermikroskope beträgt etwa 100nm (zeiss.de) und ist demnach zu niedrig, um Triadenstrukturen aufzulösen. So bleibt es trotz der Ko-Lokalisationsdaten ungewiss, ob sich Cx45 in T-Tubuli, in terminalen Zisternen oder sogar in beiden Membranen befindet. Wäre letzteres der Fall bleibt es immer noch höchst unwahrscheinlich, dass von Cx45 Gap Junctions gebildet werden. In Bereichen von Gap Junction Kopplung nähern sich die Membranen auf 3-4 nm, der Spalt von 15 nm zwischen T-Tubuli und terminalen Zisternen ist demnach viel zu groß, um überhaupt eine Paarung zweier Halbkanäle zu erlauben. Zudem docken Connexone über ihre extrazellulären Schleifen aneinander. Diese würden, wenn Cx45 in T-Tubuli und terminalen Zisternen lokalisiert ist, auf der Außenseite der jeweiligen Membran liegen, d.h. im T-Tubuli Lumen bzw. im Cytoplasma. Ein Connexon in terminalen Zisternen könnte so nur mit den cytoplasmatischen Bereichen eines Connexons in der T-Tubuli Membran in Berührung kommen, nicht jedoch mit den extrazellulären Bereichen. Dies macht eine Gap Junction Bildung topologisch unmöglich, steht jedoch mit einer Funktion von Cx45 als Halbkanal im Einklang.

5.2.2 Cx45 Halbkanäle im Skelettmuskel

Da die Ausbildung von Gap Junctions durch Cx45 im adulten Skelettmuskel unmöglich scheint, könnte das Protein als Halbkanal aktiv sein. Die Öffnung von Connexin Halbkanälen wird jedoch kontrovers diskutiert (Spray et al. 2006) und es stellt sich die Frage, ob sich mögliche Cx45 Halbkanäle unter physiologischen Bedingungen überhaupt öffnen können. Dazu ist es hilfreich die Rahmenbedingungen im Skelettmuskel mit denen in der Arbeit von Valiunas (2002) angewandten *in vitro* Stimuli, die zur Öffnung von Cx45 Halbkanälen führen, zu vergleichen.

Die Studien von Valiunas et al. (2002) zeigten, dass Cx45 Halbkanäle bei einer extrazellulären $[Ca^{2+}]$ von 2 mM inaktiv waren und erst der Entzug extrazellulären Kalziums zum Öffnen der Kanäle führte. Im Skelettmuskel liegt die extrazelluläre $[Ca^{2+}]$ im T-Tubuli Lumen bei 1,5 mM, intrazellulär bei 10^{-7} mM, und im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums bei $< 10^{-1}$ mM (Bassel-Duby and Olson 2006). Im Zuge

einer Kontraktion führt das aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzte Kalzium zu einer $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung von 10^{-7} mM auf 10^{-5} mM.

In vitro öffnen Cx45 Halbkanäle bei Änderungen des Membranpotentials, wobei die Leitfähigkeiten und Öffnungswahrscheinlichkeiten bei positiven Potentialen zunehmen (Valiunas 2002). Das Ruhemembranpotential eines Skelettmuskels liegt bei ca. -80 mV. Während eines Aktionspotentials springt das Membranpotential um >100 mV auf +20 mV. Ist Cx45 in T-Tubuli Membranen lokalisiert, so würde die hohe extrazelluläre $[Ca^{2+}]$ und das negative Membranpotential die Kanäle wahrscheinlich geschlossen halten. Die Öffnungswahrscheinlichkeit steigt jedoch *in vitro* bei Depolarisation des Membranpotentials und hat schon bei +50mV ihren maximalen Wert erreicht. Zusätzlich beträgt die Leitfähigkeit (ein indirektes Maß für die Anzahl aktivierter Kanäle) von Cx45 Halbkanälen bei einem Membranpotential von 0 mV schon 43% der maximalen Leitfähigkeit, bei +20 mV gar 80%, d.h. schon bei 0 mV sind Kanäle geöffnet- zumindest theoretisch. Während eines Aktionspotentials könnte demnach die Depolarisation der Membran zur Öffnung von Cx45 Halbkanälen führen. Zudem ist die physiologische extrazelluläre Kalziumkonzentration 0,5 mM geringer als diejenige, die zu einem kompletten Block der Halbkanäle führt, sodass der depolarisierende Stimuli den blockierenden (hohe Kalziumkonzentration) überwinden könnte und sich Cx45 Halbkanäle unter physiologischen Bedingungen kurz, während eines Aktionspotentials öffnen. Des Weiteren könnte die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ während eines Aktionspotentials die Öffnungswahrscheinlichkeit von Cx45 Halbkanälen erhöhen, wie dies schon für Cx32 und Cx43 Halbkanäle nachgewiesen wurde (De Vuyst et al. 2006). Intrazelluläres Kalzium aktiviert als sekundärer Botenstoff Signalwege, in deren Zuge Kinasen aktiviert werden, die ihrerseits Cx45 phosphorylieren könnten und so dessen Kanaleigenschaften modulieren. Tatsächlich trägt Cx45 Konsensussequenzen für PKA und PKC (Doktorarbeit Maxeiner 2005), die das Protein *in vitro* auch phosphorylieren (Doktorarbeit, Höher 2008). Nicht zuletzt können mechanische Stimuli zur Öffnung von Connexin Halbkanälen führen, wie es z.B. für Cx43 beschrieben wurde (Goodenough and Paul 2003). Im Skelettmuskel könnte dieser mechanische Stimulus als Verformung der Membran während einer Kontraktion auftreten.

Liegt Cx45 in den terminalen Zisternen des Sarkoplasmatischen Retikulums, blockiert die intrazelluläre Kalziumkonzentration (10^{-7} mM) kaum eine mögliche Öffnung der Kanäle. Im Zuge des Kalziumausstroms aus dem Lumen des Sarkoplasmatischen Retikulums

depolarisiert die Membran, da positive Ladungsträger verloren gehen. Dies könnte ein möglicher Stimulus sein, der zur Öffnung von Cx45 Halbkanälen in der Membran von terminaler Zisternen führt (Valiunas 2002). Über Cx45 Halbkanäle könnte Kalzium in das Cytosol ausgeschüttet werden und so die $[Ca^{2+}]_i$ während einer Kontraktion erhöhen, addierend zum RyR hervorgerufenen Kalziumausstrom.

Zusammengefasst: Im Skelettmuskel herrschen einmalige Rahmenbedingungen, die eine Öffnung von Cx45 Halbkanälen in T-Tubuli oder dem Sarkoplasmatischen Retikulum ermöglichen könnten.

5.2.3 Die hypothetische Funktion von Cx45 im adulten Skelettmuskel

Untersuchungen zur ATP Freisetzung an Cx43 ektopisch exprimierenden Skelettmuskeln zeigten, dass auch Wildtyp Muskeln endogen ATP freisetzen. Dies lässt vermuten, dass endogene ATP permeable Halbkanäle im Skelettmuskel aktiv sind. Art der Stimulation (Reduktion extrazellulären Kalziums) und chemische Sensitivität (Applikation eines Halbkanalinhibitors) der ATP Kanäle legen eine Beteiligung von Connexin und/oder Pannexin Kanälen nahe. Pannexin1 wird zwar im Skelettmuskel exprimiert (Dvorientchikova et al. 2006), öffnet jedoch unabhängig der extrazellulären $[Ca^{2+}]$ (Bruzzone et al. 2003; Dvorientchikova et al. 2006). Connexine Halbkanäle hingegen öffnen nach Reduktion extrazellulären Kalziums (Goodenough and Paul 2003), sodass ein Beteiligung von Connexinen an der Freisetzung von ATP im Skelettmuskel wahrscheinlich ist. Endogen wird einzig Cx45 im adulten Skelettmuskel exprimiert. Unklar bleibt vorerst, ob Cx45 in T-Tubuli Membranen oder Membranen terminaler Zisternen lokalisiert ist. Der Hinweis, dass endogene ATP permeabler Kanäle im Skelettmuskel vorhanden sind, lässt jedoch vermuteten, dass Cx45 funktionale Halbkanäle in T-Tubuli Membranen bildet und nicht in terminalen Zisternen lokalisiert ist. Aus diesem Grund soll die Lokalisation von Cx45 in T-Tubuli und dessen Funktion als ATP-Freisetzungskanal im Folgenden genauer diskutiert werden.

Die mögliche Funktion der ATP Ausschüttung im Skelettmuskel wurde durch Analysen an Cx43 ektopisch exprimierenden Skelettmuskelfasern aufgezeigt. Die Untersuchungen wiesen nach, dass die Expression von Cx43 die Muskelkontraktionscharakteristika veränderte. Dies könnte bedeuten, dass Cx43 Signalwege moduliert, die ihrerseits den Kontraktionphänotyp des Muskels regulieren. Die Fähigkeit des Skelettmuskels, den

Kontraktionsphänotyp zu verändern, ist ein Adaptionsmechanismus des Muskels und schließt u.a. Signalwege ein, die Kalziumsignale unterschiedlich registrieren und dekodieren können (Schiaffino et al. 2007). Stromaufwärts steht dabei stets ein bestimmtes Depolarisationsmuster der Skelettmuskelfibrillenmembran. Da Cx45 zeit- und spannungsabhängige Ströme zeigt (Valiunas 2002), könnte das Protein an der Dekodierung von Innervationsmustern in Kalziumsignalen beteiligt sein.

5.2.4 Mechanismen der Dekodierung von Innervationsmustern im Skelettmuskel

Eine detaillierte Einsicht, wie der Skelettmuskel den Kontraktionsphänotyp verändern könnte geben eine Reihe von *in vitro* Studien (Sandona et al. 2005; Grishin et al. 2006; Valdes et al. 2008; Buvinic et al. 2009). Neben der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ während einer Kontraktion, beschreiben die Studien eine zweite, lang anhaltende Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, die Einfluss auf die Genregulation nimmt und unabhängig von der Kontraktion entsteht (Jaimovich et al. 2000; Araya et al. 2003; Valdes et al. 2007). Dabei bestimmt das Innervationsmuster Länge und Dauer der zweiten lang anhaltenden $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung (Valdes et al. 2007). Valdes et al. (2008) haben diese Experimente in eine Hypothese verpackt, nach der bestimmte Membrandepolarisations-Muster hoch selektive Ca^{2+} vermittelte Signalwege aktivieren, die ihrerseits bestimmte Transkriptionsregulatoren aktivieren. Darunter fallen u.a. purinerge Signalwege unter Beteiligung ATP permeabler Kanäle. Purinerge Signalwege werden durch extrazelluläres ATP, das an eine Familie von purinergen Rezeptoren bindet aktiviert. Die Familie ist geteilt in P2Y Rezeptoren, metabotrope Rezeptoren, die G-Protein vermittelte Signalwege aktivieren, und P2X Rezeptoren, ionotrope Rezeptoren, die einen direkten Flux von Ionen ermöglichen (Vassort 2001).

5.2.5 Purinerge Signalwege im Skelettmuskel und die Beteiligung ATP permeabler Kanäle

Sowohl Connexin- als auch Pannexin Halbkanäle sind ATP permeabel und können so die Aktivierung purinergener Signalwege vermitteln (Bao et al. 2004; Stout et al. 2002). Die Beteiligung purinergener Signalwege an der Regulation der Genexpression im Skelettmuskel wurde, wie bereits erwähnt, in einer Studie von Buvinic et al (2009) nachgewiesen. Die Autoren zeigten, dass Myotuben nach elektrischer Stimulation ATP freisetzen und das

ATP zur lang anhaltenden Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führte. Zudem konnten die Autoren nachweisen, dass die ATP vermittelte lang anhaltende $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung die Transkription von c-fos sowie IL-6 aktivierte, d.h. die Genexpression regulierte.

Die Applikation von Oleamide, einem Halbkanal Inhibitor, führte zum Block der ATP Freisetzung und folglich zum Ausbleiben der lang anhaltenden $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung. Buvinic et al (2009) vermuteten, dass ATP über Pannexin1 Kanäle ausgeschüttet wird.

Die Expression von Pannexin1 im Skelettmuskel wurde von Dvorianchikova et al. (2006) und Barbe et al. (2006) beschrieben. Im Folgenden soll diskutiert werden, warum zwei ATP permeable Halbkanäle im Skelettmuskel exprimiert werden könnten.

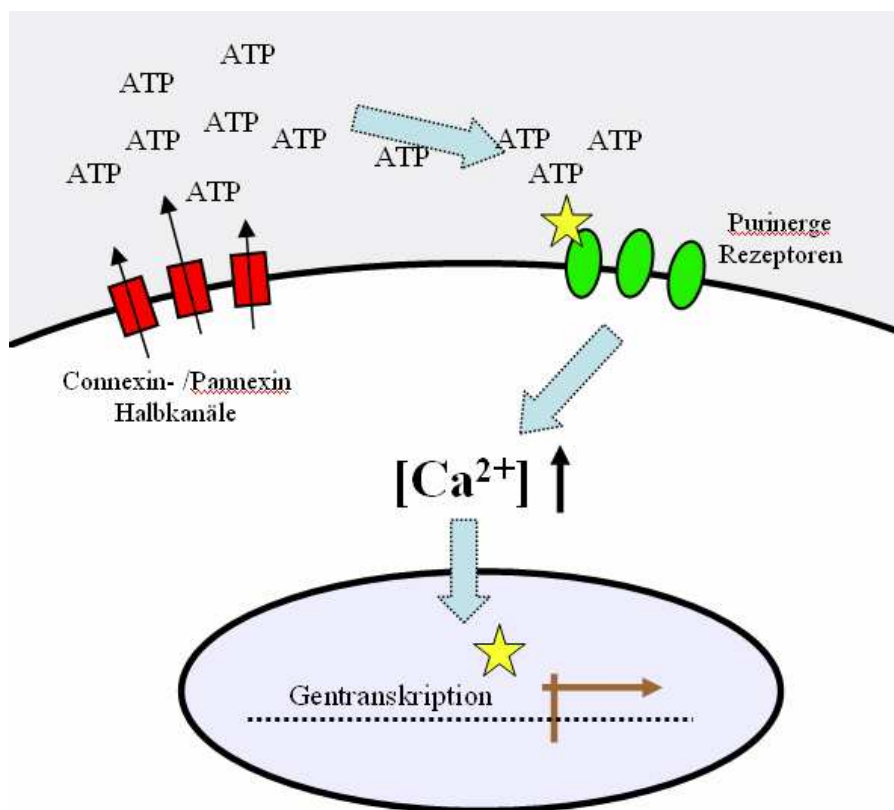


Abb. 24.: Schema der Genregulation im Skelettmuskel unter Beteiligung purinerge Signalwege.

Abhängig vom Depolarisationsmuster der T-Tubuli Membran könnten entweder Connexin oder Pannexin 1 Kanäle öffnen. Diese schütten ATP aus dem Cytosol in das Lumen der T-Tubuli aus. Die Menge an freigesetztem ATP ist dabei abhängig von den Eigenschaften des aktivierten Kanals. ATP bindet und aktiviert Purinerge Rezeptoren in der T-Tubuli Membran. Dies führt zur Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration. Kalzium als sekundärer Botenstoff aktiviert Signalwege, an deren Enden die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren stehen, die Gene regulieren, welche z.B. Kontraktionseigenschaften des Muskels bestimmen.

Cx45 und Pannexin1 besitzen unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften und könnten demnach auch unterschiedliche Depolarisationsmuster dekodieren. So öffnen Cx45 Halbkanäle langsam, die Membran müsste folglich länger depolarisiert werden (Valiunas 2002). Die Menge an freigesetztem ATP könnte so tonischen Charakters sein.

Pannexin1 Halbkanäle hingegen öffnen schnell, deaktivieren jedoch auch wieder schnell, die Membran müsste deshalb vielleicht nur kurz depolarisiert werden (Bruzzone et al. 2005). Die Menge an freigesetztem ATP könnte demnach eher phasischen Charakters sein.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass abhängig vom Innervationsmuster entweder Cx45 oder Pannexin1 Halbkanäle im Skelettmuskel öffnen und ATP in den extrazellulären Raum ausschütten. ATP bindet purinerge Rezeptoren, dies führt über P2R G-Protein vermittelt zu einer $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung. Kalzium aktiviert als sekundärer Botenstoff Signalwege, welche die Genexpression im Skelettmuskel regulieren und darüber den Kontraktionsphänotyp modulieren (s.Abb. 24).

Wichtig ist dabei: Die Menge an ausgeschüttetem ATP ist abhängig von der Leitfähigkeit und Dauer der jeweiligen Kanalöffnung, was sich auf Dauer und Länge der $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung auswirkt. Dauer und Länge der $[Ca^{2+}]_i$ Erhöhung ihrerseits bestimmt welche Signalwege aktiviert werden und letztlich den Kontraktionsphänotyp der Faser.

5.3 Untersuchungen der Myogenese an Cx39 und Cx43 doppelt defizienten Embryonen

Die Skelettmuskulatur der Vertebraten entsteht in Somiten. In diesen entwickeln sich mesodermale Zellen zu Myoblasten. Myoblasten differenzieren und fusionieren zu Myotuben, die schließlich zu adulten Skelettmuskelfasern reifen. Dieser Prozess wird als Myogenese bezeichnet.

Während der Myogenese wird Cx43 in Myoblasten, Cx39 in Myotuben exprimiert. Zudem konnten Trovato-Salinario et al. (2009) die Expression von Cx40 in einer Subpopulation von Myotuben nachweisen. Ablation von Cx43 in Zellkultur stört und verzögert die Fusion von Myoblasten zu Myotuben (Araya et al. 2005). In Cx39 defizienten Mäusen hingegen ist die Myogenese und Regeneration beschleunigt, einhergehend mit einer erhöhten Menge an Cx43 Protein während dieser Prozesse (persönliche Mitteilung, Julia von Maltzahn).

Die verstärkte Expression von Cx43 in Cx39 defizienten Mäusen könnte den Verlust von Cx39 kompensieren. Deshalb sollte der Myogeneseprozess an Cx39 und Cx43 defizienten Embryonen untersucht werden, um diesen möglichen kompensatorischen Effekt

auszuschalten und die Funktion von Cx39 aufzudecken. Verglichen wurden bei den Analysen stets Cx39 defiziente und Cx39/Cx43 doppelt defiziente Embryonen.

5.3.1 Die Expression myogener Marker in Cx39 und Cx43 doppelt defizienten Embryonen

Immunfluoreszenz-Analysen an Embryonen ED13.5 wiesen Signale für MyoD und Myogenin in rostralen Kompartimenten nach. Es waren keine Unterschiede in der Signalstärke und Lokalisation in Cx39 einfach- und Cx39/Cx43 doppelt defizienten Embryonen zu erkennen. Sowohl die Signale für MyoD als auch Myogenin waren kernlokalisiert und überlappten zum Großteil. Dieses Signalmuster geht einher mit den beschriebenen Expressionsprofilen von MyoD und Myogenin. MyoD wird in aktivierten und proliferierenden Myoblasten exprimiert. Mit fortschreitender Myogenese nimmt die Expression ab. Adulte Muskelfasern zeigen nur noch spärlich MyoD positive Zellkerne (Koishi et al. 1995). Myogenin wird in Myoblasten kurz vor der Fusion, in Myotuben und nur noch wenig in adulten, vorwiegend schnellen Skelettmuskelfasern, exprimiert (Hughes et al. 1993). Die Expression von MyoD und Myogenin überlappt demnach in Myoblasten während der Fusion und zum Teil in Myotuben (Zammit et al. 2006). In Cx39 einfach defizienten- und Cx39/Cx43 doppelt defizienten Embryonen waren sowohl ausschließlich MyoD als auch Myogenin positive Zellenkerne zu finden, d.h. sowohl proliferierende Myoblasten als auch reife Myotuben (Zammit et al. 2006). Beide Signale überlappten weitgehend. Die Überlappung der Signale für MyoD und Myogenin in Cx39 einfach defizienten- und Cx39/Cx43 doppelt defizienten Embryonen (ED13.5), deutet auf einen großen Pool bereits fusionierender Myoblasten bzw. von Myotuben. Da die Myogenese in Dermomyotom rostraler Somiten bereits an ED8.5 beginnt, ist sie in diesen Bereichen deshalb ED13.5 schon weit fortgeschritten. Hier entwickeln sich zu diesem Zeitpunkt die ersten Myotuben des Embryo (primärer Myotuben) (Fürst et al. 1989).

Auch an ED16.5 Embryonen waren keine Unterschiede in Lokalisation und Expressionstärke der myogenen Marker MyoD und Myogenin in Cx39 einfach- und Cx39/Cx43 doppelt defizienten Embryonen zu erkennen. Da keine Unterschiede in der Verteilung myogener Marker festgestellt wurde, ist die Myogenese auch in doppelt defizienten Embryonen, wie für Cx39 defiziente Embryonen bereits nachgewiesen (Julia von Maltzahn, persönliche Mitteilung), wahrscheinlich beschleunigt. Signale waren dabei

deutlich in Rumpf-, Cranialen- und in Bereichen sich entwickelnder Gliedmaßen nachweisbar. Präparierte Embryonen waren zu diesem Zeitpunkt bereits bewegungsfähig, was auf die Entwicklung funktionierender kontraktionsfähiger Skelettmuskelfasern hindeutet.

Zusammenfassend lässt sich folgendes festhalten: Trotz der Ablation von Cx39 und Cx43 wird die Myogenese induziert. Mesodermale Zellen entwickeln sich zu Myoblasten, differenzieren und fusionieren zu kontraktionsfähigen Myotuben. Der zeitliche Ablauf des Myogeneseprozesses ist jedoch verändert.

5.3.2 Vergleich der Myogenese in Cx39 einfach- und Cx39/Cx43 doppelt defizienten Embryonen – die Rolle von Cx43 während der Myogenese

Die verstärkte Expression von Cx43 in Cx39 defizienten Mäusen während der Myogenese und Muskelregeneration, ließ vermuten, dass Cx43 die Funktion von Cx39 ersetzt. Untersuchungen an Cx39/Cx43 doppelt defizienten Embryonen zeigten jedoch keine augenscheinlichen Unterschiede des Myogeneseprozesses im Vergleich zu Cx39 defizienten Embryonen. So muss vermutet werden, dass *in vitro* Cx43 während der Myogenese entbehrlich zu sein scheint. Dies deckt sich mit Untersuchungen an Cx43 defizienten Mäusen, die augenscheinlich Skelettmuskulatur ausbilden (Theis, Doktorarbeit 2001). Araya et al. (2005) wiesen jedoch eine verzögerte Muskelregeneration nach induzierter Ablation von Cx43 nach. In dieser Studie wurde Cx43 jedoch durch ein induzierbares System (Mx-Cre) ablatiert, sodass andere Ursachen für die verzögerte Regeneration nicht ausgeschlossen werden können. So wird Cx43 u.a. in Makrophagen exprimiert, die eine zentrale Rolle im Regenerationsprozess einnehmen. Ist die Funktion von Makrophagen gestört, nimmt dies Einfluss auf die Regeneration (Merly et al. 1999). Zwar führt auch *in vitro* die Ablation von Cx43 zur verzögerten und verringerten Myotubenbildung, jedoch wird die Fusion von Myoblasten nicht vollständig verhindert (Araya et al. 2005; Squecco et al. 2006), sodass die Expression von Cx43 möglicherweise keine Grundvoraussetzung für die Myotubenbildung zu sein scheint. Da jedoch der Myogeneseprozess in Cx39/Cx43 defizienten Mäusen wahrscheinlich beschleunigt ist, könnte Cx43 an der Koordination der Fusion von Myoblasten beteiligt sein (Gorbe et al. 2005).

Zwei weitere Connexine Cx40 und Cx45 werden während der Myogenese, jedoch ausschließlich in Myotuben exprimiert, sodass eine Kompensation von Cx43 durch Cx40 und/oder Cx45 unwahrscheinlich, aber nicht auszuschließen ist.

Die Analysen an Cx39/Cx43 defizienten Embryonen zeigen, dass die Expression von Cx43 keine Voraussetzung für die Entwicklung von mesodermalen Zellen zu Myoblasten und deren Fusion zu Myotuben zu sein scheint. Möglicherweise wird die Induktion und das Fortschreiten der Myogenese über Signale des umgebenden Gewebes gesteuert (Arnold and Braun 2000; Borue and Noden 2004) und Connexine Kanäle könnten eine modulatorische Rolle während dieser Prozesse einnehmen.

5.3.3 Die Funktion von Cx39 während der Myogenese

2004 beschreiben von Maltzahn et al. ein Connexin, namentlich Cx39, das ausschließlich während eines kleinen Zeitfensters in der embryonalen sich entwickelnden Skelettmuskulatur (und in regenerierenden Skelettmuskeln) exprimiert wird. Weitere Analysen zeigten, dass Cx39 ausschließlich in Myotuben zu finden ist (von Maltzahn et al. 2004; von Maltzahn et al. 2006). Da Myotuben embryonaler Skelettmuskeln untereinander gekoppelt sind, liegt es nahe, diese Kopplung auf Gap Junctions bestehend aus Cx39 zurück zuführen. Die Funktion der Kopplung von Myotuben ist jedoch unbekannt. Analysen der Cx39 und Cx39/Cx43 defizienten Embryonen zeigten, dass die Myogenese beschleunigt ist. Dies deutet auf eine Rolle von Cx39 und Cx43 an der Koordination des zeitlichen Ablaufs der Myogenese hin.

Während der Myogenese werden zwei Phasen der Myotubenbildung unterschieden. Primäre Myotuben werden ab ED13.5 bis ED16.5 gebildet. Sekundäre Myotuben entstehen ab ED16.5 innerhalb der Basalmembran primärer Myotuben (Fürst et al. 1989). Sekundäre Myotuben werden erst kurz vor der Geburt innerviert (Ross et al. 1987). Elektrophysiologische Untersuchungen an embryonalen Muskeln der Ratte zeigten, dass zum Großteil nur primäre Myotuben innerviert werden (Sheard et al. 1991). Elektrische Signale werden dann, so die Vermutung der Autoren, auf sekundäre Myotuben weitergegeben. Die Aktivität von Motoneuronen ist unabdingbar für die Bildung von sekundären Myotuben wie von Harris (1981) nachgewiesen wurde. Cx39 haltige Gap Junctions könnten die Weitergabe von Signalen (sekundäre Botenstoffe) primärer- an sekundäre Myotuben erlauben und so die Reifung sekundärer Myotuben koordinieren.

Wenn keine Kopplung zwischen Myotuben stattfindet, entstehen kaum sekundäre Myotuben (Harris 1981). Dies könnte Auswirkungen auf die Faserkomposition haben, da primäre Myotuben die langsame MHC I Isoform exprimieren, sekundäre Myotuben jedoch nur embryonale MHC Isoformen (Barbet et al. 1991; Hughes et al. 1993). Im adulten Muskel wird der Fasertyp jedoch durch die Innervation bestimmt (Schiaffino et al. 2007), sodass eine veränderte Faserkomposition nur in neugeborenen Mäusen besteht.

Dies erklärt jedoch nicht den beobachteten Phänotyp Cx39- und Cx39/Cx43 defizienter Mäuse, die schon ab ED13.5 eine verstärkte Expression myogener Marker aufweisen. Doch auch hier könnte die Kopplung zwischen primären Myotuben den Myogeneseprozess steuern und koordinieren helfen. An ED13.5 sind ausschließlich primäre Myotuben gebildet, die wahrscheinlich nicht alle einzeln innerviert werden können (das Zwerchfell der Ratte besteht ED16 aus ca. 1500 Muskelfasern! (Harris 1981).

Cx39 RNA ist ab ED11.5 nachweisbar. Immunfluoreszenz-Analysen zeigen plaqueartige Signale, sodass erste primäre Myotuben über Gap Junction, bestehend aus Cx39, gekoppelt sein können. So könnten innervierte primäre Myotuben elektrische Signale auf benachbarte primäre Myotuben über Gap Junctions weiterleiten. Elektrische Aktivität reguliert die mRNA Menge von MyoD und Myogenin. Denervation führt dabei zur Erhöhung der mRNA Menge (Eftimie et al. 1991). Fällt die Gap Junction Kopplung zwischen Myotuben und Myotuben/Myoblasten aus, wird verstärkt MyoD und Myogenin exprimiert. Dies beschleunigt die Myogenese. Die beschleunigte Myogenese könnte die koordinierte Bildung primärer und sekundärer Myotuben aufheben, indem stetig neue Myotuben, d.h. primäre Myotuben gebildet werden. Im Gegensatz zu sekundären Myotuben, exprimieren primäre Myotuben neben den embryonalen MHC Isoformen auch die MHC I Isoform. Dies könnte dazu führen, dass die Muskeln der neugeborenen Maus überwiegend aus langsamen Fasern bestehen. Diese sind zwar ermüdungsresistent, können jedoch keine schnellen Kontraktionen ausführen und sind demnach in ihrer Bewegungsfähigkeit eingeschränkt.

5.4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Expression von Connexinen während der Skelettmuskelentwicklung und in der adulten Skelettmuskulatur der Maus analysiert.

1. Ein zentraler Bestandteil der einwandfreien Funktion eines Muskels ist die elektrische Isolation der einzelnen Skelettmuskelfasern untereinander. Über die ektopische Cx43 Expression in adulten Skelettmuskelfasern der Maus sollte diese elektrische Isolation aufgehoben werden und der Einfluss auf die Skelettmuskelphysiologie untersucht werden. Die Analysen wiesen nach, dass Cx43 ektopisch exprimiert in adulten Skelettmuskelfasern in der Plasmamembran lokalisiert war, keine Gap Junctions ausbildete, jedoch eine erhöhte Halbkanalaktivität zeigte. Die ektopische Expression von Cx43 führte zur Erhöhung der Muskelkraftentwicklung, einhergehend mit einer veränderten Genexpression. Zudem zeigten Cx43 ektopisch exprimierende primäre Myotuben geringere Kalziumtransienten nach ATP Stimulation. Es konnte daher nachgewiesen werden, dass Cx43 ektopisch im Skelettmuskel exprimiert die Halbkanalaktivität des Proteins erhöht und so, möglicherweise über purinerge Signalwege, den Muskelphänotyp verändert.

2. In Rahmen dieser Arbeit wurde zudem die endogene Expression von Cx45 im adulten Skelettmuskel untersucht. Nachdem die Expression über verschiedenen Methoden verifiziert werden konnte, zeigten Ko-Immunfluoreszenz Analysen, das Cx45 in T-Tubuli Membranen und/oder in Terminalen Zisternen des Sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist, was die Ausbildung von Gap Junction Kanälen verhindert aber funktionale Halbkanäle ermöglichen könnte.

3. Die Skelettmuskulatur der Vertebraten entsteht aus mesodermalen Zellen, die sich zu Myoblasten entwickeln, differenzieren, und zu Myotuben fusionieren. In Myoblasten wird Cx43- in Myotuben Cx39 exprimiert. Ablation von Cx43 *in vitro* führt zur Verzögerung der Myogenese. In Cx39 defizienten Embryonen ist die Myogenese hingegen beschleunigt. Untersuchungen zur Myogenese an Cx39/Cx43 doppelt defizienten Embryonen sollten die Rolle der beiden Connexine während der Myogenese zu verstehen helfen. Analysen an Cx39/Cx43 doppelt defizienten Embryonen zeigten keine Veränderungen in Expressionstärke und Lokalisation myogener Marker im Vergleich zu Cx39 defizienten Embryonen. Sowohl einfach- als auch doppelt defiziente Embryonen bildeten Skelettmuskelfasern aus und waren bewegungsfähig. Diese Untersuchungen zeigten, dass weder Cx39 noch Cx43 notwendig für die Skelettmuskelentwicklung zu sein scheinen.

5.5 Ausblick

5.5.1 Die ektopische Expression von Cx43 in adulten Skelettmuskelfasern

Cx43 ektopisch im Skelettmuskel exprimiert, verändert die Kontraktionseigenschaften der Muskelfasern. Dies geschieht, wie im Extensor Digitorum Longus Muskel gezeigt wurde, wahrscheinlich durch Veränderungen in Signalwegen, die die Genexpression im Muskel regulieren. Die veränderten Kontraktionseigenschaften könnten durch Analysen der Expression von Transkriptionsfaktoren (NFAT1a-c, calcineurin etc.) und weiteren Proteinen, die am Kontraktionsprozess teilnehmen, (Myosin light chain, SERCA etc.) bestätigt werden. Vorläufige Analysen zeigten, dass die veränderte Genexpression mechanistisch über Veränderungen ATP vermittelter Signalwege, wahrscheinlich purinerges Signalwege, erklärt werden kann. Die Teilnahme purinerges Signalwege müsste genauer charakterisiert werden, z.B. durch Verwendung verschiedener Blocker, die bestimmte Komponenten dieser Wege inhibieren. Zudem könnte analysiert werden, welche Purinergen Rezeptoren in welchen Muskeltypen exprimiert werden, um so einen weiteren Dekodierungsmechanismus aufzuzeigen.

5.5.2 Die Endogene Expression von Cx45 in adulten Skelettmuskelfasern

In dieser Arbeit wurde die endogene Expression von Cx45 in adulten Skelettmuskelfasern beschrieben. Um die Funktion des Cx45 innerhalb der Skelettmuskelphysiologie zu klären, wäre eine skelettmuskelspezifische Deletion unabdingbar, da Cx45 defiziente Embryonen an Tag 10.5 der Embryonalentwicklung sterben. Dies könnte durch Verpaarung von Cx45^{fl/fl} Mäusen mit Mäusen, die eine muskelspezifische Cre-Rekombinase exprimieren geschehen. Die Analyse müsste zuerst eine allgemeine histologische Charakterisierung der Muskeln einschließen. Darunter fielen Hämatoxylin-Eosin Färbungen, Collagen und Trichromfärbungen. Anschließend könnte die Faserzusammensetzung über die Analyse der Myosin-Schweren-Kette Isoformen bestimmt werden. Veränderungen derselben könnten physiologisch über Messungen die Kontraktionseigenschaften der Muskeln, wie zum Beispiel die Ermüdungsresistenz oder die maximale Kraftentwicklung, charakterisiert werden. Über ATP Freisetzung-

untersuchungen und Farbstoffaufnahme, hervorgerufen durch Reduktion extrazellulären Kalziums und elektrische Feldstimulation, ließe sich die Funktionalität der Cx45 Halbkanäle nachweisen. Zudem könnte bestimmt werden, ob eine Veränderung von Transkriptionsfaktoren, die muskelspezifische Gene regulieren vorliegt, um Signalwege aufzudecken, die durch Cx45 vermittelt werden könnten.

5.5.3 Untersuchungen zur Myogenese an Cx43 und Cx39 defizienten Embryonen

Die Ablation von Cx43 und Cx39 hat einen Einfluss auf den zeitlichen Ablauf der Myogenese. Unklar ist, wie dies geschieht. Mögliche wäre, dass vermehrt primäre Myotuben gebildet werden. An doppelt defizienten Embryonen könnte untersucht werden, ob ein Missverhältnis in der Anzahl primärer und sekundärer Myotuben vorliegt. Dazu könnten die Verteilung langsamer zu schneller Fasern untersucht werden, da primäre Myotuben langsame Fasern bilden. Gleichwohl könnte die Kopplung von Myotuben und Myoblasten in primären Kulturen doppelt defizienter Embryonen untersucht werden, um heraus zu finden, ob Cx40 oder Cx45 die Ablation von Cx39 und Cx43 trotz unveränderter Expressionstärke kompensieren können. Elektrische Stimulation dieser Kulturen könnte zudem aufdecken, ob und wie elektrische Stimuli MyoD und Myogenin regulieren.

6 Literaturverzeichnis

Ahmad, A., M. Brinson, B. L. Hodges, J. S. Chamberlain and A. Amalfitano (2000). "Mdx mice inducibly expressing dystrophin provide insights into the potential of gene therapy for duchenne muscular dystrophy." Hum Mol Genet **9**: 2507-15.

Ainscow, E. K., C. Zhao and G. A. Rutter (2000). "Acute overexpression of lactate dehydrogenase-A perturbs beta-cell mitochondrial metabolism and insulin secretion." Diabetes **49**: 1149-55.

Anselmi, F., V. H. Hernandez, G. Crispino, A. Seydel, S. Ortolano, S. D. Roper, N. Kessaris, W. Richardson, G. Rickheit, M. A. Filippov, H. Monyer and F. Mammano (2008). "ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca²⁺ signals across the inner ear." Proc Natl Acad Sci U S A **105**: 18770-5.

Araya, R., D. Eckardt, S. Maxeiner, O. Kruger, M. Theis, K. Willecke and J. C. Saez (2005). "Expression of connexins during differentiation and regeneration of skeletal muscle: functional relevance of connexin43." J Cell Sci **118**: 27-37.

Araya, R., J. L. Liberona, J. C. Cardenas, N. Riveros, M. Estrada, J. A. Powell, M. A. Carrasco and E. Jaimovich (2003). "Dihydropyridine receptors as voltage sensors for a depolarization-evoked, IP₃R-mediated, slow calcium signal in skeletal muscle cells." J Gen Physiol **121**: 3-16.

Araya, R., M. A. Riquelme, E. Brandan and J. C. Saez (2004). "The formation of skeletal muscle myotubes requires functional membrane receptors activated by extracellular ATP." Brain Res Brain Res Rev **47**: 174-88.

Arnold, H. H. and T. Braun (2000). "Genetics of muscle determination and development." Curr Top Dev Biol **48**: 129-64.

Bagshaw C (1993) Muscle contraction, 2nd edn. Chapman&Hall, London.

Bao, L., S. Locovei and G. Dahl (2004). "Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP." FEBS Lett **572**: 65-8.

Bao, X., S. C. Lee, L. Reuss and G. A. Altenberg (2007). "Change in permeant size selectivity by phosphorylation of connexin 43 gap-junctional hemichannels by PKC." Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 4919-24.

Baranova, A., D. Ivanov, N. Petrash, A. Pestova, M. Skoblov, I. Kelmanson, D. Shagin, S. Nazarenko, E. Geraymovych, O. Litvin, A. Tiunova, T. L. Born, N. Usman, D. Staroverov, S. Lukyanov and Y. Panchin (2004). "The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins." Genomics **83**: 706-16.

Barbe, M. T., H. Monyer and R. Bruzzone (2006). "Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels." Physiology (Bethesda) **21**: 103-14.

- Barbet, J. P., L. E. Thornell and G. S. Butler-Browne (1991). "Immunocytochemical characterisation of two generations of fibers during the development of the human quadriceps muscle." Mech Dev **35**: 3-11.
- Bassel-Duby, R. and E. N. Olson (2006). "Signaling pathways in skeletal muscle remodeling." Annu Rev Biochem **75**: 19-37.
- Bennett, M. V., J. E. Contreras, F. F. Bukauskas and J. C. Saez (2003). "New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate." Trends Neurosci **26**: 610-7.
- Bigard, X., H. Sanchez, J. Zoll, P. Mateo, V. Rousseau, V. Veksler and R. Ventura-Clapier (2000). "Calcineurin Co-regulates contractile and metabolic components of slow muscle phenotype." J Biol Chem **275**: 19653-60.
- Bolsover, S., O. Ibrahim, N. O'Lunaigh, H. Williams and S. Cockcroft (2001). "Use of fluorescent Ca²⁺ dyes with green fluorescent protein and its variants: problems and solutions." Biochem J **356**: 345-52.
- Borie, X. and D. M. Noden (2004). "Normal and aberrant craniofacial myogenesis by grafted trunk somitic and segmental plate mesoderm." Development **131**: 3967-80.
- Brink, P. (2000). "Gap junction voltage dependence. A clear picture emerges." J Gen Physiol **116**: 11-2.
- Bruzzone, R., M. T. Barbe, N. J. Jakob and H. Monyer (2005). "Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes." J Neurochem **92**: 1033-43.
- Bruzzone, R., S. G. Hormuzdi, M. T. Barbe, A. Herb and H. Monyer (2003). "Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 13644-9.
- Bruzzone, S., L. Franco, L. Guida, E. Zocchi, P. Contini, A. Bisso, C. Usai and A. De Flora (2001). "A self-restricted CD38-connexin 43 cross-talk affects NAD⁺ and cyclic ADP-ribose metabolism and regulates intracellular calcium in 3T3 fibroblasts." J Biol Chem **276**(51): 48300-8.
- Buvinic, S., G. Almarza, M. Bustamante, M. Casas, J. Lopez, M. Riquelme, J. C. Saez, J. P. Huidobro-Toro and E. Jaimovich (2009). "ATP released by electrical stimuli elicits calcium transients and gene expression in skeletal muscle." J Biol Chem **284**: 34490-505.
- Calabria, E., S. Ciciliot, I. Moretti, M. Garcia, A. Picard, K. A. Dyar, G. Pallafacchina, J. Tothova, S. Schiaffino and M. Murgia (2009). "NFAT isoforms control activity-dependent muscle fiber type specification." Proc Natl Acad Sci U S A **106**: 13335-40.
- Constantin, B. and L. Cronier (2000). "Involvement of gap junctional communication in myogenesis." Int Rev Cytol **196**: 1-65.

- Contreras, J. E., J. C. Saez, F. F. Bukauskas and M. V. Bennett (2003). "Functioning of cx43 hemichannels demonstrated by single channel properties." Cell Commun Adhes **10**: 245-9.
- Cooke, R. (1986). "The mechanism of muscle contraction." CRC Crit Rev Biochem **21**: 53-118.
- Cseri, J., H. Szappanos, G. P. Szigeti, Z. Csernatony, L. Kovacs and L. Csernoch (2002). "A purinergic signal transduction pathway in mammalian skeletal muscle cells in culture." Pflugers Arch **443**: 731-8.
- De Vuyst, E., E. Decrock, L. Cabooter, G. R. Dubyak, C. C. Naus, W. H. Evans and L. Leybaert (2006). "Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening." Embo J **25**: 34-44.
- Dennis, M. J., L. Ziskind-Conhaim and A. J. Harris (1981). "Development of neuromuscular junctions in rat embryos." Dev Biol **81**: 266-79.
- DeRosa, A. M., C. H. Xia, X. Gong and T. W. White (2007). "The cataract-inducing S50P mutation in Cx50 dominantly alters the channel gating of wild-type lens connexins." J Cell Sci **120**: 4107-16.
- Dobrowolski, R., P. Sasse, J. W. Schrickel, M. Watkins, J. S. Kim, M. Rackauskas, C. Troatz, A. Ghanem, K. Tiemann, J. Degen, F. F. Bukauskas, R. Civitelli, T. Lewalter, B. K. Fleischmann and K. Willecke (2008). "The conditional connexin43G138R mouse mutant represents a new model of hereditary oculodentodigital dysplasia in humans." Hum Mol Genet **17**: 539-54.
- Dobrowolski, R., A. Sommershof and K. Willecke (2007). "Some oculodentodigital dysplasia-associated Cx43 mutations cause increased hemichannel activity in addition to deficient gap junction channels." J Membr Biol **219**: 9-17.
- Dolmetsch, R. E., R. S. Lewis, C. C. Goodnow and J. I. Healy (1997). "Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration." Nature **386**: 855-8.
- Dudel J., Menzel R., Schmidt R.F., (2001) Neurowissenschaft, 2nd edn, Springer, Berlin
- Dvorianchikova, G., D. Ivanov, Y. Panchin and V. I. Shestopalov (2006). "Expression of pannexin family of proteins in the retina." FEBS Lett **580**: 2178-82.
- Edmondson, D. G. and E. N. Olson (1993). "Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription." J Biol Chem **268**: 755-8.
- Eftimie, R., H. R. Brenner and A. Buonanno (1991). "Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity." Proc Natl Acad Sci U S A **88**: 1349-53.

Elfgang, C., R. Eckert, H. Lichtenberg-Frate, A. Butterweck, O. Traub, R. A. Klein, D. F. Hulser and K. Willecke (1995). "Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells." J Cell Biol **129**: 805-17.

Fitts, R. H., W. W. Winder, M. H. Brooke, K. K. Kaiser and J. O. Holloszy (1980). "Contractile, biochemical, and histochemical properties of thyrotoxic rat soleus muscle." Am J Physiol **238**: C14-20.

Flucher, B. E., N. Kasielke and M. Grabner (2000). "The triad targeting signal of the skeletal muscle calcium channel is localized in the COOH terminus of the alpha(1S) subunit." J Cell Biol **151**: 467-78.

Franzini-Armstrong, C. (1975). "Membrane particles and transmission at the triad." Fed Proc **34**: 1382-9.

Fürst, D. O., M. Osborn and K. Weber (1989). "Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly." J Cell Biol **109**: 517-27.

Furth, P. A., L. St Onge, H. Boger, P. Gruss, M. Gossen, A. Kistner, H. Bujard and L. Hennighausen (1994). "Temporal control of gene expression in Transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **91**: 9302-6.

Gilula, N. B. (1987). "Topology of gap junction protein and channel function." Ciba Found Symp **125**: 128-39.

Gollob, M. H. (2006). "Cardiac connexins as candidate genes for idiopathic atrial fibrillation." Curr Opin Cardiol **21**: 155-8.

Goodenough, D. A. (1976). "In vitro formation of gap junction vesicles." J Cell Biol **68**: 220-31.

Goodenough, D. A. and D. L. Paul (2003). "Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels." Nat Rev Mol Cell Biol **4**: 285-94.

Gorbe, A., D. L. Becker, L. Dux, E. Stelkovic, L. Krenacs, E. Bagdi and T. Krenacs (2005). "Transient upregulation of connexin43 gap junctions and synchronized cell cycle control precede myoblast fusion in regenerating skeletal muscle in vivo." Histochem Cell Biol **123**: 573-83.

Gordon, A. M., A. F. Huxley and F. J. Julian (1966). "The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres." J Physiol **184**: 170-92.

Grishin, S. N., A. Y. Teplov, A. V. Galkin, A. M. Devyataev, A. L. Zefirov, M. A. Mukhamedyarov, A. U. Ziganshin, G. Burnstock and A. Palotas (2006). "Different effects of ATP on the contractile activity of mice diaphragmatic and skeletal muscles." Neurochem Int **49**: 756-63.

Gros, D. B. and H. J. Jongsma (1996). "Connexins in mammalian heart function." Bioessays **18**: 719-30.

- Harris, A. J. (1981). "Embryonic growth and innervation of rat skeletal muscles. I. Neural regulation of muscle fibre numbers." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **293**: 257-77.
- Harris and Locke (2010). "Connexins: a Guide." 1st edn. Humana Press, New York.
- Hawke, T. J. and D. J. Garry (2001). "Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology." J Appl Physiol **91**: 534-51.
- Hughes, S. M., M. Cho, I. Karsch-Mizrachi, M. Travis, L. Silberstein, L. A. Leinwand and H. M. Blau (1993). "Three slow myosin heavy chains sequentially expressed in developing mammalian skeletal muscle." Dev Biol **158**: 183-99.
- Hughes, S. M., J. M. Taylor, S. J. Tapscott, C. M. Gurley, W. J. Carter and C. A. Peterson (1993). "Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones." Development **118**: 1137-47.
- Jaimovich, E., R. Reyes, J. L. Liberona and J. A. Powell (2000). "IP(3) receptors, IP(3) transients, and nucleus-associated Ca(2+) signals in cultured skeletal muscle." Am J Physiol Cell Physiol **278**: C998-C1010.
- Kamermans, M., I. Fahrenfort, K. Schultz, U. Janssen-Bienhold, T. Sjoerdsma and R. Weiler (2001). "Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina." Science **292**: 1178-80.
- Kang, J., N. Kang, D. Lovatt, A. Torres, Z. Zhao, J. Lin and M. Nedergaard (2008). "Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP." J Neurosci **28**: 4702-11.
- Koishi, K., M. Zhang, I. S. McLennan and A. J. Harris (1995). "MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers." Dev Dyn **202**: 244-54.
- Krutki, P., J. Celichowski, K. Krysciak, U. Slawinska, H. Majczynski and M. J. Redowicz (2008). "Division of motor units into fast and slow of the basis of profile of 20 Hz unfused tetanus." J Physiol Pharmacol **59**: 353-63.
- Kumar, N. M. and N. B. Gilula (1996). "The gap junction communication channel." Cell **84**: 381-8.
- Laird, D. W. (1996). "The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation." J Bioenerg Biomembr **28**: 311-8.
- Lampe, P. D., C. D. Cooper, T. J. King and J. M. Burt (2006). "Analysis of Connexin43 phosphorylated at S325, S328 and S330 in normoxic and ischemic heart." J Cell Sci **119**: 3435-42.
- Lampe, P. D. and A. F. Lau (2000). "Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins." Arch Biochem Biophys **384**: 205-15.
- Ling, Y., D. Appelt, A. M. Kelly and C. Franzini-Armstrong (1992). "Differences in the histogenesis of EDL and diaphragm in rat." Dev Dyn **193**: 359-69.

- Liu, X. Z., Y. Yuan, D. Yan, E. H. Ding, X. M. Ouyang, Y. Fei, W. Tang, H. Yuan, Q. Chang, L. L. Du, X. Zhang, G. Wang, S. Ahmad, D. Y. Kang, X. Lin and P. Dai (2009). "Digenic inheritance of non-syndromic deafness caused by mutations at the gap junction proteins Cx26 and Cx31." Hum Genet **125**: 53-62.
- Maeda, S., S. Nakagawa, M. Suga, E. Yamashita, A. Oshima, Y. Fujiyoshi and T. Tsukihara (2009). "Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution." Nature **458**: 597-602.
- McCullagh, K. J., E. Calabria, G. Pallafacchina, S. Ciciliot, A. L. Serrano, C. Argentini, J. M. Kalhovde, T. Lomo and S. Schiaffino (2004). "NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching." Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 10590-5.
- Merly, F., L. Lescaudron, T. Rouaud, F. Crossin and M. F. Gardahaut (1999). "Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation." Muscle Nerve **22**: 724-32.
- Omori, Y., M. Mesnil and H. Yamasaki (1996). "Connexin 32 mutations from X-linked Charcot-Marie-Tooth disease patients: functional defects and dominant negative effects." Mol Biol Cell **7**: 907-16.
- Orthmann-Murphy, J. L., A. D. Enriquez, C. K. Abrams and S. S. Scherer (2007). "Loss-of-function GJA12/Connexin47 mutations cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease." Mol Cell Neurosci **34**: 629-41.
- Parker, M. H., P. Seale and M. A. Rudnicki (2003). "Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis." Nat Rev Genet **4**: 497-507.
- Parsons, S. A., D. P. Millay, B. J. Wilkins, O. F. Bueno, G. L. Tsika, J. R. Neilson, C. M. Liberatore, K. E. Yutzey, G. R. Crabtree, R. W. Tsika and J. D. Molkentin (2004). "Genetic loss of calcineurin blocks mechanical overload-induced skeletal muscle fiber type switching but not hypertrophy." J Biol Chem **279**: 26192-200.
- Parsons, S. A., B. J. Wilkins, O. F. Bueno and J. D. Molkentin (2003). "Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin Aalpha and Abeta gene-targeted mice." Mol Cell Biol **23**: 4331-43.
- Paul, D. L., L. Ebihara, L. J. Takemoto, K. I. Swenson and D. A. Goodenough (1991). "Connexin46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes." J Cell Biol **115**: 1077-89.
- Paznekas, W. A., S. A. Boyadjiev, R. E. Shapiro, O. Daniels, B. Wollnik, C. E. Keegan, J. W. Innis, M. B. Dinulos, C. Christian, M. C. Hannibal and E. W. Jabs (2003). "Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia." Am J Hum Genet **72**: 408-18.
- Pette, D. and R. S. Staron (2000). "Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions." Microsc Res Tech **50**: 500-9.

- Phelps, C. J., S. W. Carlson and M. Y. Vaccarella (1994). "Hypothalamic dopaminergic neurons in prolactin-deficient Ames dwarf mice: localization and quantification of deficit by tyrosine hydroxylase immunocytochemistry." J Neuroendocrinol **6**: 145-52.
- Proulx, A., P. A. Merrifield and C. C. Naus (1997). "Blocking gap junctional intercellular communication in myoblasts inhibits myogenin and MRF4 expression." Dev Genet **20**: 133-44.
- Reinecke, H., E. Minami, J. I. Virag and C. E. Murry (2004). "Gene transfer of connexin43 into skeletal muscle." Hum Gene Ther **15**: 627-36.
- Roell, W., T. Lewalter, P. Sasse, Y. N. Tallini, B. R. Choi, M. Breitbach, R. Doran, U. M. Becher, S. M. Hwang, T. Bostani, J. von Maltzahn, A. Hofmann, S. Reining, B. Eiberger, B. Gabris, A. Pfeifer, A. Welz, K. Willecke, G. Salama, J. W. Schrickel, M. I. Kotlikoff and B. K. Fleischmann (2007). "Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia." Nature **450**: 819-24.
- Rommel, C., S. C. Bodine, B. A. Clarke, R. Rossman, L. Nunez, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos and D. J. Glass (2001). "Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways." Nat Cell Biol **3**: 1009-13.
- Rose, B. and W. R. Loewenstein (1975). "Permeability of cell junction depends on local cytoplasmic calcium activity." Nature **254**: 250-2.
- Ross, J. J., M. J. Duxson and A. J. Harris (1987). "Formation of primary and secondary myotubes in rat lumbrical muscles." Development **100**: 383-94.
- Saez, J. C., M. A. Retamal, D. Basilio, F. F. Bukauskas and M. V. Bennett (2005). "Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms." Biochim Biophys Acta **1711**: 215-24.
- Sandona, D., D. Danieli-Betto, E. Germinario, D. Biral, T. Martinello, A. Lioy, E. Tarricone, S. Gastaldello and R. Betto (2005). "The T-tubule membrane ATP-operated P2X4 receptor influences contractility of skeletal muscle." Faseb J **19**: 1184-6.
- Schiaffino, S., M. Sandri and M. Murgia (2007). "Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity." Physiology (Bethesda) **22**: 269-78.
- Schwarzenegger A., Stalone S., Lundgren D, van Damme J. C. (1984) "On the impact of body work out on muscle mass." Warn. Bros. **15**: 19-79.
- Sheard, P. W., M. J. Duxson and A. J. Harris (1991). "Neuromuscular transmission to identified primary and secondary myotubes: a reevaluation of polyneuronal innervation patterns in rat embryos." Dev Biol **148**: 459-72.
- Sohl, G. and K. Willecke (2003). "An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man." Cell Commun Adhes **10**: 173-80.

- Sonntag, S., G. Sohl, R. Dobrowolski, J. Zhang, M. Theis, E. Winterhager, F. F. Bukauskas and K. Willecke (2009). "Mouse lens connexin23 (Gj1) does not form functional gap junction channels but causes enhanced ATP release from HeLa cells." Eur J Cell Biol **88**: 65-77.
- Spray, D. C., Z. C. Ye and B. R. Ransom (2006). "Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal." Glia **54**: 758-73.
- Squecco, R., C. Sassoli, F. Nuti, M. Martinesi, F. Chellini, D. Nosi, S. Zecchi-Orlandini, F. Francini, L. Formigli and E. Meacci (2006). "Sphingosine 1-phosphate induces myoblast differentiation through Cx43 protein expression: a role for a gap junction-dependent and -independent function." Mol Biol Cell **17**: 4896-910.
- Stout, C. E., J. L. Costantin, C. C. Naus and A. C. Charles (2002). "Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels." J Biol Chem **277**: 10482-8.
- Suzuki, K., N. J. Brand, S. Allen, M. A. Khan, A. O. Farrell, B. Murtuza, R. E. Oakley and M. H. Yacoub (2001). "Overexpression of connexin 43 in skeletal myoblasts: Relevance to cell transplantation to the heart." J Thorac Cardiovasc Surg **122**: 759-66.
- Talmadge, R. J. and R. R. Roy (1993). "Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms." J Appl Physiol **75**: 2337-40.
- Tang, W., C. P. Ingalls, W. J. Durham, J. Snider, M. B. Reid, G. Wu, M. M. Matzuk and S. L. Hamilton (2004). "Altered excitation-contraction coupling with skeletal muscle specific FKBP12 deficiency." Faseb J **18**: 1597-9.
- Trexler, E. B., F. F. Bukauskas, M. V. Bennett, T. A. Bargiello and V. K. Verselis (1999). "Rapid and direct effects of pH on connexins revealed by the connexin46 hemichannel preparation." J Gen Physiol **113**: 721-42.
- Trovato-Salinaro, A., N. Belluardo, M. Frinchi, J. von Maltzahn, K. Willecke, D. F. Condorelli and G. Mudo (2009). "Regulation of connexin gene expression during skeletal muscle regeneration in the adult rat." Am J Physiol Cell Physiol **296**: C593-606.
- Valdes, J. A., E. Gaggero, J. Hidalgo, N. Leal, E. Jaimovich and M. A. Carrasco (2008). "NFAT activation by membrane potential follows a calcium pathway distinct from other activity-related transcription factors in skeletal muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol **294**: C715-25.
- Valdes, J. A., J. Hidalgo, J. L. Galaz, N. Puentes, M. Silva, E. Jaimovich and M. A. Carrasco (2007). "NF-kappaB activation by depolarization of skeletal muscle cells depends on ryanodine and IP3 receptor-mediated calcium signals." Am J Physiol Cell Physiol **292**: C1960-70.
- Valiunas, V. (2002). "Biophysical properties of connexin-45 gap junction hemichannels studied in vertebrate cells." J Gen Physiol **119**: 147-64.

- Vassort, G. (2001). "Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium." Physiol Rev **81**: 767-806.
- Verselis, V. K. and F. F. Bukauskas (2002). "Connexin-GFPs shed light on regulation of cell-cell communication by gap junctions." Curr Drug Targets **3**(6): 483-99.
- von Maltzahn, J., C. Euwens, K. Willecke and G. Sohl (2004). "The novel mouse connexin39 gene is expressed in developing striated muscle fibers." J Cell Sci **117**: 5381-92.
- von Maltzahn, J., V. Wulf and K. Willecke (2006). "Spatiotemporal expression of connexin 39 and -43 during myoblast differentiation in cultured cells and in the mouse embryo." Cell Commun Adhes **13**: 55-60.
- Wang, B., Q. Wen, X. Xie, S. Liu, M. Liu, Y. Tao, Z. Li, P. Suo, A. Shen, J. Wang and X. Ma (2009). "Mutation analysis of Connexon43 gene in Chinese patients with congenital heart defects." Int J Cardiol.
- Willecke, K., J. Eiberger, J. Degen, D. Eckardt, A. Romualdi, M. Guldenagel, U. Deutsch and G. Sohl (2002). "Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome." Biol Chem **383**: 725-37.
- Yeager, M. and B. J. Nicholson (1996). "Structure of gap junction intercellular channels." Curr Opin Struct Biol **6**: 183-92.
- Zammit, P. S., T. A. Partridge and Z. Yablonka-Reuveni (2006). "The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold." J Histochem Cytochem **54**: 1177-91.

Wissenschaftliche Konferenzen und Weiterbildungen:

„Semester Meeting“ des Bonner Forum Biomedizin (BFB) 2006 (Posterbeitrag).

Internationale Gap-Junction Konferenz 2008 in Helsingør, Dänemark (Posterbeitrag).

DFG geförderter Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Meacci, Florenz, Italien

Veröffentlichungen:

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

Wörsdörfer P, Maxeiner S, Markopoulos C, Kirfel G, **Wulf V**, Auth T, Urschel S, von Maltzahn J, Willecke K. (2008) „Connexin expression and functional analysis of gap junctional communication in mouse embryonic stem cells.“ *Stem Cells* 26:431-9.

Dobrowolski R, Hertig G, Lechner H, Wörsdörfer P, **Wulf V**, Dicke N, Eckert D, Bauer R, Schorle H, Willecke K (2009) „Loss of connexin43-mediated gap junctional coupling in the mesenchyme of limb buds leads to altered expression of morphogens in mice.“ *Hum Mol Genet.* 18:2899-911.