

**Erzeugung und Charakterisierung verschiedener
Mauslinien zur zelltypspezifischen Deletion,
Expression und Substitution von Connexinen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Britta Döring

aus

Iserlohn

Bonn, August 2005

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

Erstgutachter:	Prof. Dr. Klaus Willecke
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann
Fachnaher Gutachter:	Prof. Dr. Dieter Fürst
Fachangrenzende Gutachterin:	PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert

Tag der Promotion: 18.11.2005

Wenn eine Idee nicht zuerst absurd erscheint, taugt sie nichts.
Albert Einstein (1879-1955)

Inhaltsverzeichnis**Abkürzungsverzeichnis**

1.	Einleitung	1
1.1	Gap Junctions	1
1.2	Struktur und Funktion von Gap Junction-Kanälen	1
1.2.1	Struktur der Gap Junctions	1
1.1.2	Funktion von Gap Junction-Kanälen	3
1.1.3	Regulation der Gap Junction-Kanäle	4
1.2	Ausprägungsmuster von Connexin43 in der Maus	5
1.2.1	Das gastrointestinale System	6
1.2.2	Der Uterus	8
1.2.3	Das Gehirn	9
1.2.3.1	Aufbau und Funktion	9
1.2.3.2	Neuronale Expression von Cx43 im undifferenzierten und adulten Gehirn	11
1.2.3.3	Gap Junctions und Epilepsie	12
1.3	Ausprägungsmuster und Funktion von Connexin36	14
1.4	Expressionsprofil und Funktion von Connexin45	15
1.5	Genetische Möglichkeiten zur Untersuchung von Zielgenfunktionen im Mausmodell	16
1.5.1	Erzeugung transgener Mäuse durch Vorkerninjektion von DNA-Sequenzen	16
1.5.2	Expressionsregulation mit Hilfe des Tetracyclin-induzierbaren Systems	17
1.5.3	Homologe Rekombination	18
1.5.4	Konditionale Geninaktivierung	19
1.5.4.1	Zelltypspezifische Ausschaltung von Zielgenen	19
1.5.4.2	Induzierbare Kontrolle der Cre-Rekombinase-Aktivität	20
1.6	Anwendung des CreER ^{T2} -Systems in geflochten Cx43-Mäusen	21
1.7	Zielsetzung der Arbeit	22
2.	Material	23
2.1	Chemikalien	23
2.2	Allgemeine Lösungen und Puffer	23
2.3	Lösungen zur Nukleinsäure-Isolierung und -Analyse	23
2.4	Lösungen für Isolierung, Nachweis und Aktivitätsbestimmung von Proteinen	25
2.5	Lösungen für die Bakterienkultur	27
2.6	Lösungen für Untersuchungen an embryonalen Stammzellen der Maus und HeLa-Zellen	27
2.7	Lösungen für die Induktion der CreER ^{T2} -Rekombinase und des Tet-OFF-Systems	29
2.8	Lösungen für Untersuchungen an Primärzellkulturen des Gehirns und des Uterus von Mäusen	29
2.9	Lösungen für histologische Analysen	30
2.10	Lösungen für die Mikroinjektion	32
2.11	Anästhetikum	32
2.12	Reagenziensätze	32
2.13	Oligonukleotidstartermoleküle	33
2.14	Größenstandards	35
2.15	Plasmide	35
2.16	Bakterienstämme	36
2.17	Eukaryontische Zelllinien	36
2.18	Mauslinien	36
2.19	Antikörper	37

2.19.1	Primärantikörper	37
2.19.2	Sekundärantikörper	38
3.	Methoden	39
3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	39
3.1.1	Analytische Plasmid-Isolierung (Minipräparation)	39
3.1.2	Präparative Plasmid-Isolierung (Midipräparation)	39
3.1.3	Präparative, endotoxinfreie Plasmid-Isolierung (Maxipräparation)	40
3.1.4	Isolierung genomischer DNA aus Maus-Schwanzspitzen	40
3.1.5	Isolierung genomischer DNA aus Organen	40
3.1.6	Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen der Maus	41
3.1.7	Aufreinigung von DNA aus embryonalen Dottersäcken	41
3.1.8	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	41
3.1.9	Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben	42
3.2	Enzymatische Modifikationen von DNA	42
3.2.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	42
3.2.2	Glättung überhängender einzelsträngiger DNA-Enden	43
3.2.3	Dephosphorylierung freier 5'-DNA-Enden	43
3.2.4	Ligation von DNA-Fragmenten	43
3.3	Elektrophorese	44
3.3.1	Native Agarose-Gelelektrophorese von DNA	44
3.3.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA	44
3.4	Nukleinsäure-Analysen	44
3.4.1	Die Polymerase-Kettenreaktion	45
3.4.2	RT-PCR-Analysen	48
3.4.2.1	Reverse Transkription zur cDNA-Herstellung	48
3.4.2.2	PCR zur Amplifikation umgeschriebener RNA	49
3.4.2.3	Real-Time RT-PCR zum quantitativen Abgleich von Transkriptmengen	50
3.4.3	Southern Blot-Analyse	51
3.4.3.1	Restriktionsspaltung, Gelelektrophorese und Transfer	51
3.4.3.2	Sondenmarkierung, Hybridisierung, Waschen und Autoradiografie	51
3.4.4	Northern Blot-Analyse	52
3.5	Kompetente Bakterien und Transformation	52
3.5.1	Herstellung hocheffizienter transformationskompetenter Bakterien	52
3.5.2	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	53
3.6	Zellkulturtechniken	53
3.6.1	Kultur von ES-Zellen	53
3.6.1.1	Auftauen und Einfrieren von ES-Zellen	53
3.6.1.2	Gelatinisieren von Zellkulturplastikgefäßen	54
3.6.1.3	Passagieren von ES-Zellen	54
3.6.1.4	Elektroporation von ES-Zellen zur homologen Rekombination	54
3.6.1.5	Selektion und Expansion von G418 resistenten ES-Zellklonen	55
3.6.1.6	Isolierung von ES-Zellklonen	55
3.6.2	Kultur von HeLa-Zellen	55
3.6.2.1	Einfrieren und Auftauen von HeLa-Zellen	55
3.6.2.2	Passagieren von HeLa-Zellen	56
3.6.2.3	Transiente Transfektion mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation	56
3.7	Anlegen von Primärzellkulturen von Gehirn und Uterus transgener Mäuse	56
3.7.1	Gemischte Primärzellkultur von Neuronen und Astrozyten	56
3.7.2	Primärzellkultur uteriner Glattmuskelzellen	57
3.8	Mikroinjektionen in adhärent wachsende Kulturzellen	57
3.9	Biocytin-Injektionen in hippocampale Dickschnitte transgener Mäuse	58

3.10	Isolierung und Nachweis von Proteinen	59
3.10.1	Immunoblot-Analyse	59
3.10.2	Immunpräzipitation	60
3.10.3	Kryoschnitte, Dickschnitte und Immunfluoreszenz-Untersuchungen	61
3.10.4	Immunfluoreszenzfärbung an Primärkulturzellen	62
3.10.5	X-Gal-Färbungen von Zellen und Geweben	62
3.10.5.1	X-Gal-Färbung transfizierter Zellen	62
3.10.5.2	X-Gal-Färbung an Gewebe-Kryoschnitten	63
3.10.5.3	Nachweis des grün fluoreszierenden Proteins (eGFP) in lebenden Zellen und Gewebedickschnitten	63
3.11	Herstellung und Verwendung verschiedener Mauslinien	63
3.11.1	Erzeugung, Haltung und Handhabung transgener Mäuse	63
3.11.2	Zucht- und Haltungsbedingungen von Mäusen	63
3.11.3	Superovulation von C57BL/6-Spenderweibchen	64
3.11.4	Injektion von ES-Zellen in Blastozysten und Retransfer in scheinschwangere Weibchen	64
3.11.5	Erzeugung der Cx43 ^{TetOeGFP} -Mauslinie durch Vorkerninjektion	65
3.12	Funktionale Analysen an transgenen Tieren	65
3.12.1	Induzierbare Ausschaltung von Cx43 in adulten Mäusen	65
3.12.1.1	Verwendung von Tamoxifen	65
3.12.1.2	Verwendung von Doxzyklin	66
3.12.2	Messung der gastrointestinalen Transitzeit	66
3.12.3	Bestimmung der Gewichtszunahme von Mäusen und des Wassergehalts gastrointestinalen Gewebes	66
3.12.4	Analyse der viszerale Schmerzempfindlichkeit	67
3.12.5	Kontraktionsanalysen	67
3.12.6	Bestimmung des Progesterongehalts im Blut von Mäusen	68
3.12.7	Verhaltensanalysen	68
3.12.7.1	Offenfeld-Test	68
3.12.7.2	Objekterkennung	69
3.12.7.3	Gestaffelter Ängstlichkeitstest	69
3.12.7.4	Rotarod-Test	69
3.12.8	Neurochemische Analysen	70
3.12.9	Untersuchung der Epilepsieneigung transgener Mäuse (Timm-Färbung)	70
3.13	Morphologische und histologische Untersuchungen	72
3.13.1	Eosin-Färbung von Kryoschnitten	72
3.13.2	Myeloperoxidase-Färbung von Darmgewebe	72
3.13.3	Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat-Diaphorase Histochemie	72
3.13.4	Untersuchung auf Hyperplasie	73
3.13.5	Acetylcholin-Esterase-Färbung	73
3.14	Statistische Auswertungen	73
4.	Ergebnisse	74
4.1	Erzeugung und Analyse von Mausmutanten mit Glattmuskel-spezifischer Ausschaltung von Connexin43	74
4.1.1	Erzeugung von Mäusen mit Glattmuskel-spezifischer Deletion von Connexin43 im Darm	74
4.1.1.1	SM-CreER ^{T2} vermittelt <i>in vivo</i> eine effiziente Deletion von Cx43 in glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltrakts	74
4.1.1.2	Neben Cx43 wird nur Cx45 in der glatten viszerale Muskulatur der Maus exprimiert	76
4.1.1.3	Die Glattmuskel-spezifische Cx43-Deletion führt zu einer Verdickung der	

	Muskelzellschicht und zu morphologischen Anomalien des Auerbach-Plexus	77
4.1.1.4	Tamoxifen-behandelte Cx43 ^{fl/fl} :SM-CreER ^{T2} -Tiere zeigen eine verstärkte neutrophile Infiltration des intestinalen Muskels	78
4.1.1.5	Die spezifische Deletion von Cx43 in glatten Muskelzellen führt zu verschiedenen funktionalen Veränderungen	79
4.1.2	Erzeugung von Mäusen mit Glattmuskel-spezifischer Deletion von Connexin43 im Uterus	82
4.1.2.1	Im Myometrium führt SM-CreER ^{T2} zu einer Deletion von Cx43 in 30-40% der glatten Muskelzellen <i>in vivo</i>	82
4.1.2.2	Der Verlust von Cx43 in primären Glattmuskel-Zellkulturen führt zu einer Reduktion des interzellulären Farbstofftransfers	83
4.1.2.3	Die zelltypspezifische Deletion von Cx43 in myometrialen Glattmuskelzellen <i>in vivo</i> beeinflusst das Geburtsverhalten	84
4.1.2.4	Die Expressionsstärke ausgewählter Kontraktions-assoziiierter Protein-Gene und der Progesterongehalt wird durch die Deletion des Cx43-Locus nicht verändert	85
4.1.3	Überprüfung der SM-CreER ^{T2} -vermittelten Deletion in glatten Muskelzellen anderer Gewebe	86
4.2	Untersuchungen zur induzierbaren, Neuronen-spezifischen Expression von Connexin43 unter Verwendung des Tet-OFF-Systems	88
4.2.1	Erzeugung von Mäusen zur induzierbaren, Neuronen-spezifischen Expression von Cx43	88
4.2.2	Untersuchung der neuronalen Expression des Cx43 ^{TetOeGFP} -Transgens an Primärzellen und Hirnschnitten	90
4.2.2.1	Die Cx43-Expression ist mit der eGFP-Fluoreszenz transgener Neurone kolokalisiert	90
4.2.2.2	Adulte Cx43 ^{TetOeGFP} :CaMKII-tTA-Tiere zeigen eine Neuronen-spezifische Expression des Transgens in vielen Hirnarealen	91
4.2.3	Funktionelle Analysen des Kopplungsverhaltens transgener Neurone <i>in vitro</i> und <i>in situ</i> .	96
4.2.3.1	Primärzellkulturen neonataler Cx43 ^{TetOeGFP} :CaMKII α -tTA-Tiere zeigen eine neuronale, Connexin43-vermittelte Farbstoffkopplung	96
4.2.3.2	Die Expression des Cx43 ^{TetOeGFP} -Transgens führt zu einer Kopplung hippocampaler Pyramidenneurone, nicht aber zu einer Kopplung zwischen Neuronen und Astrozyten	98
4.2.3.3	Das transgene Cx43-Protein wird im Hippocampus doppelt-transgener Mäuse mit zunehmendem Alter phosphoryliert	100
4.2.4	Untersuchung verhaltensspezifischer und neurochemischer Konsequenzen der Expression des Cx43 ^{TetOeGFP} -Transgens	101
4.2.4.1	Cx43 ^{TetOeGFP} :CaMKII α -tTA-Tiere zeigen Verhaltensauffälligkeiten	101
4.2.4.2	Der Gehalt an Neurotransmittern und deren Metaboliten ist in doppelt-transgenen Mäusen verändert	103
4.2.5	Untersuchung der Epilepsie-Anfälligkeit transgener Tiere	104
4.2.5.1	Adulte Cx43 ^{TetOeGFP} :CaMKII α -tTA-Tiere zeigen eine erhöhte Epilepsie-Anfälligkeit	104
4.2.5.2	Die Histologie des Hippocampus epileptischer, doppelt-transgener Tiere ist verändert	105
4.3	Herstellung und Analyse von Mausmutanten mit zelltypspezifischem Ersatz von Cx45 durch die kodierende Region von Cx36	108
4.3.1	Klonierung des konditionalen „Knock-in“ Vektors pCx45KICx36-IRES lacZ	108
4.3.2	Klonierung des HeLa-Testvektors pCMVCx36-IRES-lacZ	110
4.3.3	Erzeugung und Analyse homolog rekombinierter Maus ES-Zellen	111
4.3.4	Erzeugung und Analyse von transgenen Cx45KI36-Mäusen	112

4.3.4.1	Erzeugung von chimären Tieren mittels Blastozysteninjektion homolog rekombinierter ES-Zellen	112
4.3.4.2	Überprüfung transgener Mäuse durch PCR-, Southern Blot-, RT-PCR- und Immunpräzipitations-Analytik	112
4.3.5	Charakterisierung der Cx36- und LacZ-Expression in verschiedenen Geweben	116
4.3.5.1	Expression in Gehirn und Retina	116
4.3.5.2	Expression im Herz	118
4.3.5.3	Expression in Niere und Darm	120
4.3.6	Erste Untersuchungen zum funktionellen Ersatz von Cx45 durch Cx36	122
4.3.6.1	Homozygote Cx45KI36 ^{ki/ki} -Tiere versterben <i>in utero</i>	122
4.3.6.2	Nestin-Cre- nicht aber SMMHC-Cre-vermittelter Ersatz von Cx45 durch Cx36 führt zu morphologischen Veränderungen des enterischen Nervensystems	122
4.3.6.3	Cx36 kann möglicherweise die Cx45-vermittelte interzelluläre Kopplung in der retinalen Reizweiterleitung ersetzen	123
5.	Diskussion	124
5.1	Zelltypspezifische Inaktivierung von Connexin43 in viszerale Glattmuskelzellen des Darms	124
5.1.1	SM-CreER ^{T2} vermittelt eine vollständige Deletion der Cx43-kodierenden Region in Darm-Glattmuskelzellen	124
5.1.2	Die Darmwand Tamoxifen-behandelter Cx43 ^{fl/fl} :SM-CreER ^{T2} -Tiere weist histologische Veränderungen und Zeichen einer Entzündung auf	125
5.1.3	Cx43-defiziente viszerale Glattmuskelzellen zeigen eine veränderte Kontraktilität	127
5.1.4	Der gastrointestinale Transit in Tamoxifen-behandelten Cx43 ^{fl/fl} :SM-CreER ^{T2} -Mäusen ist verlangsamt	128
5.1.5	Tiere mit Glattmuskel-spezifischer Deletion des Cx43-Gens könnten als Modell für menschliche gastrointestinale Krankheiten dienen	128
5.2	Inaktivierung des Cx43-Gens in glatten Muskelzellen des Maus-Uterus	129
5.2.1	Die SM-CreER ^{T2} -Rekombinase vermittelt die Deletion der Cx43-kodierenden Region in etwa der Hälfte der uterinen Glattmuskelzellen	130
5.2.2	Die Cx43-Defizienz wirkt sich nachteilig auf die Funktion myometrialer Glattmuskelzellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> aus	130
5.2.3	Tamoxifen-behandelte Cx43 ^{fl/fl} :SM-CreER ^{T2} -Weibchen könnten als neues Modell für das Verständnis von Geburtsvorgängen dienen	131
5.3	Untersuchungen zur induzierbaren, Neuronen-spezifischen Expression von Connexin43 unter Verwendung des Tet-OFF-Systems	133
5.3.1	Die Expression des Cx43 ^{TetOeGFP} -Transgens ist induzierbar und Neuronen-spezifisch	133
5.3.2	Die Expression des Cx43 ^{TetOeGFP} -Transgens führt zu einer altersabhängigen interzellulären Kopplung von Neuronen	134
5.3.3	Veränderungen des Verhaltens und der neurochemischen Parameter von Cx43 ^{TetOeGFP} :CaMKIIα-tTA-Tieren	136
5.3.4	Die neuronale Expression des Cx43-Proteins führt zu einer erhöhten Epilepsie-Anfälligkeit	137
5.3.5	Histopathologische Veränderungen könnten in Zusammenhang mit der Ausprägung des Cx43 ^{TetOeGFP} -Transgens stehen	139
5.4	Erzeugung einer Mausmutante zum zelltypspezifischen Austausch des Cx45- gegen das Cx36-Gen (Cx45KI36)	141
5.4.1	Der Cre-vermittelte Austausch von Cx45 gegen Cx36 und ein LacZ-Reportergen kann generell und gewebespezifisch erreicht werden	142
5.4.2	Cx36 kann möglicherweise partiell die Funktion von Cx45 während der Embryonalentwicklung übernehmen	144

5.3.3	Morphologische Veränderungen enterischer Nerven von Cx45KI36 ^{fl/fl} : Nestin-Cre-Tieren	145
5.4.4	Ersetzbarkeit heterotypischer Cx45/Cx36- durch homotypische Cx36/Cx36-Gap Junctions in der Retina	145
6.	Ausblick	147
6.1	Weitere Anwendungen der zelltypspezifischen Inaktivierung von Connexinen in viszerale Glattmuskulzellen	147
6.2	Weiterführende Untersuchungen zur neuronalen Expression von Cx43	148
6.3	Charakterisierung der Cx45KI36-Mauslinie	149
7.	Zusammenfassung	151
8.	Literaturverzeichnis	153
9.	Anhang	175
	Vektorkarten	175
	Erklärung	177

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
β -Gal	β -Galaktosidase
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Ca	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	DNA-Kopie einer RNA
cdr	kodierende Region
Cl	Chlor
CV	Reizleitungsgeschwindigkeit
Cx	Connexin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMPC	Dimethylpyrokarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Nuklease
dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
<i>dpc</i>	<i>dies post coitum</i> ; Tage nach Empfängnis
E	Embryonaler Tag
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence Reaction
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERG	Elektroretinogramm
EtBr	Etidiumbromid
EtOH	Ethanol
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FCS	Fötales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
hCG	humanes Chorion Gonadotropin
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
i.p.	intraperitoneal
K	Kalium
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
KI	„knock-in“
KO	„knock-out“
LH	luteinisierendes Hormon
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
Lsg.	Lösung
M	molar (Mol pro Liter)
mg	Milligramm
mRNA	Boten-RNA
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
n	Anzahl
Na	Natrium
neoR	Neomycinresistenzgen
NLS	Kernlokalisationssequenz
P	Postnataler Tag
p	Wahrscheinlichkeitswert
Pen/Strep	Penicillin/Steptomycin
pA	Polyadenylierungssignal

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pgk	Phosphoglyzeratkinase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RMS	Rostaler Migratorischer Strom
RT	Raumtemperatur
SB	Southern Blot
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	smooth muscle; Glattmuskel
s. u.	siehe unten
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA-Puffer
U	Enzymeinheit (Unit)
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	nicht-translatierte Region
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Immunoblot
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
α MyHC	schwere Kette des α Myosins (α Myosin Heavy Chain)
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

1. Einleitung

In tierischen Geweben ist die Ausbildung von Zellverbindungen eine Grundvoraussetzung für die Vermittlung mechanischer Stabilität und spezifischer Interaktionen zwischen einzelnen Zellen des Verbandes. Diese Zellverbindungen werden in drei funktionale Gruppen unterteilt: Abschlussverbindungen (Tight Junctions/Zonula occludens), die eine Diffusionsbarriere in Epithelien ausbilden, Haftverbindungen (Adherens Junctions/Zonula adhaerens und Desmosomen/Macula adhaerens), die das Zytoskelett über Zellgrenzen hinweg verbinden sowie einem Gewebe auf diese Weise Stabilität verleihen, und kommunizierende Verbindungen (Gap Junctions/Nexus), die in den folgenden Abschnitten genauer erläutert werden.

1.1 Gap Junctions

Gap Junctions sind Zell-Zell-Verbindungen, die die zytoplasmatischen Kompartimente benachbarter Zellen miteinander verbinden. Der Begriff „Gap Junction“ (Lückenverbindung) geht auf elektronenmikroskopische Beobachtung benachbarter Zellmembranen zurück, die auf 2 bis 5 nm anstelle des sonst üblichen Abstandes von 20 bis 30 nm (Revel und Karnovsky, 1967) angenähert sind.

Zwei vermutlich durch konvergente Evolution entstandene Familien dieser Zellverbindungen mit ähnlicher Struktur und Funktion wurden sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten nachgewiesen. Die Gap Junctions der Invertebraten werden dabei durch Innexin-Proteine (Phelan, 2005), die kommunizierende Zellverbindungen von Vertebraten durch Connexine (Willecke et al., 2002; Eiberger et al., 2001) aufgebaut. Homolog zu den Innexinen der Invertebraten sind die Pannexine der Vertebraten (Panchin et al., 2000), die unter anderem im Gehirn elektrische Synapsen ausbilden könnten (Bruzzone et al., 2003). Die folgenden Ausführungen beziehen sich ausschließlich auf die von Connexinen aufgebauten Gap Junctions der Säugetiere.

1.2 Struktur und Funktion von Gap Junction-Kanälen

1.2.1 Struktur der Gap Junctions

Als Gap Junction-Plaques wird die Zusammenlagerung vieler Gap Junction-Einzelkanäle bezeichnet, wobei jeder Einzelkanal aus zwei Halbkanälen, den Connexonen, besteht. Jede Nachbarzelle steuert zur Ausbildung des Vollkanals jeweils ein Connexon bei (Nicholson, 2003). Ein Halbkanal setzt sich dabei aus einem Hexamer von Connexin-Proteinen (Abb 1.1 A)

zusammen. Die strukturellen Gemeinsamkeiten der bisher 20 bekannten Connexinproteine bei Nagern und 21 Connexinproteine beim Menschen (Söhl und Willecke, 2003) liegen im Aufbau aus vier α -helikalen Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Schleifen und einer zytoplasmatischen Schleife, sowie dem zytoplasmatischen Amino- und Carboxy-Terminus (Abb. 1.1 B).

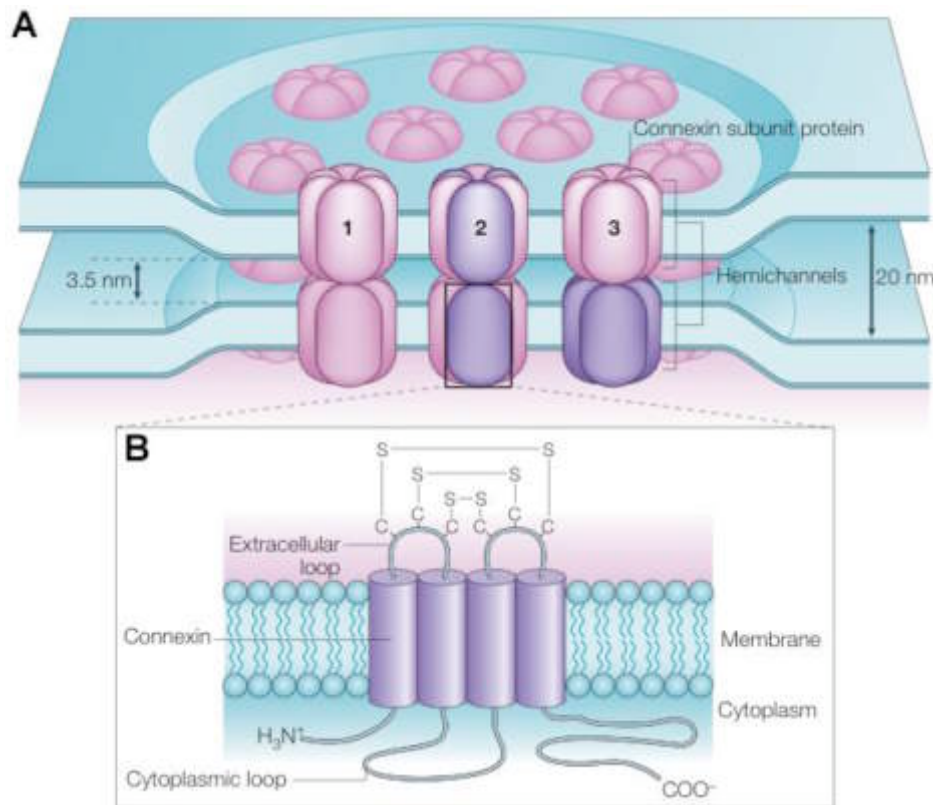


Abb. 1.1 Molekulare Organisation und schematische Topologie eines Gap Junction-Plaques (aus Söhl et al., 2005).

A Hemikanäle benachbarter Plasmamembranen können aneinander binden und so funktionale Gap Junction-Kanäle ausbilden. Dabei wurden drei verschiedene Arten von Gap Junctions, je nach molekularer Zusammensetzung, beschrieben: homomer/homotypisch (1), heteromer (2) und heterotypisch (3). Homotypische oder heterotypische Kanäle bestehen aus zwei identischen bzw. zwei unterschiedlichen Hemikanälen. Homomere oder heteromere Hemikanäle sind aus einer bzw. mehreren Connexin-Isoformen aufgebaut. **B** Connexin-Untereinheiten durchspannen die Plasmamembran vier Mal und besitzen drei konservierte Cystein-Reste (C), die für das Aneinanderbinden der Hemikanäle entscheidend sind. Einzelne Connexin-Untereinheiten können in ihrer zytoplasmatischen und carboxyterminalen Domäne variieren. S-S stellt konservierte Disulfidbrücken der extrazellulären Domäne der Connexine dar.

Deutliche Sequenzunterschiede finden sich vor allem in der zytoplasmatischen Schleife und dem Carboxy-Terminus, die beide für die Regulation der Kanaleigenschaften besondere Bedeutung haben. Letztere kann in ihrer Länge zwischen 16 (Cx26; Zhang und Nicholson, 1989) und 269 (Cx57; Hombach et al., 2004) Aminosäuren variieren. Der Carboxy-Terminus dient auch der Interaktion mit anderen Proteinen, so konnte für das Cx43-Protein unter anderem eine

Interaktion mit dem Zonula occludens Protein ZO-1 sowie α - und β -Tubulin nachgewiesen werden (Toyofuko et al., 1998; Giepmans et al., 2001).

Die meisten Connexine oligomerisieren im Golgi-Apparat (Musil und Goodenough, 1993) und gelangen als Halbkanäle in die Zellmembran, bis sie an der Außenseite in bereits bestehende Plaques integriert werden (Gaietta et al., 2002). Die Entfernung von Connexin-Proteinen aus der Membran erfolgt über die Bildung annulärer Gap Junctions (Jordan et al., 2001) sowie lysosomalen oder proteasomalen Abbau (Laing et al., 1998).

Zur Bezeichnung der Connexine existieren zwei Nomenklaturen. Seit 1988 werden die Proteine nach dem aus der cDNS abgeleiteten theoretischen Molekulargewicht in Kilodalton (kD) sowie der Abkürzung „Cx“ benannt (Beyer et al., 1988), wobei eine Abkürzung für die jeweilige Spezies vorangestellt werden kann (z.B. „h“ für human, „m“ für Maus oder „r“ für Ratte). Andererseits werden Connexine entsprechend ihrer Sequenzähnlichkeit und Länge der zytoplasmatischen Schleife den Gruppen α , β , γ , δ und ϵ zugeteilt, wobei die Gruppenmitglieder unter Voranstellung der Abkürzung „Gj“ (Gap Junction) in der Reihenfolge der Entdeckung nummeriert werden. Die meisten Connexine werden den zwei Hauptklassen der alpha- (Länge der Schleife zwischen 48 und 55 Aminosäurereste) und beta-Gruppe (Länge der Schleife zwischen 28 und 35 Aminosäurereste) zugeordnet (Gimlich et al., 1990; Söhl et al., 1998; Eiberger et al., 2001). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Connexin-Isoformen werden in der Literatur alternativ als Cx45 oder Gj α -7, Cx43 oder Gj α -1 und Cx36 oder Gj α -9 bezeichnet.

Connexingene weisen neben der Proteinstruktur auch eine ähnliche genomische Organisation auf. Sie bestehen aus zwei Exonen, wobei das untranslatierte Exon1 durch einen Intronbereich von Exon2 getrennt ist, das die komplette kodierende Region enthält (Zhang und Nicholson, 1989; Hennemann et al., 1992). Ausnahmen bestehen für die Connexingene Cx36, Cx39, Cx57, hCx31.3 und Cx23, bei denen eine Verteilung der kodierenden Region auf zwei oder drei Exone nachgewiesen wurde (Söhl und Willecke, 2003).

1.1.2 Funktion von Gap Junction-Kanälen

Gap Junction-Kanäle ermöglichen die regulierte elektrische und metabolische Kopplung von Zellen. Die von den Connexinen gebildeten hydrophilen Poren ermöglichen einen Austausch von Ionen, Zweitbotenstoffen und kleinen Metaboliten bis zu einer Größe von 1,8 kD (Übersicht in: Nicholson et al., 2000; Neijssen et al., 2005). Entsprechend der Connexin-Isoformen variieren die Kanäle in ihrer Permeabilität (Qu und Dahl, 2002) und ihrer Einzelkanalleitfähigkeit (Elfgang et al., 1995; Brink et al., 2000). Durch die verschiedenen Möglichkeiten der

Kanalzusammensetzung ergeben sich sowohl in der Entwicklung als auch in adulten Geweben vielfältige Möglichkeiten der interzellulären Kommunikation (Kumar und Gilula, 1996; Delmar, 2002). Diese Vielfalt wird durch die für einige Connexine kürzlich beschriebene Funktionalität von ungepaarten Halbkanälen noch erweitert (Goodenough und Paul, 2003).

In neuronalen Geweben dienen Gap Junctions einer schnellen Reizweiterleitung (Zoidl und Dermietzel, 2002) sowie der Synchronisation von Neuronen (Landisman et al., 2002). Als „elektrische Synapsen“ (Revel und Karnovsky, 1967; Bennett, 1997) gewährleisten Gap Junctions z.B. die synchrone Kontraktion des Arbeitsmyokards im Herzen (Gros und Jongsma, 1996; Severs et al., 2004). Der Verlust von Connexingenen kann in Mausmodellen zu Störungen der Embryonalentwicklung führen (Reaume et al., 1995; Krüger et al., 2000; Kumai et al., 2000). Connexinen wird zudem gewebespezifisch eine Funktion als Tumorsuppressoren zugeschrieben (Temme et al., 1997; Zhang et al., 2003).

1.1.3 Regulation der Gap Junction-Kanäle

Die Leitungs- und Schließ Eigenschaften der Gap Junction-Kanäle werden auf unterschiedliche Weise reguliert. Obwohl Gap Junctions permeabel für Ca^{2+} -Ionen und Protonen sind, können im Zuge pathologischer Veränderungen auftretende Schwankungen der intrazellulären Ionenkonzentration zu einem Verschluss der Kanäle führen (Peracchia et al., 2000; Stergiopoulos et al., 1999). Ein lokal begrenzter Abfall des extra- und intrazellulären pH-Wertes tritt unter pathologischen Begebenheiten in Folge einer Sauerstoff-Unterversorgung (Hypoxie) auf. Diese kann z.B. durch unzureichende Blutzufuhr durch die Minderdurchblutung (Ischämie) eines Gewebes ausgelöst werden. Gap Junction-Kanäle zeigen unter ischämischen Bedingungen einen schnellen Verschluss der Kanalpore, wobei die pH-Sensitivität von der Connexin-Zusammensetzung eines Connexons abhängig ist (Spray und Burt, 1990; Francis et al., 1999). Für Cx43-Connexone wird ein intramolekulares Ball-und-Kette- (engl: “Ball-and-Chain“) Modell postuliert (Übersicht in: Delmar et al., 2004), vergleichbar der Inaktivierung spannungs-abhängiger Kaliumkanäle (Hoshi et al., 1990). Hierbei dient eine Peptidsequenz aus dem Bereich der carboxyterminalen Domäne (Duffy et al., 2001) als Partikel (“Ball“), der bei intrazellulärem Anstieg der Protonenkonzentration die hydrophile Kanalpore verschließt. Auch zahlreiche andere Einflüsse können zu einem Verschluss von Cx43-Gap Junction-Kanälen mittels des „Ball-and-Chain“-Mechanismus führen. Beispielsweise erfolgt nach Stimulation mit Insulin/IGF (Homma et al., 1998), PDGF (Moorby and Gherardi, 1999) oder in Folge einer erhöhten Potentialdifferenz zwischen miteinander kommunizierenden Zellen (Moreno et al., 2002) ein Kanalverschluss.

Beim zweiten diskutierten Modell des Kanalverschlusses, dem "Irisblenden"-Modell, bewirkt eine Drehung der Connexone eine Änderung des Neigungswinkels der Connexine zueinander, so dass sich der Kanal verschließt (Unwin und Ennis, 1983; Perkins et al., 1998).

Das Öffnen und Schließen der Kanäle kann neben der beschriebenen Regulation durch die interzelluläre Ionenkonzentration auch spannungsabhängig erfolgen. Dabei zeigen die verschiedenen Gap Junction-Kanäle stark unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften: Für Cx45 wurde beispielsweise eine Spannungssensitivität von $\pm 13,4$ mV (Barrio et al., 1987), für Cx43 von ± 66 mV (Valiunas et al., 2000) und für Cx36 von ± 72 mV (Teubner et al., 2000) beschrieben. Durch Phosphorylierung der Connexin-Proteine kann entweder die Öffnung (z.B. Cx45) oder der Verschluss der Gap Junction-Kanäle (Cx43) bewirkt werden (Übersicht in: Moreno, 2005). Cx43-Gap Junction-Kanäle werden über verschiedene Mechanismen in ihrem Öffnungszustand reguliert, wobei die carboxyterminale Domäne des Proteins die Regulation vermittelt. Die C-terminale Region des Cx43-Proteins beinhaltet zahlreiche Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen (Musil et al., 1990). Die nach Phosphorylierung durch die Src-Kinase erfolgende Schließung von Cx43-Gap Junction-Kanälen verläuft nach dem „Ball-and-Chain“-Mechanismus (Zhou et al., 1999). Erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentrationen führen über Aktivierung der Proteinkinase C zu einer Reduktion der Cx43-Gap Junction-vermittelten Kommunikation (Doble et al., 2000).

Neben der Regulation des Öffnungszustandes (Kim et al., 1999; Lampe et al., 2000) wird über Phosphorylierungen auch die Halbwertszeit von Connexinproteinen beeinflusst (Musil et al., 2000). Die Degradation von Connexinen ist aufgrund ihrer sehr kurzen Halbwertszeit von ein bis fünf Stunden (Saffitz et al., 2000) ebenfalls ein Mechanismus der Gap Junction-Regulation.

1.2 Ausprägungsmuster von Connexin43 in der Maus

Die Expressionsprofile der unterschiedlichen Connexine überlappen vielfach sowohl zeitlich als auch räumlich, so dass in einem Zelltyp gewöhnlich mehr als ein Connexin exprimiert wird. Durch die Möglichkeit der Ausbildung heterotypischer Kanäle in den unterschiedlichen Geweben könnten zudem verschiedene Funktionen vermittelt werden (Übersicht in: Willecke et al., 2002; Delmar, 2002).

Die stärkste Verbreitung wurde für Cx43 beschrieben, das in der Entwicklung bereits ab dem Zweizellstadium exprimiert wird (Davies et al., 1996). Im Blastozystenstadium konnte Cx43 im Trophektoderm und der inneren Zellmasse, nach der Implantation in den Derivaten der inneren Zellmasse nachgewiesen werden (Dahl et al., 1996). Im weiteren Verlauf der Entwicklung erfolgt eine stark regionalisierte Ausprägung. Das Cx43-Protein wurde bei der Isolierung von Gap

Junction-Plaques aus dem Herzen entdeckt (Manjunath et al., 1984). Im adulten Herz wird Cx43-Protein insbesondere im Arbeitsmyokard exprimiert (Übersicht in: Severs et al., 2004). Weitere Expressionsorte sind z. B. Myoblasten der Skelettmuskeln und wandernde Neuralleistenzellen (Ruangvoravat und Lo, 1992; Yancey et al., 1992; Constantin und Cronier, 2000), Zellen der glatten Muskulatur und des Endothels der Gefäße (Christ et al., 1996), Keratinozyten der Basalschicht und des Stratum spinosum der Haut (Kretz et al., 2003), Leydig und Sertoli-Zellen im Hoden und Cumuluszellen sowie Oozyten des Ovars (Roscoe et al., 2001; Juneja et al., 1999), hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks (Dorshkind et al., 1993), Thymusepithelzellen und Thymocyten (Alves et al., 1995), follikuläre dendritische Zellen und Lymphozyten der Keimzentren sekundärer Lymphorgane wie der Milz (Krenacs et al., 1997), Osteoblasten (Castro et al., 2003) und Odontoblasten der sich postnatal entwickelnden Zähne (Murakami et al., 2001). Im Folgenden wird die funktionale Expression des Cx43-Proteins für drei Gewebe, die im Zentrum dieser Arbeit stehen, genauer beschrieben.

1.2.1 Das gastrointestinale System

Im Magen-Darm-Trakt findet der enzymatische Aufschluss der Nahrung, die Resorption von Nahrungsstoffen und Wasser sowie die Ausscheidung unverdaulicher oder nicht verwertbarer Nahrungsbestandteile statt. Neben Enzymen sind zusätzlich verschiedene Bakterien an der Verdauung beteiligt. Die Kompartimentierung des Magen-Darm-Traktes ermöglicht eine stufenweise Zerkleinerung, Durchmischung und Verdauung der Nahrung. Die grobe Unterteilung des gastrointestinalen Systems besteht in Magen, Dün- und Dickdarm, wobei beim Dünndarm drei Abschnitte unterschieden werden: Im Zwölffingerdarm (Duodenum) wird die Nahrung durch Verdauungssäfte von Leber bzw. Galle, Bauchspeicheldrüse und der digestiv-resorbierenden Oberfläche des Dünndarmepithels aufgeschlossen. In Leer- (Jejunum) und Krummdarm (Ileum) findet die hauptsächliche Resorption der Nahrungsbestandteile über die Gefäße der Darmzotten der Schleimhaut (Mucosa) statt.

Ein wesentliches Merkmal des Magen-Darm-Kanals ist der oral-anal gerichtete Transport der Nahrung. Verursacht wird der Weitertransport eines im Darm befindlichen Bolus durch eine Kontraktion oral und Relaxation der Muskulatur anal des Bolus. Dieser schon 1899 von Bayliss und Starling als „law of the intestine“ beschriebene peristaltische Reflex kann sowohl durch mechanische Reizung von Muskulatur und Mucosa als auch durch luminal verabreichte chemische Stimuli ausgelöst werden (Bayliss und Starling, 1899; Magnus, 1904). Die glatte intestinale Muskulatur (Tunica muscularis) sorgt dabei sowohl für eine gute Durchmischung des Speisebreis als auch für den Transport mittels peristaltischer Bewegungen (Kontraktionen der

Darmwand). Diese Doppelfunktion wird durch eine Schicht äußerer, longitudinaler (längs verlaufend) und luminal liegender, zirkulärer (kreisförmig, quer verlaufend) Muskelzüge übernommen. Gleichzeitig wird die Darmwand durch das enterische Nervensystem (ENS) innerviert, das zwischen den einzelnen Wandschichten ausgebildet ist (Abb. 1.2).

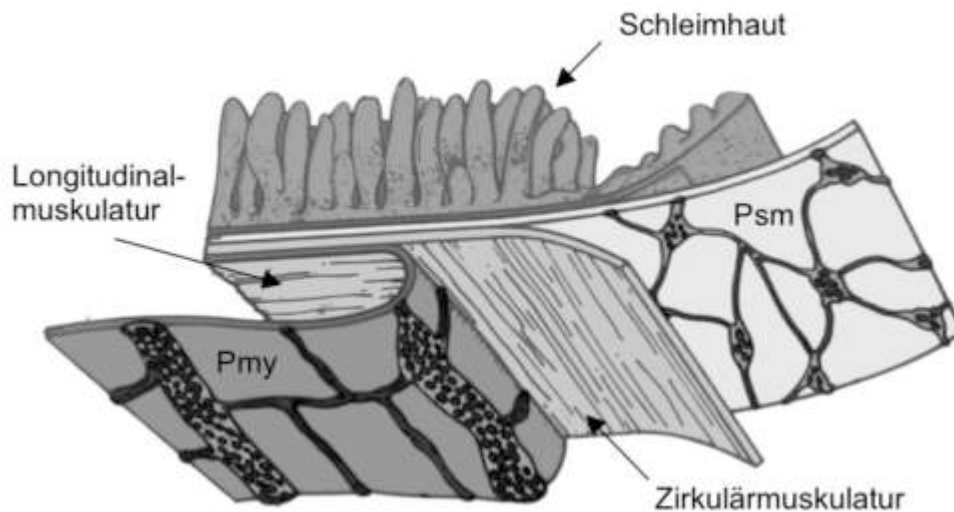


Abb. 1.2 Schematische Übersicht des anatomischen Aufbaus der Dünndarmwand (nach Daniel et al., 2001).

Gezeigt ist ein Schnitt durch die Wand des eröffneten Darmrohrs. Oben ist die zum Darmlumen orientierte Schleimhaut (Mucosa) mit Darmzotten dargestellt, darunter folgt die Submucosa mit dem Plexus submucosus Meissneri (Psm; tiefer muskulärer Plexus). Zwischen zirkulärer und longitudinaler Muskulatur (Tunica muscularis) ist der Plexus myentericus Auerbachii (Pmy) eingebettet. Das Netzwerk der „interstitial cells of Cajal“ (ICC) ist nicht dargestellt, ist aber innerhalb des tiefen muskulären und des myenterischen Plexus lokalisiert.

Die Tatsache, dass die intestinale Propulsion selbst an isolierten Darmsegmenten gerichtet erfolgt (Langley und Magnus, 1905; Langley, 1921), verdeutlicht die Fähigkeit des ENS zur autonomen Steuerung koordinierter Mechanismen. Dabei steuern nach bisherigem Kenntnisstand der Plexus submucosus und der Plexus myentericus unterschiedliche Funktionen. So werden dem luminalen Plexus submucosus überwiegend die Regulation sekretorischer Funktionen und dem Plexus myentericus die Steuerung der Motorik zugeschrieben (Timmermans et al., 1997). Extrinsische Nervenfasern des Sympathikus und Parasympathikus üben eine mehr modulierende Funktion aus.

Die interzelluläre Gap Junction-vermittelte Kommunikation ist ein gemeinsames Merkmal des gesamten gastrointestinalen Systems (Daniel und Wang, 1999). In der intestinalen Tunica muscularis verschiedener Säuger wurden drei Connexin-Isoformen beschrieben: Cx40 (Wang et al., 2001; vgl. aber auch: Nakamura et al., 1998), Cx43 (Wang et al., 2001; Seki et al., 2001; Kanczuga-Koda et al., 2004; Mikkelsen et al., 1993) und Cx45 (Wang et al., 2001; Seki et al., 2001; Krüger et al., 2000). „Interstitial cells of Cajal“ (ICC), die Schrittmacherzellen des Darms, sind durch Cx43 und Cx45 gekoppelt (Seki et al., 1998; Nakamura et al., 1998). Außerdem

wurden Gap Junction-vermittelte Interaktionen zwischen ICC und Glattmuskelzellen nachgewiesen, die möglicherweise zur Weiterleitung elektrischer Signale während der gastrointestinalen Motilität notwendig sind (Ward et al., 2004; Daniel, 2004).

Bisher wurde nur in wenigen Studien die Beteiligung von Connexinen an gastrointestinalen Krankheitsbildern untersucht (Dubina et al., 2002; Nemeth et al., 2000). Für Patienten, die an Morbus Hirschsprung leiden, einem angeborenen Fehlen von parasymphatischen Nervenzellen in der Darmwand, wurde ein Verlust des Cx43-Proteins nachgewiesen. Dadurch ist eine geregelte Darmentleerung nicht mehr möglich; es kommt zu einer schweren Verstopfung. Nemeth et al. (2000) beschrieben ein Fehlen der Cx43-Expression im aganglionischen Darm von Hirschsprung-Patienten und vermuteten, dass die eingeschränkte Kommunikation zwischen ICC und glatten Muskelzellen teilweise für das Motilitätsdefizit dieser Patienten verantwortlich sein könnte. In letzter Zeit wurden auch für andere gastrointestinale Krankheiten wie Morbus Crohn (chronische, schubweise verlaufende Entzündung aller Schichten der Darmwand) oder das Reizdarmsyndrom (Funktionsstörung des Verdauungstrakts mit chronischen Beschwerden wie Bauchschmerzen, Stuhlnunregelmäßigkeiten und Blähungen) histologische Veränderungen der ICC beschrieben. Möglicherweise könnten diese Veränderungen zu intestinalen Motilitätsstörungen beitragen, die für beide Patientengruppen beschrieben sind (Porcher et al., 2002; Törnblom et al., 2002). Eine Beteiligung von Connexinen wurde bisher nicht untersucht.

1.2.2 Der Uterus

Die Gebärmutter (Uterus) ist ein Organ des weiblichen Geschlechtsapparates, in dem sich befruchtete Eizellen weiterentwickeln. Die Innenseite des Uterus wird von der gefäßreichen Uterusschleimhaut (Endometrium) ausgekleidet. Um das Endometrium liegt eine Muskelschicht (Myometrium), die aus zirkulären und longitudinalen Glattmuskelsträngen besteht. Nach außen ist der Uterus vom Perimetrium (Tunica serosa) begrenzt (Abb. 1.3).

Während der Schwangerschaft finden kaum myometriale Kontraktionen statt. Erst kurz vor der Geburt wird das Myometrium durch die Aktivierung verschiedener Kontraktions-assoziiierter Proteingene (Challis und Lye, 1994), wie z.B. die des Oxytozin-Rezeptors, des Prostaglandin F-Rezeptors und von Cx43, zur koordinierten Kontraktion (Wehen) befähigt (Imamura et al., 2000; Palliser et al., 2004; Übersicht in: Lye, 1994).

Im Gewebe der Gebärmutter wurde die Expression verschiedener Connexingene nachgewiesen: Cx26, Cx40, Cx43 und Cx45, die während der Schwangerschaft unterschiedlich reguliert werden. Das Expressionsniveau von Cx26 ist während der späten Schwangerschaft am höchsten, fällt jedoch vor dem Einsetzen der Wehen auf niedrige Werte ab (Orsino et al., 1996). Cx40

wurde in humanen myometrialen Muskelzellen zum Zeitpunkt der Geburt nachgewiesen (Kilarski et al., 1998; Kilarski et al., 2001), es existieren jedoch keine Daten zu einer möglichen Regulation während der Schwangerschaft. Im Mensch und anderen Säugern sind Cx43-Gap Junctions im Myometrium außerhalb der Schwangerschaft selten. Kurz vor der Geburt steigt jedoch die Größe und Häufigkeit der Cx43-Plaques an (Chow und Lye, 1994; Orsino et al., 1996, Ou et al., 1997; Kilarski et al., 1998; Kilarski et al., 2001). Im Gegensatz dazu sind Cx45-Kanäle im nicht-schwangeren Myometrium und im frühen Stadium der Schwangerschaft vorhanden, werden jedoch kurz vor der Geburt in ihrer Expression herunterreguliert (Albrecht et al., 1996). Auch wenn diese Daten implizieren, dass die Ausbildung von Gap Junctions für den Ablauf von Schwangerschaft und Geburt von entscheidender Bedeutung sind, wurde bisher nicht überprüft, ob diese Vorgänge auch ohne die Beteiligung myometrialer Connexinkanäle ablaufen können.



Abb. 1.3 Transversaler Schnitt durch den Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Uterus einer Ratte (aus Risek et al., 1995).

Der Uterus ist aus luminalem (le) und Drüsenepithel (ge), endometrialem Stroma (es) und myometrialer glatter Muskelschicht aufgebaut. Das Myometrium besteht aus einer inneren zirkulären (m_c) einer äußeren longitudinalen (m_l) und einer Bindgewebsschicht (ct). Außen ist der Uterus von der einlagigen Tunica serosa (s) umgeben. am: antimesometrialer Pol, m: mesometrialer Pol des Uterus. Größenbalken: 250 μ m.

1.2.3 Das Gehirn

1.2.3.1 Aufbau und Funktion

Das Gehirn ist ein dem peripheren Nervensystem übergeordnetes Verschaltungs- und Koordinationszentrum, das aus Nervenzellen (Neuronen), ihren Fortsätzen (Axonen und Dendriten), sowie den Stützzellen (Neuroglia) besteht, die ihrerseits in Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen unterteilt werden.

Die Informationsaufnahme, -verarbeitung und -weiterleitung wird durch die Neurone geleistet. Dabei wird die Information durch die Frequenz elektrischer Impulse im Millisekundenbereich (Aktionspotentiale) kodiert. Nur durch ein Ionengefälle entlang der Plasmamembran, das durch chemo- und spannungssensitive Ionenkanäle sowie Ionenpumpen verändert wird, wird die Erregbarkeit von Neuronen gewährleistet (Lüllmann-Rauch, 2003). Die Weiterleitung der Aktionspotentiale von einem Neuron auf das andere erfolgt durch chemische oder elektrische Synapsen. Letztere werden durch Gap Junctions aufgebaut (vgl. auch 1.2.3.1, 1.3 und 1.4).

Bei den meisten Wirbeltieren wird die Anzahl der Neurone im zentralen Nervensystem (ZNS) um das Zehn- bis Fünzigfache von Gliazellen übertroffen, die nicht nur Stütz-, Ver- und Entsorgungs-, Isolations-, Schutz- und Entwicklungsfunktionen erfüllen, sondern auch direkt mit Neuronen interagieren (Lüllmann-Rauch, 2003). Astrozyten exprimieren die Connexin-Proteine Cx30 (Nagy und Dermietzel, 2000) sowie Cx43 (Dermietzel, 1998) und zeigen vielfältige Funktionen: Sie versorgen, vermutlich durch Gap Junction-vermittelte Kopplung, Neurone mit Stoffwechselprodukten wie Glukose und Laktat (Tsacopoulos und Magistretti, 1996; Giaume et al., 1997). Außerdem wirken Astrozyten neuroprotektiv, indem sie von Neuronen freigesetzte Transmitter und Ionen, beispielsweise Glutamat und Kalium, aufnehmen und damit aus der direkten Nachbarschaft der Neurone entfernen (Hansson et al., 2000; Ransom, 1996). Dies ist von besonderer Bedeutung, da hohe extrazelluläre Glutamat- und Kalium-Konzentrationen mit der Auslösung epileptiformer Aktivität im ZNS in Zusammenhang gebracht wurden (Heinemann et al., 1995). Die Gliazelltypen Oligodendrozyten und Schwannzellen exprimieren die Connexine Cx29 (Söhl et al., 2001; Altevogt et al., 2002), Cx32 (Scherer et al., 1995) und Cx47 (Menichella et al., 2003; Odermatt et al., 2003) und sind für die Myelinisierung von Neuronen im zentralen bzw. peripheren Nervensystem zuständig.

Neben der zellulären Unterteilung ist das Gehirn in größere anatomische Einheiten gegliedert (Abb. 1.4), von denen einige, für diese Arbeit wichtige, im Folgenden näher erläutert werden: Das Striatum gehört zu den Basalganglien und ist eine wichtige Schaltstelle im extrapyramidal-motorischen System. Es wird vom Putamen und Nucleus caudatus gebildet. Die Hauptaufgabe des Striatums liegt in der Hemmung von Bewegungsabläufen. Eine Degeneration führt zum Krankheitsbild des Morbus Parkinson und zu sogenannten Hyperkinesen, wie z.B. der Chorea Huntington. Die Amygdala gehört zum limbischen System. Ihre Funktion ist unbewusst und dient besonders der Signalverarbeitung und Gedächtnisbildung. Fehlfunktionen der Amygdala können beim Menschen zu einer Vielzahl von Erscheinungen wie Gedächtnisstörungen, die Unfähigkeit der emotionalen Einschätzung von Situationen, Autismus, Depression und Phobien führen. Die Hirnrinde (Cortex) ist das höchste Integrationsorgan des ZNS. Sie übt vor allem bedingt-reflektorische und analysatorische Funktionen aus und wirkt auf

sämtliche Organfunktionen und auf die tieferen Zentren des ZNS ein. Der Thalamus bildet den größten Teil des Zwischenhirns. Er setzt sich aus vielen Kerngebieten zusammen, die eine besonders starke Verbindung zum gesamten Großhirncortex aufweisen. Für eine sensibel-sensorische Bewusstseinsbildung müssen die aufsteigenden Bahnen auf ihrem Weg zum Cortex im Thalamus verschaltet werden. Im Hippocampus fließen Informationen verschiedener sensorischer Systeme zusammen, die verarbeitet und von dort zum Cortex zurückgesandt werden. Der Hippocampus wird als Struktur gesehen, die eminent wichtig für die Gedächtniskonsolidierung, also die Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis ist, während die Gedächtnisinhalte an verschiedenen anderen Stellen in der Großhirnrinde gespeichert werden.

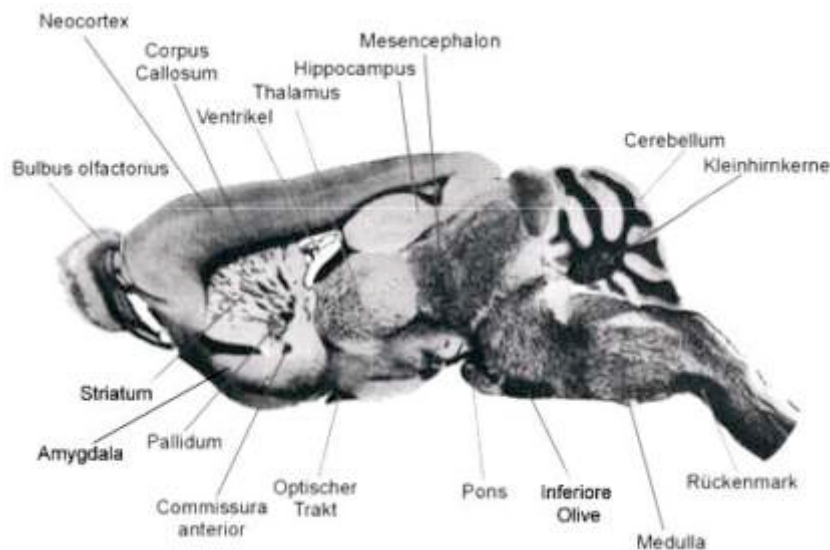


Abb. 1.4 Myelinfärbung eines Saggitalschnittes durch das Gehirn einer adulten Maus (nach Sidman et al., 1971).

Myelinreiche Regionen sind durch die Färbung dunkel markiert.

1.2.3.2 Neuronale Expression von Cx43 im undifferenzierten und adulten Gehirn

Die Entwicklung des embryonalen Gehirns ist stark von der Wanderung neuronaler Zellen geprägt. Dabei wandern Neurone, die in den proliferativen Zonen des Gehirns gebildet wurden, entlang radialer Gliafasern oder anderer Neurone zu ihren Bestimmungsorten (Übersicht in: Nadarajah und Parnavelas, 2002). Cx43 wird stark in proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen des sich entwickelnden Nagerhirns exprimiert. Vor oder während der letzten Mitose entkoppeln sich die Neuroblasten von den Verbänden und initiieren ihre Wanderung zur Cortikalplatte (LoTurco und Kriegstein, 1991; Bittman und LoTurco, 1999). Die Cortikogenese ist somit ein dynamischer Prozess, der an den Zellzyklus gekoppelt ist: Maximale Gap Junction-vermittelte Kopplung wurde in der S- und G1-Phase, Entkopplung in der M-Phase nachgewiesen (Bittmann et al., 1997). Migrierende Neurone sind nicht gekoppelt (Bittmann et al., 1997); durch Untersuchungen an Hirnschnitten neugeborener, Cx43-defizienter Mäuse konnte jedoch gezeigt

werden, dass die astrozytäre (Perez Velazquez et al., 1996) und neuronale Migration (Fushiki et al., 2003) in diesen Tieren verlangsamt ist.

Während der Differenzierung der Vorläuferzellen zu Neuronen wird das Expressionsniveau von Cx43 *in vivo* (Leung et al., 2002) und *in vitro* reduziert (Rozenal et al., 1998; Froés et al., 1999; Cheng et al., 2004). Durch Farbstoffinjektionen in den sich entwickelnden Rattencortex wurde gezeigt, dass Neurone durch dendro-dendritische Gap Junctions während der ersten 7-14 Tage der postnatalen Entwicklung stark gekoppelt sind (Peinado et al., 1993 a, b; Rörig et al., 1996 a; Bittmann et al., 2002). In adulten Dickschnitten des Rattencortex führten jedoch nur 20% der Injektionen zu einer Kopplung in maximal eine Nachbarzelle (Connors et al., 1983). Im adulten Meerschweinchen lag die Kopplung höher (44%, Gutnick und Prince, 1981). Daher sind Speziesunterschiede, auch in Bezug auf das neuronale Kopplungsverhalten in Mäusen, wahrscheinlich. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass die neuronale Differenzierung, genauer die Reifung chemischer Synapsen, erst nach der Reduktion elektrischer Synapsen eintreten kann (Fischbach, 1972; Rozenal et al., 1995).

Im adulten Gehirn konnten Rash et al. (2001) Cx43 in astrozytären Membranen, jedoch nie in Neuronen verschiedener Hirnbereiche nachweisen. Im Gegensatz dazu zeigten Theis et al. (2001) indirekt eine moderate Cx43-Expression in Neuronen verschiedener Hirnareale, so z.B. in einigen Thalamuskernen, dem Striatum und dem Riechkolben. Keine Expression konnte jedoch für cortikale und hippocampale Pyramidenzellen sowie Körnerzellen des Gyrus dentatus und cerebellare Purkinje-Neurone nachgewiesen werden.

1.2.3.3 Gap Junctions und Epilepsie

Der Begriff Epilepsie fasst eine Vielzahl von Krankheiten und Syndromen zusammen, die durch das wiederholte Auftreten von epileptischen Anfällen gekennzeichnet sind (Fröscher und Vasella, 1994). Epilepsie ist beim Menschen die häufigste chronische Erkrankung des zentralen Nervensystems mit einer Prävalenz von etwa 1,4-5,7% der Weltbevölkerung (Hauser et al., 1999). Epileptische Anfälle zeichnen sich durch wiederkehrende überschießende Erregung von Teilen oder des gesamten zentralen Nervensystems aus, die von einer sichtbaren Krampfaktivität der Körpermuskulatur begleitet werden kann. Die Ursachen für diese Übererregung sind teils auf pathologische Veränderungen (z.B. Trauma, Sauerstoffunterversorgung, Tumore), teils auf genetische Ursachen zurückzuführen. Meist sind sie jedoch unbekannt.

Epileptische Syndrome und epileptische Anfälle werden nach den Merkmalen Anfallsmuster, Ursache, Alter bei Krankheitsbeginn, auslösende Faktoren und anhand des elektroenzephalographischen Befundes klassifiziert. Der Gelegenheitsanfall wird von der Anfallserie und dem Status epilepticus unterschieden.

Eine wichtige Frage bei der Suche nach den Ursachen für die Entstehung von Epilepsie ist die nach den verantwortlichen oder zumindest beteiligten Gehirnstrukturen. Lange Zeit wurde dem Hippocampus und der Substantia nigra im Mittelhirn besonderes Interesse im Hinblick auf die Krampfausbreitung gewidmet (Stark 1992; Löscher und Ebert, 1996). Tiere, bei denen diese Strukturen verletzt oder entfernt wurden, entwickelten jedoch immer noch epileptische Anfälle, was gegen eine herausragende Bedeutung dieser Regionen für die Krampfausbreitung spricht (Racine et al., 1988, Wahnschaffe und Löscher, 1990). Der primäre olfaktorische oder piriforme Cortex (PC) ist möglicherweise an der Verstärkung und Ausbreitung von Krampfaktivität beteiligt. Es gibt Hinweise darauf, dass als Antwort auf andauernde Krampfaktivität aus einer anderen Gehirnregion (z. B. Hippocampus oder Amygdala) im PC nach neuronaler Reorganisation ein sekundärer Fokus epileptischer Aktivität entsteht, von dem sich die Krampfaktivität dann weiter ausbreiten kann (Löscher und Ebert, 1996).

Um im Tiermodell kontrolliert die Pathophysiologie der Epilepsie untersuchen zu können, werden u.a. die Glutamat-ähnliche Aminosäure Kainsäure oder das direkte Parasympathikomimetikum Pilocarpin eingesetzt. Pilocarpin kann nach systemischer Gabe einen Status epilepticus hervorrufen (Shibley und Smith, 2002). Dabei löst die Aktivierung des cholinergen Systems den Anfall aus, bei dem Glutamat freigesetzt wird, das vergleichbare neuropathohistologische Befunde wie bei der Temporallappen-Epilepsie des Menschen oder beim Kainat-Modell erzeugt (Wolf et al., 1997; Fujikawa et al., 2000; Schwob et al., 1980; Ben-Ari, 1985). Massive Neuronenverluste, verstärktes Moosfaserwachstum und spontan auftretende Anfälle können die Folge sein.

Die Beteiligung von Gap Junctions an epileptiformer Aktivität ist Gegenstand vieler Untersuchungen. Dabei wird die Gap Junction-vermittelte elektrotonische Kommunikation als wichtiger synchronisierender Mechanismus angesehen, der zusammen mit synaptischen und ionischen Effekten zur Entstehung epileptischer Anfälle beiträgt. Für die juvenile myoclonische Epilepsie wurde ein Zusammenhang zwischen Mutationen des Cx36-Gens und dem Auftreten epileptischer Anfälle gezeigt (Mas et al., 2004). In Gewebeproben des Temporallappens von Epilepsie-Patienten wurden erhöhte Mengen an Cx43-mRNA gemessen (Naus et al., 1991; Fonseca et al., 2002), wobei dieser Anstieg vermutlich auf eine Astrozyten- und weniger auf eine Neuronen-spezifische Reaktion zurückgeht. Zusätzlich konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass Kainat-induzierte epileptische Anfälle zu einer verstärkten Transkription des Cx30- (Condorelli et al., 2002), Cx32- und Cx43-Gens in Gliazellen, sowie von Cx26 und Cx45 in apoptotischen Neuronen führen (Condorelli et al., 2003).

1.3 Ausprägungsmuster und Funktion von Connexin36

Die Expression des Cx36-Gens wurde bislang ausschließlich für elektrisch erregbare Zellen wie Neurone des Gehirns und der Retina (Condorelli et al., 1998; Söhl et al., 1998; Rash et al., 2000; 2001 a, b, Degen et al., 2004), β -Zellen des Pankreas (Serre-Beinier et al., 2000; Caton et al., 2003; Degen et al., 2004) und chromaffine Zellen der Nebenniere beschrieben (Martin et al., 2001; Degen et al., 2004).

In weiteren Expressionsstudien wurde gezeigt, dass Cx36 entwicklungspezifisch reguliert wird: Ab Tag 8,5 *post coitum* (Degen, 2004) konnte der Nachweis für alle embryonalen Entwicklungsstadien erbracht werden, perinatal nimmt die Expression jedoch stark ab (Söhl et al., 1998; Belluardo et al., 2000, Gulisano et al., 2000; Liu und Jones, 2003). Im adulten Tier konnte Cx36 hirnspezifisch in GABAergen inhibitorischen Interneuronen vieler Hirnareale (Belluardo et al., 2000; Priest et al., 2001, Hormuzdi et al., 2001; Degen et al., 2004) nachgewiesen werden. Eine Übersicht über die Expression des Cx36-Proteins in der Retina wurde von Söhl et al. (2005) erstellt (Abb. 1.5).

Physiologische Analysen an Cx36KO-Mäusen wiesen auf eine gestörte neuronale Synchronisation in verschiedenen Hirnbereichen hin (Deans et al., 2001; Hormuzdi et al., 2001; Buzsaki, 2001; Buhl et al., 2003; Landisman et al., 2002; Long et al., 2002). Trotz dieser Befunde wurden bisher nur geringe senso-motorische Verhaltensauffälligkeiten sowie Veränderungen in Lern- und Gedächtnisprozessen in Cx36-defizienten Mäusen nachgewiesen (Kistler et al., 2002; Frisch et al., 2005).

Genauere Untersuchungen der Retina ergaben eine Reduktion der b-Welle des Elektretinogramms (ERG) und wiesen so auf einen Defekt bei der frühen Signalverarbeitung innerhalb der Cx36-defizienten Retina hin (Güldenagel et al., 2001). Untersuchungen von Deans et al. (2002) an Cx36KO-Mäusen zeigten zudem eine verminderte retinale Reaktion auf schwache Lichtreize, was auf ein eingeschränktes Sehvermögen bei scotopischen Lichtverhältnissen (Nachtsehen) hinweisen könnte.

In Zellkultur-Experimenten wurde gezeigt, dass durch Cx36-vermittelte Kopplung von β -Zellen des Pankreas die Insulin-Sekretion beeinflusst wird (Calabrese et al., 2001; 2003). In der Nebenniere könnte die funktionelle Kopplung chromaffiner Zellen durch Cx36-Kanäle die Catecholamin-Ausschüttung koordinieren (Martin et al., 2001).

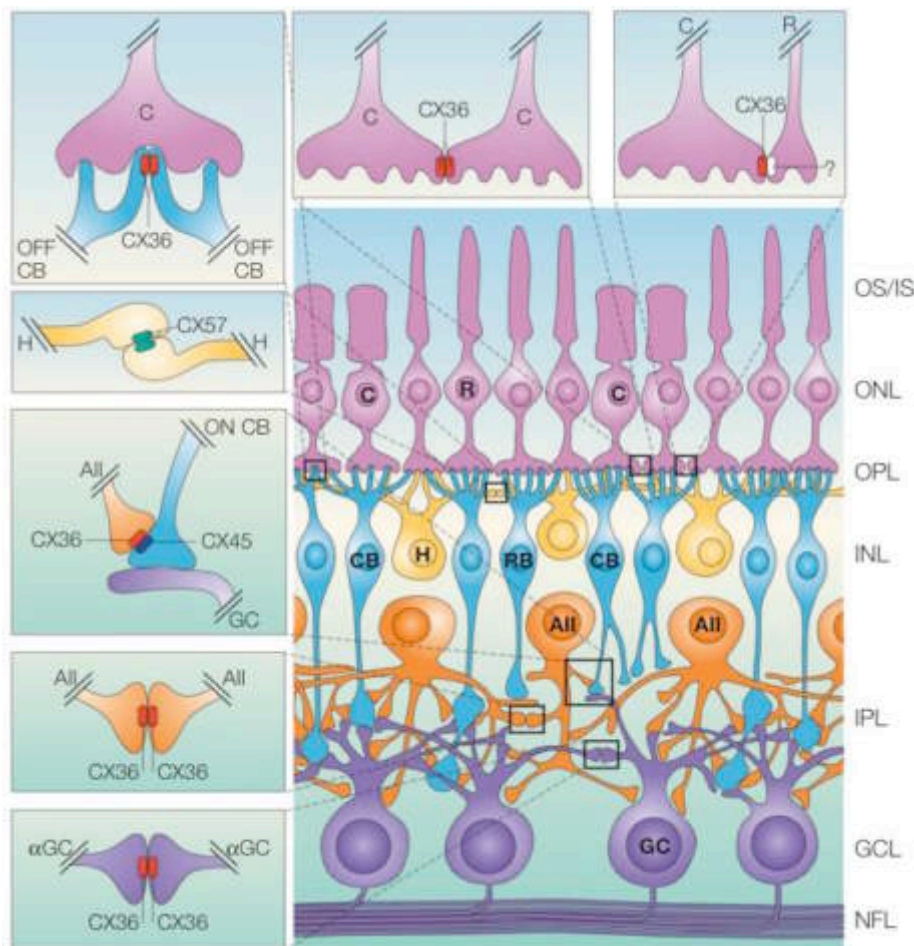


Abb. 1.5 Gap Junction-vermittelte Kopplung in der Maus-Retina (aus Söhl et al., 2005)

Die Existenz von Cx36-Gap Junctions wurde für Zapfen, Dendriten der OFF-Zapfen Bipolarzellen, AII Amakrinzellen und alpha-Ganglienzellen nachgewiesen. Heterotypische elektrische Synapsen konnten zwischen AII Amakrinzellen (Cx36) und ON-Zapfen Bipolarzellen (Cx45) gezeigt werden. Weiter wurde Cx45 in OFF-Zapfen Bipolarzellen, Amakrinzellen und bistratifizierenden Ganglienzellen nachgewiesen (nicht gezeigt). Horizontalzellen sind durch Cx57-Kanäle gekoppelt. AII: AII Amakrinzelle, C: Zapfen Photorezeptorzelle, CB: Zapfen Bipolarzelle, GC: Ganglienzelle, GCL: Ganglienzellschicht, INL: innere nukleäre Zellschicht, IPL: innere plexiforme Schicht, IS: inneres Segment, NFL: Schicht optischer Nervenfasern, ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, OS: äußeres Segment, R: Stäbchen Photorezeptorzelle, RB: Stäbchen Bipolarzelle.

1.4 Expressionsprofil und Funktion von Connexin45

Im Gegensatz zu Cx36 wurde für Cx45 ein breiteres Expressionsspektrum beschrieben. Schon in embryonalen Stammzellen (Egashira et al., 2004; Cai et al., 2004) und während der frühen embryonalen Entwicklung wurde die Expression von Cx45 nachgewiesen (Alcoléa et al., 1999; Nishii et al., 2003; Butterweck et al., 1994). Dabei zeigten Untersuchungen an Cx45-defizienten Mausembryonen, dass Cx45 eine essentielle Funktion bei der Entwicklung des Gefäß- und Kreislaufsystems übernimmt und ein Fehlen der Cx45-Kanäle zum Tod der Tiere zwischen Tag 9,5 und 10,5 der Embryonalentwicklung führt (Krüger et al., 2000). Neben Funktionen in der Ausbildung des Gefäßsystems spielt Cx45 auch für die Reizweiterleitung elektrischer Impulse des Herzens und die Entwicklung des Endokardkissens eine Rolle (Kumai et al., 2000).

Western Blot-Analysen haben gezeigt, dass Cx45 im embryonalen Gehirn stark exprimiert wird, die Expression jedoch während der zweiten postnatalen Woche sinkt. Daher könnte Cx45 an der Bildung elektrischer Synapsen sowie an der Weiterleitung von Aktionspotentialen beteiligt sein, deren Aufgabe später von chemischen Synapsen übernommen wird (Maxeiner et al., 2003).

Im adulten Tier wurde Cx45 in glatten Muskelzellen der Gefäße (Li und Simard, 2001), des Uterus (Kilarski et al., 1998), der Blase (Sui et al., 2003) und des gastrointestinalen Systems (Krüger et al., 2000; Wang und Daniel, 2001), in Granulosazellen des Ovars (Okuma et al., 1996), in Cajal-Zellen (Nakamura et al., 1998), in Motoneuronen des Rückenmarks (Chang et al., 1999), im olfaktorischen Epithel und in Mitralzellen des Riechkolbens beschrieben (Zhang und Restrepo, 2002). Weiter wurde eine Expression in der Retina gezeigt (vgl. Abb. 1.5). Im Gehirn adulter Mäuse konnte Cx45 in glialen und neuronalen Vorläuferzellen, Korb- und Sternzellen des Cerebellums, in Neuronen des Thalamus, der Cortexschichten II und VI sowie der CA3/CA4-Region des Hippocampus nachgewiesen werden (Maxeiner et al., 2003). Die Expression von Cx45 im adulten Herz wurde in Kardiomyozyten sowie im Atrioventrikularknoten, His-Bündel und in Purkinjefasern des Reizleitenden Systems beschrieben (Coppen et al., 1998, 1999) und ein Zusammenhang zwischen Herzfehlern und der Regulation von Cx45 festgestellt (Yamada et al., 2003).

1.5 Genetische Möglichkeiten zur Untersuchung von Zielgenfunktionen im Mausmodell

Die *in vivo* Untersuchung individueller Genfunktionen, künstlicher oder durch spontane Mutation entstandener Gendefekte bzw. Erbkrankheiten kann mit Hilfe transgener Mäuse ermöglicht bzw. vereinfacht werden (Bradley et al., 1998; Shashikant und Ruddle, 2003). Dazu sind in der Vergangenheit verschiedene Techniken etabliert worden (Nagy et al., 2003a, b), von denen die in dieser Arbeit verwendeten im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

1.5.1 Erzeugung transgener Mäuse durch Vorkerninjektion von DNA-Sequenzen

Eine Möglichkeit zur vergleichsweise schnellen Herstellung transgener Tiere stellt die Injektion von DNA in den männlichen Vorkern befruchteter Eizellen dar (Gordon und Ruddle, 1982; Palmiter et al., 1982). Dabei kommt es zu einer zufälligen Integration der injizierten DNA in das Genom. Abhängig vom Integrationsort und der Anzahl der integrierten Kopien resultiert eine variable Expression des Transgens. Eventuelle Positionseffekte (Auswirkungen des Integrationsortes auf die Expressionscharakteristik des Transgens) lassen sich durch sogenannte

Isolatorsequenzen minimieren (Übersicht in: Müller, 2000). Diese Elemente ermöglichen eine Abgrenzung der inserierten DNA-Sequenzen gegen endogene regulatorische DNA-Bereiche wie Enhancer, Silencer oder Locus-Kontroll-Regionen. Auch können Isolatoren als Grenzen zwischen aktivem und inaktivem Chromatin wirken (Prioleau et al., 1999; Übersicht in: Bell und Felsenfeld, 1999).

1.5.2 Expressionsregulation mit Hilfe des Tetracyklin-induzierbaren Systems

Um die zeitliche und räumliche Expressionsregulation eines Gens zu erreichen, dient u.a. das von Gossen et al. (1992, 1995) vorgestellte Tetracyklin (Tet)-induzierbare System. Dieses System besteht aus drei Komponenten: dem Tet-Transaktivatorprotein (tTA), heptameren Sequenzen des tet-Resistenz-Operators (TetO) und dem Antibiotikum Tetracyklin oder seinem Derivat Doxyzyklin (Dox).

Das Tet-Transaktivatorprotein (tTA) ist ein Fusionsprotein aus dem Repressor des Tetracyklin-Resistenz-Operons des Tn10 Transposons aus *E. coli* und der Transkriptionsaktivator-Domäne des VP16-Proteins des *Herpes simplex* Virus. tTA kann durch ausgewählte Promotoren gewebespezifisch exprimiert werden. Die Tet-Repressor-Einheit des Fusionsproteins vermittelt eine hochaffine, spezifische Bindung an die heptameren Sequenzen des Tet-Resistenz-Operators stromaufwärts eines CMV-Minimalpromotors. Die Antibiotika Tetracyklin bzw. Doxyzyklin führen durch ihre Bindung an tTA zu einer Konformationsänderung, die eine Anlagerung des Repressors an den Operator verhindert (Hinrichs et al., 1994) und auf diese Weise die Transkription der nachgeschalteten Gene unterdrückt („Tet-OFF“-System, vgl. Abb. 1.6). Diese Inaktivierung des tTA-Moleküls kann schon bei sehr geringen Tetracyklin- bzw. Doxyzyklin-Konzentrationen von 20 ng/ml erreicht werden (Gossen, 1993).

Neben der Möglichkeit, tTA unter der Kontrolle verschiedener zelltypspezifischer Promotoren zu exprimieren (z.B. dem Neuronen-spezifischen CaMKII α -Promotor), kann auch die Regulationseinheit des Zielgens variiert werden. Baron et al. (1995) beschrieben einen bidirektionalen CMV-Minimalpromotor, der die gleichzeitige Regulation zweier Transkriptionseinheiten von zentral gelegenen, heptameren TetO-Sequenzen ermöglicht.

Die Funktionsweise des Tet-OFF-Systems wird anhand der in dieser Arbeit verwendeten Cx43^{TetOeGFP}- und CaMKII α -tTA-Mäuse in Abb. 1.6 erläutert.

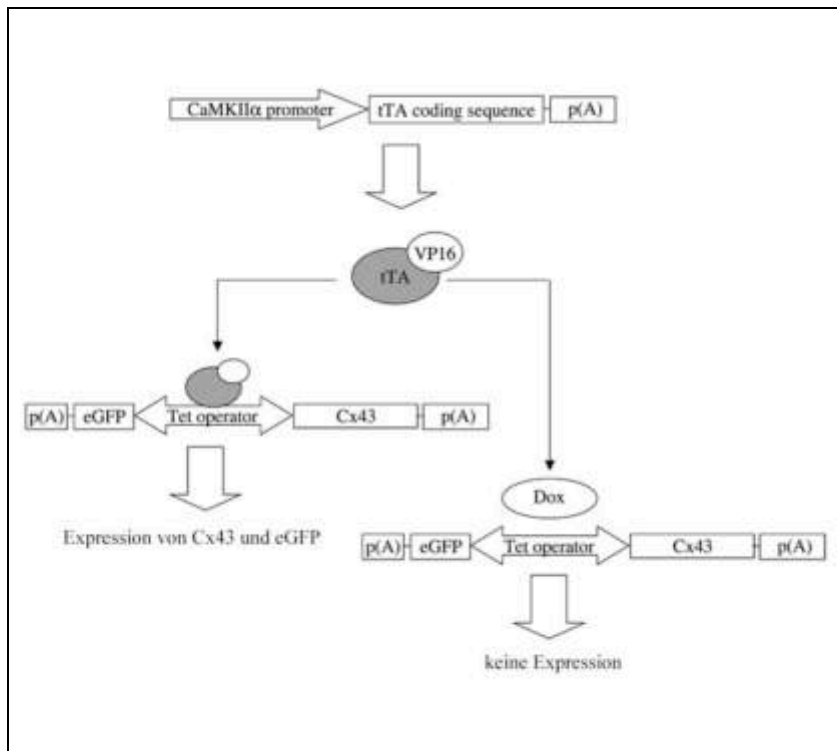


Abb. 1.6 Schematisches Modell der CaMKIIα-tTA-gesteuerten Expression von Cx43 (Tet-OFF-System).

Der Neuronen-spezifische CaMKIIα-Promotor steuert die Expression des tTA-Trans-gens, das aus dem Repressor des Tn10-Operons (*E. coli*) und der VP16-Domäne aus *Herpes simplex* besteht. In Abwesenheit von Doxzyklin (Dox) bindet das tTA-Molekül an die bidirektionale Operatorsequenz (Tet-Operator) des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens und vermittelt die Transkription von Cx43 und eGFP. Dox inhibiert die Bindung des Transaktivators und verhindert so die Expression des Cx43- sowie des Reportergens.

1.5.3 Homologe Rekombination

Bei der homologen Rekombination erfolgt der gezielte Austausch eines Gens mit Hilfe eines Austausch- oder Insertionsvektors in embryonalen Stammzellen (Hooper et al., 1987; Capecchi, 1989; Deng et al., 1993). Durch doppeltes Überkreuzen („Crossing over“) der flankierenden Bereiche mit den endogenen Homologiebereichen kann die Zielgensequenz durch die transgenen Sequenzen chromosomal ersetzt werden. Aufgrund der geringen Rekombinationsfrequenz von $1:10^6$ bis $1:10^7$ werden homolog rekombinierte ES-Zellen durch Selektion auf eingebrachte Selektionsgene angereichert. Ursprünglich wurde durch diese Methode die kodierende Region des Zielgens durch das Einbringen einer Selektionskassette soweit zerstört, dass es zu keiner funktionellen Genexpression mehr kommt („Knock out“). Als „Knock in“ werden im Gegensatz dazu transgene Ansätze bezeichnet, bei denen die kodierende Region des endogenen Gens durch die eines anderen, evtl. verwandten oder gezielt mutierten Gens ersetzt wird. Auf diese Weise lässt sich z.B. die physiologische Relevanz des Expressionsmusters verschiedener Mitglieder einer Genfamilie untersuchen.

In vitro manipulierte embryonale Stammzellen behalten ihre Totipotenz (Martin, 1981; Evans und Kaufman, 1981) und können nach Einbringen der gezielten DNA-Veränderung in Blastozysten übertragen und in scheinsschwangere Weibchen transferiert werden. Die daraus hervorgehenden Chimären können zur Erzeugung von Tieren mit der zuvor eingeführten DNA-Veränderung eingesetzt werden (Nagy et al., 2003 b).

1.5.4 Konditionale Geninaktivierung

Im Falle von Cx43 (Reaume et al., 1995) und Cx45 (Krüger et al., 2000) führt die generelle Geninaktivierung zu embryonaler oder postnataler Letalität. Mit Hilfe konditionaler Geninaktivierung in Mäuse ist es möglich, die funktionelle Bedeutung von Zielgenen in adulten Tieren oder einzelnen Zelltypen zu untersuchen.

Dazu stehen zwei Systeme zur Verfügung: Cre-loxP und Flp-frt (Kühn und Schwenk, 1997; Lewandoski, 2001), die beide auf Rekombinasen (Cre bzw. Flp) beruhen, die zwei 34 bp lange DNA-Sequenzen (loxP- bzw. frt-Sequenzen), die das Zielgen flankieren, erkennen und binden können. Die Erkennungssequenzen loxP (engl.: „locus of X-crossing over of P1“) bzw. frt (engl.: „flp-recombinase recombination target“) bestehen aus zwei 13 bp langen invertierten Sequenzwiederholungen, die eine 8 bp lange Kernsequenz umgeben. Die Cre- bzw. Flp-vermittelte Rekombination resultiert in der Deletion der markierten DNA-Sequenz, sofern die Orientierung der Erkennungsstellen gleich ist. Eine Inversion des markierten Bereichs tritt bei gegenläufig orientierten loxP-, bzw. frt-Sequenzen ein. Befinden sich die loxP-Sequenzen auf unterschiedlichen DNA-Strängen, kann eine Insertion erfolgen (Übersicht in: Nagy, 2000; Tronche et al., 2002). Eine Zielgensequenz wird dann als „gefloxt“ bzw. „geflixt“ bezeichnet, wenn sie durch zwei Erkennungssequenzen eingerahmt wird (engl.: „flanked by loxP- bzw. frt sites“) und durch die Aktivität der jeweiligen Rekombinase genomisch deletiert werden kann.

Die Cre-Rekombinase (engl.: „causes recombination“) stammt aus dem Bakteriophagen P1 (Hoess und Abremski, 1984; Hamilton und Abremski, 1984; Sauer, 1987), während die Flp-Rekombinase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert wurde (Buchholz et al., 1998). Beide Rekombinasen sind als Dimere aktiv und benötigen keine Hilfsproteine (Lewandoski, 2001).

1.5.4.1 Zelltypspezifische Ausschaltung von Zielgenen

Die Regulation der ortsspezifischen Rekombination erfolgt nicht nur durch die Positionierung der loxP- bzw. frt-Stellen, sondern vor allem durch die Regulation der Cre- bzw. Flp-Aktivität. Um eine regulierte Aktivität der Rekombinasen zu erreichen, werden Promotorkonstrukte, die die zelltypspezifische Expression der Rekombinase kontrollieren, eingesetzt. Dabei kann die kodierende Region der jeweiligen Rekombinase über Vorkerninjektion (vgl. 1.5.1) oder, um mögliche Positionseffekte bei der Transgenintegration an zufälliger Stelle im Genom zu minimieren, durch homologe Rekombination in das Genom eingebracht werden (z.B. SM-CreER^{T2}, Kühbandner et al., 2000). Mittlerweile sind für sehr viele Zelltypen ein oder mehrere spezifische Cre-Mäuse erzeugt worden (Übersicht: <http://www.mshri.on.ca/nagy/Cre.html>).

1.5.4.2 Induzierbare Kontrolle der Cre-Rekombinase-Aktivität

Um die Expression der Cre-Rekombinase nicht nur zelltypspezifisch sondern auch zeitlich zu regulieren, kann durch induzierbare Promotoren oder durch die Verwendung von Fusionskonstrukten aus der Cre-Rekombinase und einer mutierten Hormonrezeptor-Ligandenbindungsdomäne eine posttranslationale Kontrolle der Cre-Aktivität erzielt werden (Übersicht in: Metzger und Chambon, 2001). Der Wirkungsmechanismus der Liganden-regulierten Kontrolle der Cre-Rekombinase wird am Beispiel des in dieser Arbeit verwendeten Tamoxifen-induzierbaren CreER^{T2}-Systems erklärt (Abb. 1.7).

Durch die Fusion der Cre-Rekombinase mit einer spezifisch mutierten Ligandenbindungsdomäne des humanen Östrogen-Rezeptors (ER) entstand eine Tamoxifen-abhängige Cre-Rekombinase (Cre-ER^T) (Feil et al., 1996). Die eingeführte Mutation führte dabei zur Reduktion der Affinität für endogenes β -Östradiol um etwa den Faktor 10.000 (Schwenk et al., 1998). Zur Induktion der Cre-Rekombinase in Zellkulturexperimenten und *in vivo* (Zhang et al., 1996; Feil et al., 1996; Kühbandner et al., 2000) wurden statt dessen selektive Östrogenrezeptormodulatoren wie Tamoxifen und 4-Hydroxytamoxifen eingesetzt, deren Bindungsaffinität aufgrund der Mutation in der Ligandenbindungsdomäne nur etwa um den Faktor 100 verringert ist (Schwenk et al., 1998). Um die Sensitivität der CreER^T-Rekombinase für Tamoxifen weiter zu steigern, wurden verschiedene andere Mutationen getestet. Dabei zeigte die Einführung einer Tripel-Mutation, bei der drei Aminosäuren ausgetauscht wurden (CreER^{T2}), eine etwa 10-fach höhere Sensitivität als CreER^T (Feil et al., 1997).

Der Östrogenrezeptor gehört zur Gruppe der nukleären Rezeptoren, die im Zytosol vor allem mit dem Hitzeschockprotein Hsp90 Komplexe bildet. Erst nach Bindung des spezifischen Liganden löst sich diese Verbindung auf und der Ligand-Rezeptor-Komplex wandert in den Kern, wo er als Transkriptionsfaktor wirken kann (Übersicht in: Beato et al., 1995). Tamoxifen vermittelt also durch Induktion der Translokation von Cre-ER^T bzw. Cre-ER^{T2} aus dem Zytosol in den Zellkern die Aktivierung der Cre-Rekombinase (Abb. 1.7 A).

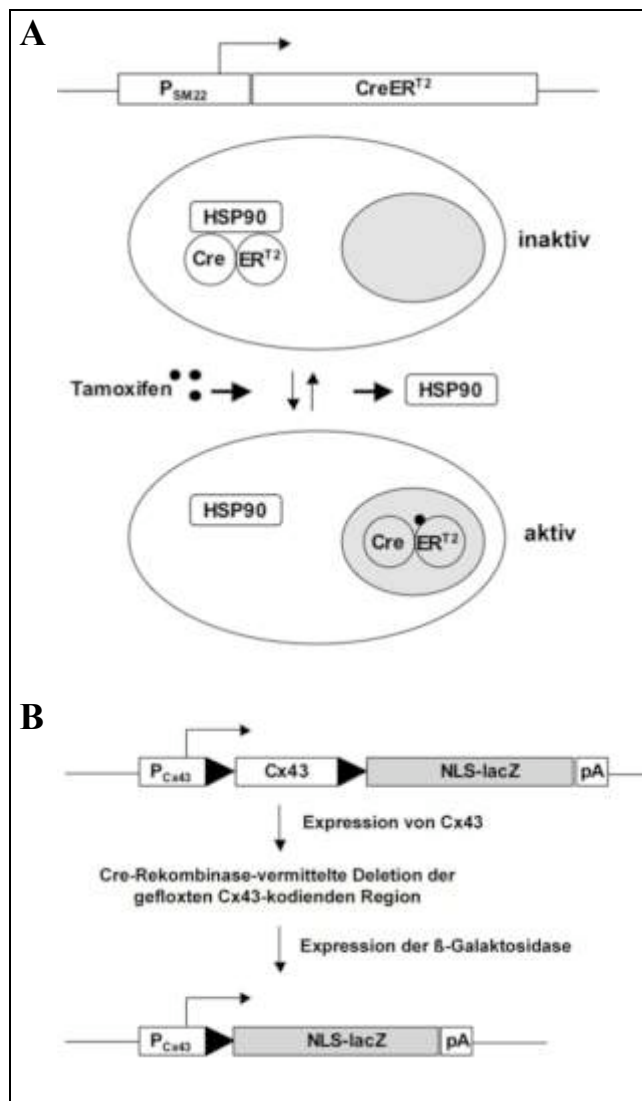


Abb. 1.7 Schematische Darstellung der induzierbaren CreER^{T2}-vermittelten Deletion der geflochtenen Cx43-kodierenden Region (modifiziert nach Eckardt, 2004).

A Das Tamoxifen-induzierbare CreER^{T2}-System beruht auf der posttranslationalen Kontrolle der Translokation der Cre-Rekombinase aus dem Zytosol in den Zellkern, in dem Cre als ortsspezifische Rekombinase wirken kann. Zunächst assoziiert das Fusionsprotein CreER^{T2} im Zytosol unter anderem mit dem Hitzeschockprotein90 (HSP90). Erst nach Zugabe des Liganden (Tamoxifen), der an die mutierte Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptoranteils von CreER^{T2} bindet, erfolgt die Dissoziation des HSP90-CreER^{T2}-Komplexes. CreER^{T2} transloziert in den Zellkern und kann die loxP-flankierte Sequenz deletieren. Die Cre-vermittelte Rekombination ist nur in den Zellen induzierbar, in denen der die CreER^{T2}-Expression kontrollierende Promotor (z. B. SM22 in Glattmuskelzellen) aktiv ist.

B Schematischer Aufbau des geflochtenen Cx43-Genlocus vor (oben) und nach Cre-vermittelter Deletion (unten). Erst nach der Deletion der Cx43-kodierenden Region (Cx43) wird das LacZ-Reportergen (NLS-lacZ) unter der Kontrolle des Cx43-spezifischen Promotors (P_{Cx43}) abgelesen. NLS: Kernlokalisations-signal, pA: poly-A-Sequenz, Dreiecke: loxP-Stellen

1.6 Anwendung des CreER^{T2}-Systems in geflochtenen Cx43-Mäusen

Um den letalen Phänotyp von Tieren mit genereller Cx43-Defizienz zu umgehen und die funktionelle Bedeutung von Cx43 Gap Junction-Kanälen in einzelnen Zellen und adulten Tieren untersuchen zu können, wurden Tiere mit loxP-flankierter Cx43-kodierender Region hergestellt, bei denen die Cre-vermittelte Deletion zur Aktivierung eines LacZ-Reporter-Gens führte (Theis et al., 2001). Neben diesen Cx43^{fl}-Tieren, die drei loxP-Stellen sowie das Neomycin-Resistenzgen enthalten, wurden auch so genannte Cx43^{2lox}-Tiere erzeugt, in denen die geflochte Resistenzkassette fehlte und die Cx43-kodierende Region von nur noch zwei loxP-Stellen umgeben war (Eckardt et al., 2004; Abb. 1.7 B).

Beide Mauslinien wurden im Rahmen dieser Arbeit für die induzierbare, zelltypspezifische Deletionen von Cx43 eingesetzt.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Zur *in vivo* Untersuchung individueller Genfunktionen sind besonders in der Mausgenetik verschiedene Techniken etabliert worden, die eine gezielte Deletion, (Über-) Expression oder den Austausch einzelner Gene ermöglichen (Nagy et al., 2003 a, b). Im Rahmen dieser Dissertation sollten daher mit verschiedenen genetischen Ansätzen Rückschlüsse auf die Funktion des jeweils veränderten Connexin-Gens gewonnen werden.

Ein Teilziel dieser Arbeit war, basierend auf dem Cre-loxP-System, eine konditionale Mausmutante mit induzierbarer, Glattmuskel-spezifischer Ausschaltung des Connexin43-Gens zu erzeugen und zu charakterisieren. Dazu sollten Cx43^{fl}- (Theis et al., 2001) bzw. Cx43^{2lox}-Tiere (Eckardt et al., 2004) mit SM-CreER^{T2}-Mäusen verpaart werden, die die Tamoxifen-abhängige Ausschaltung der Cx43-kodierenden Region in glatten Muskelzellen erlaubt (Kühbandner et al., 2000). Da die Funktion von Cx43 für die Physiologie der glatten Muskulatur im Uterus und des gastrointestinalen System *in vivo* bisher kaum untersucht wurde, sollte überprüft werden, ob das Fehlen der Cx43-Expression in viszerale glatten Muskelzellen Auswirkungen auf die koordinierte Kontraktion des Muskelsynzytiums und damit auf Geburtsvorgänge bzw. die Darmperistaltik hat.

Basierend auf dem in der Diplomarbeit hergestellten Vektorkonstrukt pTetOCMVbi-Cx43-eGFP-Isolator (Döring, 2000), wurden durch Vorkerninjektion transgene Mäuse erzeugt. Anhand dieser Cx43^{TetOeGFP}-Tiere sollte dann die Auswirkung der neuronalen Cx43-Expression mit Hilfe des Tet-OFF-Systems überprüft werden. Hierfür wurden Cx43^{TetOeGFP}-Mäuse mit CaMKII α -tTA-Mäusen (Mayford et al., 1996) verpaart und in den Nachkommen die induzierbare Neuronen-spezifische Expression des Cx43- sowie des eGFP-Transgens untersucht. Da die neuronale Cx43-Expression während der Cortikogenese herabreguliert wird, sollte die phänotypische Charakterisierung insbesondere hinsichtlich verhaltensspezifischer und Epilepsie-assoziiierter Defekte durchgeführt werden. Außerdem wurde überprüft, ob es in diesen Tieren zu einer interzellulären Kopplung zwischen dem neuronalen und astrozytären Netzwerk kommt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit lag in der Herstellung und ersten Charakterisierung von Cx45KI36-Mäusen. Dazu wurde zunächst ein Austauschvektor konstruiert, der den konditionalen Ersatz der Cx45- durch die Cx36-kodierende Region und ein LacZ-Reportergen ermöglichte. Mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus sollte anschließend der Austausch der Vektorsequenz gegen den endogenen Cx45-Locus erfolgen. Nach Verpaarung der aus diesen ES-Zellen entstandenen Mauslinie mit zelltypspezifischen Cre-Tieren wurde mit ersten Untersuchungen zur Ersetzbarkeit des Cx45- durch das Cx36-Gen begonnen, deren Expression in neuronalen Geweben partiell überlappt.

2. Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien und Medienzusätze wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen J.T. Baker, Biochrom AG, Difco, Fluka, GibcoBRL, ICN, Merck, PAA, Riedel-de Haën, Roche, Roth, Serva und Sigma in Analysenqualität bezogen. Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech unter Berücksichtigung von Kalibrierungsdatum und Halbwertszeit verwendet. Enzyme und Nukleotide lieferten die Firmen Roche, Amersham Pharmacia Biotech, Promega und New England BioLabs.

2.2 Allgemeine Lösungen und Puffer

Für molekularbiologische Grundtechniken wurden Lösungen und Puffer, wenn nicht in diesem oder in Kapitel 3 anders angegeben, entsprechend den Angaben in Ausubel et al. (1989) und Sambrook et al. (1989) angesetzt und verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Lösungen in A. bidest angesetzt und bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

2.3 Lösungen zur Nukleinsäure-Isolierung und -Analyse

Proteinase K-Lösung	20 mg/ml	Proteinase K (Roche) ad 50 ml; Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern
Laird-Lysis-Puffer	100 mM 200 mM 5 mM 0,2 % (w/v)	Tris-HCl NaCl EDTA SDS vor Gebrauch Zugabe von 3 µl Proteinase K-Lsg.
Proteinase K-Stammlsg.	20 mg/ml 50 mM 1 mM	Proteinase K (Roche) Tris-HCl CaCl ₂ Lagerung bei -20°C
ES-Lysis-Puffer	50 mM 20 mM 100 mM 0,5 % (w/v) 2 mM	NaCl Tris-HCl EDTA SDS CaCl ₂ pH 8,0. Vor Gebrauch sterilfiltrieren, Zugabe von 50 µl Proteinase K-Stammlsg. und 100 µl RNase 2000 pro ml
STET-Puffer	50 mM 50 mM 5 % (v/v) 8 % (v/v)	Tris EDTA Triton X-100 Sucrose

		auf Endvolumen mit H ₂ O auffüllen, pH 8,0
Lysozym-Stammlösung	10 mg/ml	in TE-Puffer, bei –20 °C lagern
Alkalische Lysis Lösung	25 mM 0,2 mM	NaOH (pH 12,0) EDTA, mit H ₂ O auffüllen
Neutralisations Reagenz	40 mM	Tris HCl mit H ₂ O auffüllen
RNase 2000	20 mg 20000 U	RNase A (Roche) RNase T1 (Roche) ad 10 ml. 15 min bei 100°C inkubieren, nach dem Abkühlen Lagerung bei -20°C
Partialsplaltung-Stopp- Lsg.	10 mM	EDTA (Sigma), pH 8,0
SB-Depurinierungslsg.	0,25 M	HCl
SB-Denaturierungslsg.	0,5 M 1,5 M	NaOH NaCl
SB-Transfer-Puffer	0,25 M 1,5 M	NaOH NaCl
SB-Waschlsg.		Für stringentes Waschen der Filter wurden aus SSC und SDS-Stammlösungen entsprechend verdünnte Waschlösungen hergestellt. Die vollständige Entfernung von hybridisierter Sonde erfolgt mit
	1 mM 0,1%	Tris SDS, pH 7,5
SSC (20x)	3 M 0,3 M	NaCl Trinatriumcitrat, pH 7,5
DNA-Ladepuffer (6x)	0,25 % (w/v) 0,25 % (w/v) 30 % (v/v)	Bromphenolblau (Serva) Xylencyanol (Sigma) Glycerin, Lagerung bei 4°C
TBE (10x)	900 mM 900 mM 25 mM	Tris-HCl Borsäure EDTA, pH 8,3
DMPC-Wasser	200 µl 100 ml	Dimethylpyrrolcarbonat Wasser, üN bei RT rühren, 1 h autoklavieren
MOPS-Puffer (10 x)	0,2 M 50 mM 10 mM	Morpholinopropansulfonsäure Natriumacetat EDTA, pH-Wert 7,0, autoklavieren, lichtgeschützt lagern

RNA-Probenpuffer (10 x)	1 mM 0,4% (w/v) 0,4% 50%	EDTA Bromphenolblau Xylencyanol Glycerol, Lagerung bei -20°C
RNA-Ethidiumbromid	40%	Ethidiumbromid in DMPC-Wasser bei -20°C lichtgeschützt lagern
Formamid deionisiert	100 ml 5 g	Formamid Ionenaustauscher-Harz (BIO-RAD) 30 min rühren, filtrieren, bei -20°C lagern
TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris-HCl EDTA, pH 8,0

2.4 Lösungen für Isolierung, Nachweis und Aktivitätsbestimmung von Proteinen

RIPA-Puffer	10 mM 0,1% 40 mM 2 mM 1% 0,1 %	(pH 7,2 Phosphatpuffer (Na_2HPO_4 : NaH_2PO_4 = 3:1) SDS Natriumfluorid EDTA Triton X-100, pH 7,2, 1 h autoklavieren Deoxycholat frisch zugeben
RIPA-Waschpuffer	10 mM 10 mM 1 M 40 mM 10 mM 0,2 %	Na_2HPO_4 -Lösung NaH_2PO_4 -Lösung NaCl Natriumfluorid EDTA Triton X-100
Sepharose 4B-Gel	500 µl	Sepharose 4B-Gel (Amersham) mit gleichem Volumen TBS-Puffer überschichten, bei 4°C etwa 6 Monate lagerbar
Sepharose-ProteinA-Gel	150 mg 500 µl	ProteinA Sepharose CL-4B (Amersham) TBS-Puffer, 2 h bei 4°C quellen lassen, nach Zentrifugation (5 min, 4.000 UpM, 4°C) Überstand abnehmen und mit gleichem Volumen TBS-Puffer überschichten, bei 4°C etwa 6 Monate lagerbar
Complete (25x)	1 Tablette	Complete (Roche) ad 2 ml A. bidest, Lagerung bei -20°C
Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4 % (w/v)	Tris-Base SDS, pH 6,8, sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C
Trenngelpuffer	1,5 M 0,4 % (w/v)	Tris-Base SDS, pH 8,8, sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C

Laemmli-Probenpuffer	62,5 mM 3 % (w/v) 10 % (v/v) 0,01 % (w/v) 5 % (v/v)	Tris-HCl SDS Glycerin Bromphenolblau (Serva) 2-Mercaptoethanol, pH 6,8
SDS-Laufpuffer	0,25 M 1,92 M 1 % (w/v)	Tris-Base Glycin SDS, pH 8,3
Coomassie-Färbelösg.	0,25 % (w/v) 10 % (v/v) 50 % (v/v)	Coomassie Brilliant Blue (ICN) Essigsäure Methanol, durch Faltenfilter filtrieren
Coomassie-Entfärber	10 % (v/v) 30 % (v/v)	Essigsäure Methanol
Transfer-Puffer (5x)	50 mM 100 mM 800 mM	Tris-HCl Tris-Base Glycin, pH 8,3
Transfer-Puffer (1x)	200 ml 200 ml	Transfer-Puffer (5x) Methanol, ad 1l
WB-Blockierungslsg.	5 % (w/v)	Magermilchpulver lösen in WB-Waschlsg., frisch ansetzen
WB-Waschlsg.	8,5 mM 1,7 mM 50 mM 0,1 % (v/v)	Tris-HCl Tris-Base NaCl Tween 20 (Merck)
Ponceau-Färbelsg.	0,2 % (w/v) 3 % (w/v)	Ponceau S (ICN) Trichloressigsäure lichtgeschützte Lagerung, wieder verwendbar
Hoechst 33258	0,05 % (w/v)	Hoechst 33258 (Sigma) in PBS ⁻ , lichtgeschützte Lagerung bei -20°C
IF-Waschpuffer	50 mM 1,5% (v/v) 0,3% (v/v)	Tris NaCl Triton-X-100, pH 7,6
IF-Blockierungslsg 1	5 % (w/v) 5% (v/v) 0,1% (v/v)	Bovine Serum Albumin (BSA) Newborn Goat Serum (NGS) Triton-X-100 in IF-Waschpuffer, frisch ansetzen
IF-Blockierungslsg. 2	5 % (w/v) 5% (v/v) 0,1% (v/v)	Bovine Serum Albumin (BSA) Newborn Goat Serum (NGS) Triton-X-100 in PBS ⁻ , frisch ansetzen

2.5 Lösungen für die Bakterienkultur

LB-Medium	1 %	NaCl (Merck)
	1 %	Trypton (Difco)
	0,5 %	Hefe-Extrakt (Difco)
		ad 1 l, mit ~2 ml 1 N NaOH auf pH ~7,4, 20 min autoklavieren
LB-Agar	1 l	LB-Medium
	1,5 %	Dunkel-Agar 20 min autoklavieren; ggf. Zugabe von Antibiotika bei 55°C
Ampizillin-Stammlsg.	5 %	Ampizillin (Roche) ad 50 ml, sterilfiltrierte Aliquots bei -20°C lagern; Endkonzentration in Selektionsmedien: 50 µg/ml
SOB-Medium	2 % (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefe-Extrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
		auf Endvolumen mit H ₂ O auffüllen, pH 6,9, 20 min autoklavieren
	10 mM 10 mM	MgSO ₄ (sterilfiltriert) MgCl ₂ (sterilfiltriert)
K-Mes	19,52 g	Mes in
	80 ml	H ₂ O lösen, pH 6,3 mit 5 M KOH einstellen, auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen, sterilfiltrieren, Aliquots bei -20 °C lagern
TFB-Puffer	10 mM	K-Mes
	10 mM	CaCl ₂ * 2H ₂ O
	100 mM	RbCl
	45 mM	MnCl ₂ * 4H ₂ O
	3 mM	Hexamin Co(III)Cl ₃ auf Endvolumen mit H ₂ O auffüllen, sterilfiltrieren, lichtgeschützt bei 4 °C lagern
DnD	1,53 g	Dithiotreithol
	9 ml	DMSO
	100 µl	1 M KAc auf 10 ml mit H ₂ O auffüllen, pH 7,5 sterilfiltrieren, Aliquots bei -20 °C lagern

2.6 Lösungen für Untersuchungen an embryonalen Stammzellen der Maus und HeLa-Zellen

ES-Normalmedium	500 ml	Glasgow MEM (GibcoBRL BHK-21 Medium)
	1 mM	Natrium-Pyruvat (GibcoBRL)
	1x	nicht-essentielle Aminosäuren (GibcoBRL, 100x)
	5 % (v/v)	FCS (Sigma, sterilfiltriert, mykoplasmengetestet)
	5 % (v/v)	NCS (Sigma, sterilfiltriert, mykoplasmengetestet)

	1x 0,007 % (v/v) 0,1 % (v/v)	Penicillin-Streptomycin (GibcoBRL, 100x) 2-Mercaptoethanol (Sigma, zellkulturgetestet) LIF (Eigenherstellung) bis zu zwei Wochen verwendbar, Lagerung bei 4°C
ES-Gelatine	1 %	Schweinehaut TypI-Gelatine (Sigma), 2x 1 h autoklavieren, Lagerung bei 4°C
ES-Trypsin	20 % 1 % 1 %	ES-EDTA Lösung Chicken-Serum (GibcoBRL) Trypsin (2,5 %, GibcoBRL) in ES-PBS ⁻ (GibcoBRL) Lagerung bei -20°C
ES-EDTA Lösung	5 mM	EDTA (Sigma) in ES-PBS ⁻ , pH-Einstellung (pH 7-8) mit NaOH, 1 h autoklavieren, Lagerung bei 4°C
ES-Selektionsmedium	350 µg/ml	aktive G418-Stammlsg. in ES-Normalmedium, Lagerung bei 4°C
ES-Einfriermedium (2x)	20 % 10 %	DMSO (Merck) FCS (Sigma) in ES-Normalmedium, Lagerung bei -20°C
HBS-Puffer	0,02 M 2,5 M	HEPES (GibcoBRL) Glucose (GibcoBRL) in ES-PBS ⁻ (GibcoBRL), Lagerung bei -20°C
G418-Stammlsg.	50 mg/ml 100 mM	aktives G418 Sulfat (PAA) PIPES (Sigma) sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C
HeLa-D10-Medium	500 ml 10 % 1 x	DMEM (Sigma) HeLa-FCS (Biochrom) Penicillin/Streptomycin, 100x (Sigma) Zutaten unter einer Sterilbank zugeben; Lagerung bei 4°C ca. 4 Wochen; vor Gebrauch erwärmen
Puck'sches Salin	137 mM 5,4 mM 5,5 mM 4,2 mM	NaCl (Merck) KCl (Merck) D(+)-Glucose (Merck) NaHCO ₃ (Merck) ad 1 l, sterilfiltrieren; bei -20°C lagern
HeLa-Trypsin	0,04 % 0,5 mM	Trypsin (Sigma) EDTA-Natriumsalz (Serva) ad 50 ml mit Puck'scher Saline, pH 7,5, sterilfiltrieren; Langzeitlagerung bei -20°C, sonst bei 4°C

2-fach BBS	50 mM	BES (Sigma)
	280 mM	NaCl (Merck)
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O (Merck)
		ad 50 ml, pH 6,95, sterilfiltrieren; Aliquots à 1 ml bei -20°C etwa 3 Monate haltbar
CaCl ₂ -Lösung	250 mM	CaCl ₂ (Merck)
		ad 50 ml, sterilfiltrieren; Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern

2.7 Lösungen für die Induktion der CreER^{T2}-Rekombinase und des Tet-OFF-Sytems

Tamoxifen-Injektionslg.	100 mg	Tamoxifen (Sigma)
	0,5 ml	Ethanol, abs.
	9,5 ml	Erdnussöl, im Ultraschallbad suspendieren, Lagerung bei -20°C, einmalige Verwendung
Doxyzyklin-Trinkwasser	50 mg	Doxyzyklin (Westward Pharmaceuticals Corp., NY)
	5 g	Sucrose (Sigma)
	1 l	H ₂ O, lichtgeschützt für 1-3 Tage haltbar

2.8 Lösungen für Untersuchungen an Primärzellkulturen des Gehirns und des Uterus von Mäusen

Kulturmedium neuronaler Primärzellen	90 ml	DMEM High Glucose (Sigma)
	1x	Penicillin/Steptomycin 100x (Sigma)
	1x	L-Glutamin 100x (Gibco)
	10 ml	FCS (PAA), sterilfiltrieren
Poly-L-Lysin-Lsg.	1 ml	10x Poly-L-Lysin-Stammlsg. (Sigma)
	9 ml	H ₂ O, bei -20°C lagerbar
Kulturmedium für Glattnuskelzellen (Phenolrot-frei)	8,3 g	DME Puder (Sigma)
	25 ml	1 M HEPES (Sigma)
	10 ml	Pen/Step (100.000 U/ml) (Sigma)
	10 ml	Amphotericin B (250 µg/ml) (Sigma)
	10 ml	D-Glucose (45%) (Sigma)
	20 ml	200 mM L-Glutamin (Sigma), auf 37°C erwärmen, pH 7,35 einstellen und auf 900 ml mit H ₂ O auffüllen, sterilfiltrieren
	100 ml	FCS zugeben
HBSS ++; --	9,5 g	HBSS ++; -- Puder (Sigma)
	25 ml	1 M HEPES
	10 ml	Pen/Strep
	10ml	Amphotericin B, auf 1 l auffüllen, pH 7,35, sterilfiltrieren

Initiations-Mix	20 ml	HBSS ++
	1 ml	Pen/Strep
	1 ml	Amphotericin B
Enzym-Mix	900 ml	HBSS --
	1 g	Collagenase II (148 U/mg) (Worthington Biochemical Corporation)
	1 g	BSA (Sigma)
	0,15 g	DNaseI (Roche)
	0,1 g	Trypsin Inhibitor (Sigma), pH 7,35 einstellen, sterilfiltrieren
	100 ml	FCS

2.9 Lösungen für histologische Analysen

PBS ⁻	133 mM	Natriumchlorid
	2,7 mM	Kaliumchlorid
	8,1 mM	Natriumhydrogenphosphat
	1,5 mM	Kaliumhydrogenphosphat auf Endvolumen mit H ₂ O auffüllen, pH 7,2
Formaldehyd-Stammlsg.	8 g	Paraformaldehyd in 180 ml A. bidest bei 60° C lösen, Zugabe von 1 Tropfen NaOH bis Lsg. klar wird. Nach Abkühlen auf RT Zugabe von 10 ml PBS ⁻ (10x), pH 7,2, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C
Hämatoxylin-Lsg.	0,1 %	Mayers Hämalaunlösung (Merck) Filtrieren
Eosin-Lsg.	0,1 %	Eosin Y (Fluka), filtrieren
LacZ-Fixierungslsg.	0,2 % (v/v)	Glutaraldehyd in LacZ-Basislsg., frisch ansetzen
LacZ-Basislsg.	100 mM	Natriumphosphatpuffer (aus Na ₂ HPO ₄ und NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4)
	2 mM	MgCl ₂
	5 mM	EGTA
LacZ-Waschlsg.	0,01 % (v/v)	Na-Deoxycholat (ICN)
	0,2 % (v/v)	Nonidet P40 (Roche) in LacZ-Basislsg.
LacZ-Substratlsg.	5 mM	K ₃ [Fe(CN) ₆] aus Stammlsg.
	5 mM	K ₄ [Fe(CN) ₆] aus Stammlsg.
	2,4 % (v/v)	X-Gal Stammlsg. in LacZ-Waschlsg., vor Zugabe von X-Gal sterilfiltrieren, Lagerung lichtgeschützt bei 4°C
K ₃ [Fe(CN) ₆]-Stammlsg.	0,5 M	Kaliumhexacyanoferrat (III), Lagerung lichtgeschützt bei 4°C

K ₄ [Fe(CN) ₆]-Stammlsg.	0,5 M	Kaliumhexacyanoferrat (II), Lagerung lichtgeschützt bei 4°C
X-Gal Stammlsg.	4 % (w/v)	X-Gal (Roth) in N,N'-Dimethylformamid, Lagerung lichtgeschützt bei -20°C
Tris-Stammlsg.	500 mM	Tris (Sigma) in H ₂ O, pH mit 10 N HCl auf 7,6 einstellen
Tris-Waschpuffer	1 ml	Tris-Stammlsg. auf 9 ml H ₂ O auffüllen
NADPH-Stammlsg.	100 mg/ml	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert, Tetranatriumsalz (Sigma) frisch mit H ₂ O ansetzen
NBT-Stammlsg.	50 mg 431 µl 185 µl	Nitroblue-Tetrazoliumchlorid (Sigma) in Dimethylformamid suspendieren und durch H ₂ O lösen, Lagerung bei -20°C
Triton-X-100-Stammlsg.	10%	Triton-X-100 (Serva) in H ₂ O, Lagerung bei -20°C
Vorinkubationslsg.	1 ml 50 µl 9 ml	Tris-Stammlsg. Triton-X-100-Stammlsg. H ₂ O, mit NaOH auf pH 8,2 einstellen
NADPH-Diaphorase-Färbelsg.	10 ml 100 µl 25 µl	Vorinkubationslsg. NADPH-Stammlsg. NBT-Stammlsg.
Acetylcholin-Esterase-Färbelsg.	65 mM 1,73 mM 15 mM 3 mM 5 mM 5 mM 1%	Natriumacetat (pH 5,0) Acetylcholinchlorid Natriumcitrat CuSO ₄ (Merck) isoOMPA (Sigma) K ₃ [Fe(CN) ₆] Triton-X-100 (Serva)
Timm-Phosphatpuffer	26,7 g 20,7 g	Na ₂ HPO ₄ ad 1l mit H ₂ O auffüllen NaH ₂ PO ₄ ad 1l mit H ₂ O auffüllen, pH 7,4 durch Mischen beider Lsg. einstellen
Timm-Reaktionslsg.	1,19 g 1,17 g 100 ml	Na ₂ HPO ₄ (Sigma) Na ₂ S (Fluka) H ₂ O
Timm-Fixierungslsg.	100 ml 25%	Timm-Phosphatpuffer Glutaraldehyd (Sigma)
Timm-Sucroselsg.	30 g 100 ml	Sucrose (Sigma) Timm-Phosphatpuffer
Gummi arabicum-Lsg.	62,5 g 125 ml	Gummi arabicum (Fluka) H ₂ O, bei leichter Hitze lösen, Lagerung bei -20°C

Timm-Entwicklerlsg.	120 ml	Gummi arabicum-Lsg.
	5,1 g	Zitronensäure (Fluka)
	7,1 g	Natriumcitrat (Fluka)
	3,4 g	Hydrochinon (Fluka)
	80 ml	H ₂ O, mischen
	0,19 g	Silbernitrat, im Dunkel zugeben und sofort verwenden
Timm-Stopplsg.	1 g	Na ₂ S ₂ O ₃ (Fluka)
	100 ml	H ₂ O
Toluidinblau-Färbelsg.	1 g	Toluidinblau
	4 g	Borax
	400 ml	H ₂ O, bei 60°C lösen, filtrieren
Hanker-Yates-Färbelsg.	10 mg	Hanker-Yates-Reagenz (Fluka)
	10 µl	30% H ₂ O ₂
	10 ml	PBS

2.10 Lösungen für die Mikroinjektion

Litiumchlorid-Lsg.	1 M	Litiumchlorid in H ₂ O
Cascade Blue-Lsg.	4 %	Cascade Blue (Molecular Probes) in H ₂ O lösen, lichtgeschützt bei 4°C lagerbar

2.11 Anästhetikum

Xylazin-Ketamin-Gemisch	0,5 ml	Xylazin (2 % Rompun; Bayer)
	0,25 ml	Ketamin (10 % Ketavet; Pharmacia & Upjohn)
	4,25 ml	0,9 % NaCl-Lsg.
		zur Anästhesie wurden 0,01 ml/g Körpergewicht intraperitoneal appliziert; diese Lsg. wurde max. für eine Woche verwendet

2.12 Reagenziensätze

Qiagen EndoFree Maxi Kit (Qiagen)
 Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
 Multiprime-DNA labeling system (Amersham)
 Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination (Sigma)
 ECL+Plus (Amersham)
 Quick-Hyb (Stratagene)

2.13 Oligonukleotidstartermoleküle

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech als Lyophilisat geliefert und in TE-Puffer nach Herstellerangaben gelöst und auf 25 pmol mit H₂O verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Name	Länge	Basensequenz (5'→ 3'), Bindungsstelle, Referenz	PCR-Analyse
UMPR	22-mer	TCA CCC CAA GCT GAC TCA ACC G 5' Bereich der Cx43-kodierenden Region, Gegensinnrichtung (Theis, 2001)	Cx43fl Cx43fl-neu
43delforw	22-mer	GGC ATA CAG ACC CTT GGA CTC C 3' Ende des Cx43-Introns, Sinnrichtung (Theis, 2001)	Cx43fl-neu 2loxneo
43delrev	22-mer	TGC GGG CCT CTT CGC TAT TAC G 5' Bereich der kodierenden Region des lacZ-Gens, Gegensinn (Theis, 2001)	2lox43
43twolox-forw	22-mer	CTC CAG CCC TTA GCT ATC GTG G Cx43-kodierende Region, Sinnrichtung (Theis, 2001)	2lox43
EGFP-3B	24-mer	GAA GAA GTC GTG CTG CTT CAT GTG 5' Bereich der kodierenden Region des eGFP-Gens, Gegensinn	Cx43eGFP
Tet23	24-mer	GCG GAC CCA CTT TCA CAT TTA AG kodierende Region des tTA-Transgens	CaMKII-tTA
Tet27	24-mer	CGC TGT GGG GCA TTT TAC TTT AG kodierende Region des tTA-Transgens	CaMKII-tTA
F	21-mer	CCC ATT ACG GTC AAT CCG CCG	TetO-lacZ
B	21-mer	GCC TCC AGT ACA GCG CGG CTG	TetO-lacZ
Cx43-rev2	24-mer	GCT GGC TTG CTT GTT GTA ATT GCG 5' Bereich der Cx43-kodierenden Region, Gegensinn	Cx43eGFP
I5FC-for	30-mer	GGA TTA AAG GCA TGT GTC ACC ACT CTT GGC 3' Ende des Introns vor Cx45Exon3, Sinnrichtung	Cx45flox, delta-Neo
E3-rev	29-mer	GGA ATT GGT TTG CCC TGG TAG GTG AAA AG kodierender Bereich von Cx45, Gegensinn	Cx45flox
E3-forw	30-mer	TTC CTG TTA CCA GAG TTG TGG CCG TTC TTG kodierender Bereich von Cx45, Sinnrichtung	delta-Neo
Neo	30-mer	AGA CGT GCT ACT TCC ATT TGT CAC GTC CTG kodierender Bereich der Neomycin-Resistenkassette	delta-Neo
Cx36 USP3	24-mer	TGC AGC AGC ACT CCA CTA TGA TTG kodierende Region des Cx36-Gens, Sinnrichtung	Cx36 RT-PCR
Cx36 DSP4	24-mer	GTC TCC TTA CTG GTG GTC TCT GTG kodierende Region des Cx36-Gens, Gegensinnrichtung	Cx36 RT-PCR
LacZ-USP	24-mer	GAT CGC CCT TCC CAA CAG TTG CGC kodierende Region des LacZ-Reportergens, Sinnricht.	LacZ RT-PCR
LacZ-DSP	24-mer	CGT TGC ACC ACA GAT GAA ACG CCG kodierende Region des LacZ-Reportergens, Gegensinn	LacZ RT-PCR
Aktin USP	22-mer	CGT GGG CCG CCC TAG GCA CCA G kodierende Region des Aktin-Gens, Gegensinn (De Sousa et al., 1993)	Aktin RT-PCR
Aktin DSP	22-mer	TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G kodierende Region des Aktin-Gens, Sinnrichtung (De Sousa et al., 1993)	Aktin RT-PCR
OTR-forw	21-mer	CTC GCG CCT CTT CTT TTT CAT Sinnrichtung, GenBank accession #:NM_012871	OTR RT-PCR
OTR-rev	21-mer	CCC ATA GAA GCG GAA GGT GAT Gegensinnrichtung, GenBank accession #:NM_012871	OTR RT-PCR
FP-forw	22-mer	TCG CAA ACA CAA CCT GCC A Sinnrichtung, GenBank accession #: NM_008966	FP RT-PCR

FP-rev	21-mer	GGC TGT TCG ATA AGA TCC CCA Gegensinnrichtung, GenBank accession #: NM_008966	FP RT-PCR
c-fos-forw	21-mer	TGT TTC CGG CAT CAT CTA GGC Sinnrichtung, GenBank accession #: V00727	c-fos RT-PCR
c-fos-rev	21-mer	AAG GAA TTG CTG TGC AGA GGC Gegensinnrichtung, GenBank accession #: V00727	c-fos RT-PCR
18S-forw	20-mer	GCG AAA GCA TTT GCC AAG AA Sinnrichtung, GenBank accession #: V01270	18S RT-PCR
18S-rev	21-mer	GGC ATC GTT TAT GGT CGG AAC Gegensinnrichtung, GenBank accession #: V01270	18S RT-PCR
up-IntCre	24-mer	TTT GCC TGC ATT ACC GGT CGA TGC kodierende Region aller Cre-Rekombinasen, Sinnrichtung (Degen, 2003)	IntCre
IntCre_rev	24-mer	TCC ATG AGT GAA CGA ACC TGG TCG kodierende Region aller Cre-Rekombinasen, Gegensinnrichtung (Degen, 2003)	IntCre NestinCre PGKCre
USP Flp	27-mer	TAA GGT CCT GGT TCG TCA GTT TGT GG kodierende Region der Flp-Rekombinasen, Sinnrichtung (Degen, 2003)	intFLP
DSP Flp	27-mer	GTG ATA TTA TCC CAT TCC ATG CGG GG kodierende Region der Flp-Rekombinasen, Gegensinnrichtung (Degen, 2003)	intFLP
up-pgk1	24-mer	GCT GTT CTC CTC TTC CTC ATC TCC Region des PGK-Promotors, Sinnricht. (Degen, 2003)	PGKCre
up-Nestin	24-mer	TCC CTT CTC TAG TGC TCC ACG TCC Region des Nestin-Promotors, Sinnricht. (Degen, 2003)	NestinCre
43-trun-03	22-mer	GGT CCA AGC CTA CTC CAC GGC C kodierender Bereich von Cx43 (Maass, 2004)	interne Cx43 Sonde
43-trun-04	30-mer	CCA TCG ATT AGG ATG GGC TCA GTG GGC CGG, kodierender Bereich von Cx43 (Maass, 2004)	interne Cx43 Sonde
NheI-EcoRV forw	45-mer	GGT CTA GCT AGC TAG GAT ATC TAC AGT GTT CCT AGA GAT AGT GTG zur Amplifikation eines Teils des 5'UTR, der Spleißakzeptorstelle und der Kozak-Sequenz von Cx45, incl. NheI- und EcoRV-Schnittstellen	Klonierung pCx36cDNA
Cx36Exon1- BamHI rev	111- mer	CGC GGA TCC TAC CTC CCA ATC ATA GTG GAG TGC TGC TGC ACC GCG GCT TCC AGC AGC CTC TCC AAG ATG GTC CAT TCC CCC ATG GTG GTG GAA TTG GTT TGC CCT GGT AGG zur Amplifikation des Cx36 Exon1, incl. BamHI-Schnittstelle	Klonierung pCx36cDNA

Tabelle 2.1 Startermoleküle für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).

2.14 Größenstandards

Bezeichnung	Fragmentgrößen
1 kb DNA-Leiter	134; 154; 201; 220; 298; 344; 396; 506; 517; 1018; 1636; 2036; 3054; 4072; 5090; 6108; 7126; 8144; 9162; 10180; 11198; 12216 (Angaben in bp)
100 bp DNA-Leiter	100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1000; 1100; 1200; 1300; 1400; 1500; 2072 (Angaben in bp)
λ -DNA, Hind III	125; 564; 2027; 2322; 4361; 6557; 9416; 23130 (Angaben in bp)
Protein-Leiter	4; 6; 16; 22; 36; 50; 64; 98; 250 (Angaben in kD)

Tabelle 2.2 Verwendete Größenstandards.

bp: Basenpaare. kDa: Kilodalton. Der Protein-Standard (See-Blue Plus 2) wurde von der Firma Invitrogen, λ -DNS von der Firma Roche verwendet, die übrigen Größenstandards stammten von der Firma GibcoBRL.

2.15 Plasmide

Bezeichnung	Verwendung, wichtige DNA-Sequenzen	Referenz
pBluescript II SK(+)	Klonierungsvektor	Stratagene, Short et al., 1988
pmCx36	Ausgangsvektor mit 9,8 kb des Maus Cx36-Lokus des Mausstammes 129Sv/Ola	Söhl, 1999
pHWlox1	HPRT-Minigen unter der Kontrolle des PGK-Promotors, flankiert von loxP-Sequenzen	Magin et al., 1992
pM30(pK-11)	Neomycin-Selektionskassette unter der Kontrolle des PGK-Promotors, flankiert von frt-Sequenzen zuzüglich einer loxP-Sequenz	Meyers et al., 1998
pMJ-Green	Eukaryotischer Expressionsvektor; verbesserte Kombination aus den beiden Vektoren pBEHpac18 und pEGFP-N1	Degen, 2004
pSV40p(A)	pBluescript mit einem einklonierten SV40 Polyadenylierungs-Signal	Eckardt, 1999
pCodE3	Vektor mit der vollständigen kodierenden Region des Exon3 von Cx45	Brune, 2000
pX5000	Klonierungsvektor mit dem 5'UTR und dem 5'-Bereich des Cx45Exon3	Kirchhoff, 1999
pTetOCMV-Cx43-IRES-lacZ-Isolator	Vektor zur bicistronischen Expression des eGFP und Cx43-Gens, umrahmt von β -Globin-Isolatorsequenzen	Döring, 2000
placZ	Vektor mit der kodierenden Region der β -Galaktosidase mit Kernlokalisierungssignal und SV40p(A)	B. Teubner, unveröff.
TV.1	800 bp KpnI/EcoRI Fragment als interne Sonde für SB- und NB-Analysen	Eckardt, 1999

Tabelle 2.3 Verwendete Plasmide.

NB: Northern Blot, pA: Polyadenylierungsstelle; SB: Southern Blot; unveröff.: unveröffentlicht.

2.16 Bakterienstämme

E. coli Stamm	Genotyp	Eigenschaft / Verwendung	Referenz
MM294-Cre	Genotyp: F ⁻ , λ ⁻ , supE44, endA1, thi-1, hsdR17, lacZ::cl857-Cre	Cre-Rekombinase exprimierende <i>E. coli</i> -Bakterien; Herstellung und Vermehrung rekombinanter Plasmide	Buchholz et al., 1996
MM294-Flp	Flp-Rekombinase exprimierende <i>E. coli</i> Bakterien	Herstellung und Vermehrung rekombinanter Plasmide	Buchholz et al., 1996
XL1-blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, Δ(mcr)A183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, supE44, relA1, lac [F'pro AB lacI ^q ΔM15 Tn10 (tet ^r 12,5 μg/ml)]	Tetrazyklinresistenz; Vermehrung von Plasmiden, α-Komplementation	Bullock et al., 1987

Tabelle 2.4 Zur Klonierung und Plasmidvermehrung verwendete Bakterienstämme.

2.17 Eukaryontische Zelllinien

Name	Eigenschaft / Verwendung	Referenz
HM1	Embryonale Stammzellen der Maus, gewonnen aus dem Mausstamm Sv129P2/OlaHsd	Magin et al., 1992
HeLa (ATCC CCL 2)	Aneuploide, epitheloide Cervixkarzinom Linie aus menschlichem Gewebe als untransfizierte Wildtyp-Zellen (HeLa-WT)	Jones et al., 1971
HeLaCx43	HeLa-Linie, die konstitutiv das Protein Cx43 exprimiert	Elfgang et al., 1995
HeLaCx45	HeLa-Linie, die konstitutiv das Cx45-Protein exprimiert	Butterweck et al., 1994b

Tabelle 2.5 Verwendete eukaryontische Zelllinien.

2.18 Mauslinien

Bezeichnung	Kurzbeschreibung	Verwendung	Bezugsquelle/Referenz
C57BL/6	Inzuchtstamm, schwarz	Blastozystenspender, Rückkreuzung	Charles River, Sulzfeld; eigene Zucht
NMRI	Auszuchtstamm, albino	Leihmütter, vasektomierte Männchen	Charles River, Sulzfeld; eigene Zucht
Cx43 ^{fl}	Mauslinie mit von 3 loxP-Stellen flankierter Cx43-kodierender Region und aktivierbarem lacZ-Reportergen	Erzeugung von Mauslinien mit Zelltyp-spezifischer oder induzierbarer Deletion von Cx43	Theis et al., 2001
Cx43 ^{2lox}	Mauslinie mit von 2 loxP-Stellen flankierter Cx43-kodierender Region und aktivierbarem lacZ-Reportergen	Erzeugung von Mauslinien mit Zelltyp-spezifischer oder induzierbarer Deletion von Cx43	Eckardt et al., 2004

SM-CreERT ² (ki)	Mauslinie mit induzierbarer, Glattmuskel-spezifischer Cre-Expression	Erzeugung von Mäusen mit Glattmuskel-spezifischer Cx43-Defizienz	Kühbandner et al., 2000
Nestin-Cre	Mauslinie zur Cre-Expression in neuronalen Vorläuferzellen	Erzeugung von Mäusen mit Nestin-spezifischer Cx43-Deletion	Tronche et al., 1999
α MyHC-Cre	Mauslinie zur Cre-Expression in Kardiomyozyten	Erzeugung von Mäusen mit Kardiomyozyten-spezifischem Austausch von Cx45 gegen Cx36	Agah et al., 1997
SMMHC-Cre	Mauslinie zur Cre-Expression in glatten Muskelzellen	Erzeugung von Mäusen mit Glattmuskelzell-spezifischem Austausch von Cx45 gegen Cx36	Regan et al., 2000
PGK-Cre	Mauslinie, die die Cre-Rekombinase ubiquitär unter der Kontrolle des PGK Promotors exprimiert	Erzeugung von Mäusen mit ubiquitärem Ersatz von Cx45 gegen Cx36	Lallemant et al., 1998
deleter-Flp	Mauslinie zur ubiquitären Expression der Flp-Rekombinase unter der Kontrolle des menschlichen β -Aktin Promotors	Erzeugung von Mäusen mit ubiquitärer Deletion der Neomycin-Selektionskassette	Rodríguez et al., 2000
CaMKII α -tTA	Mauslinie zur Neuronenspezifische Expression des tTA-Transgens	Erzeugung von Mäusen mit CaMKII α -spezifischer Expression des Cx43-Gens	Mayford et al., 1996
TetOlacZ	Linie mit tTA oder rtTA-aktivierbarem lacZ-Gen	Charakterisierung der verwendeten tTA-Mauslinie	Mayford et al., 1996

Tabelle 2.6 Verwendete Mausstämme.

2.19 Antikörper

2.19.1 Primärantikörper

Antigen	Antikörper-Typ	Herkunft d. Antikörpers	Verdünnung	Bezugsquelle/Referenz
Cx36	polyklonal	Kaninchen	IF 1:200 IP 1:100	Zymed
Cx40	polyklonal	Kaninchen	IF 1:500	Zymed
Cx43	polyklonal	Kaninchen	WB 1:500 IF 1:2000	Traub et al., 1994; Schlieker, 2000
Cx45	polyklonal	Kaninchen	IF 1:800	Dr. U. Janssen-Bienhold, Oldenburg
FITC-Smooth muscle actin	monoklonal	Maus	WB 1:400	Sigma
KI67	monoklonal	Maus	IF 1:1000	DAKO
NeuN	monoklonal	Maus	IF 1:1000	Chemikon
Nestin	monoklonal	Maus	IF 1:1000	Chemikon
Cy3-GFAP	polyklonal	Maus	IF 1:1000	Sigma

Tabelle 2.7 Verwendete Primärantikörper.

WB: Western Blot; IF: Immunfluoreszenz; IP: Immunpräzipitation

2.19.2 Sekundärantikörper

Herkunft d. Antigens	Antigen	Herkunft d. Antikörpers	Verdünnung	Markierung	Bezugsquelle
Kaninchen	IgG	Ziege	1:2000	Alexa 594	MoBiTech
Kaninchen	IgG	Ziege	1:2000	Cy3	Dianova
Maus	IgG	Ziege	1:2000	Cy3	Dianova
Kaninchen	IgG	Ziege	1:60000	Peroxidase	Dianova
Tabelle	2.8	Verwendete		Sekundärantikörper	

3. Methoden

3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.1.1 Analytische Plasmid-Isolierung (Minipräparation)

Zur schnellen Präparation von Plasmid-DNA aus einer Vielzahl von Bakterienklonen wurden 2 ml LB-Medium, versehen mit dem geeigneten Antibiotikum, mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien inokuliert. Die Kultur wurde bei 37°C üN bei 225 UpM inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden in ein Schnappdeckel-Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien durch einminütiges Zentrifugieren bei 16000 x g sedimentiert. Das Sediment wurde nach Verwerfen des Überstandes in 400 µl STET-Puffer resuspendiert, 30 µl frisch angesetzte Lysozym-Lösung zugesetzt und die Suspension mit Hilfe eines Strudelmischers durchmengt. Die Ansätze wurden 5 min bei RT inkubiert und dann einem einminütigen Hitzeschock von 100°C unterzogen. Die Ansätze wurden 5 min auf Eis abgekühlt und danach bei 4°C für 15 min bei 16000 x g zentrifugiert. Das aus Zellresten und hieran haftender genomischer DNA bestehende Sediment wurde entfernt. Der die Plasmid-DNA und RNA enthaltende Überstand wurde mit 400 µl Isopropanol vermischt. Das Präzipitat der Plasmid-DNA wurde durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 18000 UpM sedimentiert, der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 400 µl kaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation (10 min, 4°C, 18000 UpM) wurde der Überstand verworfen und die Plasmid-DNA nach Lufttrocknung in 50 µl TE-Puffer mit 0,1% RNase2000 aufgenommen. Die Plasmid-DNA-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

3.1.2 Präparative Plasmid-Isolierung (Midipräparation)

Zur Präparation größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde der Plasmid-Präparationssatz der Firma Quiagen verwendet. Dazu wurden 50 ml LB Medium, versehen mit dem geeigneten Antibiotikum, mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien inokuliert. Die Kultur wurde nach Inkubation üN bei 37°C und 225 UpM in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß überführt und die Bakterien durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 20°C und 7000 UpM sedimentiert. Alle weiteren Schritte wurden, wie vom Hersteller empfohlen, durchgeführt. Die Plasmid-DNA-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

3.1.3 Präparative, endotoxinfreie Plasmid-Isolierung (Maxipräparation)

Für die Transfektion embryonaler Stammzellen der Maus werden große Mengen sehr reiner Plasmid-DNA benötigt. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des Qiagen EndoFree MaxiKits der Firma Qiagen. 100 ml LB-Medium, versetzt mit dem geeigneten Antibiotikum, wurden mit einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienklons inokuliert und über Nacht bei 37°C und 225 UpM inkubiert. Die Präparation erfolgte über Anionenaustausch-Säulen (Qiagen-tip 500), prinzipiell wie unter 3.2.2 beschrieben. Die Plasmid-DNA wurde in 200 µl endotoxinfreiem TE-Puffer gelöst. Die Plasmid-DNA-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

3.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Maus-Schwanzspitzen

Zur Isolierung genomischer DNA aus Maus-Schwanzspitzen wurden Schwanzbiopsien (etwa 0,5 cm) in 0,5 ml Laird-Lysis-Puffer (Laird et al., 1991) mit 6 µl Proteinase K (20 mg/ml) bei 56°C über Nacht lysiert. Haare und unlösliche Zellrückstände wurden durch Zentrifugation (13000 UpM, 10 min, 4°C) abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol und mehrmaliges Invertieren wurde die DNA gefällt und durch erneute Zentrifugation (13000 UpM, 15 min, 4°C) sedimentiert. Nach sorgfältiger Entfernung des Überstandes wurde die DNA durch Zugabe von 0,5 ml Ethanol (70 %) und anschließendes Invertieren gewaschen. Nach Entfernung des Überstandes wurde die DNA an der Luft getrocknet, in 50-150 µl TE-Puffer aufgenommen und in 50 µl bei 56°C im Wasserbad gelöst. Diese DNA-Lösungen wurden zu Genotypisierungen mittels PCR eingesetzt.

3.1.5 Isolierung genomischer DNA aus Organen

Organe wurden, entsprechend der Angaben von Strauss (1998), direkt nach der Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Gewebeproben (bis zu 1 g) wurden in vorgekühlten Schraubzylindern mit Metallstäben und einem Hammer zu Pulver zerkleinert, das in 15 ml-Zentrifugationsröhrchen (Sarstedt) gesammelt wurde. Anschließend wurde das Gewebepulver mit 1,2 ml Laird-Lysis-Puffer und 6 µl Proteinase K je 100 mg Gewebe versetzt und 2-3 Tage im Wasserbad bei 55°C inkubiert, bis keine Gewebeklumpen mehr sichtbar waren. Diese Organlysate wurden zusammen mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (1:1:24; Roth) für 30 sec mit dem Strudelmischer durchmischt und 10 min zentrifugiert (Zentrifuge J-21C, Rotor JS 13.1, 2500 UpM, 4°C). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem 0,5-fachen Volumen Ammoniumacetatlösung (7,5 M) und dem 2-fachen Volumen Ethanol (100%) vorsichtig geschwenkt, bis die DNA präzipitierte.

Nach Sedimentation der DNA (2500 UpM, 5 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen, das DNS-Sediment mit 5 ml Ethanol (70%) gewaschen und erneut zentrifugiert (2500 UpM, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, das DNA-Sediment für 5-10 Minuten bei RT getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen TE-Puffer üN bei 56°C in Lösung gebracht, dann bei 4°C gelagert. Diese DNA-Lösungen wurden zur Genotypisierung mittels PCR- und Southern Blot-Analyse verwendet.

3.1.6 Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen der Maus

In 6-Loch-Schalen konfluent gewachsene Stammzell-Kulturen wurden nach Entfernung des Mediums zweimal mit PBS⁻ gewaschen, mit einer Mischung aus 1 ml ES-Lysis-Puffer und 5 µl Proteinase K-Stammlösung versetzt und für 30 min bei RT schwenkend inkubiert. Hiernach wurden die Schalen mit Parafilm luftdicht verschlossen und üN bei 56°C inkubiert. Zur Fällung der DNA wurde den Ansätzen nach Abkühlen auf RT das gleiche Volumen an Isopropanol zugesetzt, und für 30 min schwenkend bei RT inkubiert. Die DNA-Flocke wurde mit einer umgebogenen Pipettenspitze aus der Lösung gehoben, in Ethanol (70%) getaucht und an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die DNA mit 200 µl TE-Puffer versetzt und zum Lösen für 1 bis 2 Tage bei 56°C inkubiert. Die auf diese Weise gewonnene DNA wurde für PCR- und Southern Blot-Analysen verwendet.

3.1.7 Aufreinigung von DNA aus embryonalen Dottersäcken

Für eine schnelle Gewinnung genomischer DNS aus embryonalen Dottersäcken wurde der präparierte Dottersack in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben, in dem 100 µl des alkalischen Lysis Reagenz (pH 5,0) vorgelegt waren. Nach Erhitzen auf 95°C für 30 min und anschließendem Abkühlen auf Eis wurde die Lösung durch Hinzufügen des entsprechenden Volumens Neutralisationsreagenz (pH 12,0) auf etwa pH 8,0 neutralisiert und kurz abzentrifugiert. Für die anschließende PCR-Analysen wurden 1 bis 5 µl des Überstandes eingesetzt.

3.1.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden nach Gelelektrophorese unter UV-Licht (365 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA aus dem Agarosestück erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

3.1.9 Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben

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

3.2 Enzymatische Modifikationen von DNA

3.2.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Vollständige Spaltung von Plasmid-DNA erfolgte in einem Endvolumen von 10 µl. Eingesetzt wurden 0,2 µl der jeweiligen Restriktionsendonukleasen. Partielle Spaltung von Plasmid-DNA, die für einige Klonierungsvorhaben notwendig war, konnte durch Zeitreihen bzw. Verdünnungsreihen, d.h. Inkubation der DNA mit der gleichen oder verdünnten Enzymmenge, über unterschiedliche Zeiträume erhalten werden. Dabei wurde die Aktivität des Enzyms durch Temperaturunterschiede oder eine spezielle Partialspaltungs-Stopp-Lösung beendet.

3.2.2 Glättung überhängender einzelsträngiger DNA-Enden

Viele Restriktionsendonukleasen erzeugen bei der Spaltung von DNA-Molekülen 3'- oder 5'-überhängende Enden. Häufig sind die erzeugten Enden von DNA-Fragmenten, die später verbunden werden sollen, nicht kompatibel. In diesen Fällen können die Enden durch Auffüllen (5'-überhängende Enden) mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I aus *E. coli* oder durch Abbau (3'-überhängende Enden) mittels der T4 DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4 geglättet werden. Im Verlauf der Arbeit wurden ausschließlich 5'-überhängende Enden geglättet: Zu 20 µl hitzeinaktiviertem Restriktionsansatz wurden jeweils 1 µl hochsalziger Restriktionpuffer (zehnfach konzentriert), 0,5 µl dNTPs (2 mM), 4,5 µl Wasser und 1,0 µl Klenow (2 U/µl) zugegeben. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 37°C für 15 min. Anschließend wurde das Klenow-Enzym im Ansatz durch 15 minütige Inkubation bei 75°C hitzeinaktiviert.

3.2.3 Dephosphorylierung freier 5'-DNA-Enden

Die Wahrscheinlichkeit einer intramolekularen Verknüpfung kann dadurch vermindert werden, dass die freien 5'-Phosphatgruppen der Vektor-DNA entfernt werden. Als Phosphatase wird hierzu die alkalische Phosphatase aus Krabben verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich aus Ethidiumbromid-Gelen isolierte DNA-Fragmente 5'-dephosphoryliert. Dazu wurde Vektor-DNA-Eluat mit 1 µl Phosphatase (1 U/µl) und 3 µl zehnfach Phosphatasepuffer versetzt und auf ein Volumen von 29 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Ein weiterer µl Phosphatase wurde zugegeben und der Ansatz weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde hitzeinaktiviert (15 min, 75°C) und die DNA in berechneter Menge für die Ligation eingesetzt.

3.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die intra- bzw. intermolekulare Verknüpfung freier DNA-Enden werden durch sogenannte Ligation erreicht. Eine Ligation kann zwischen kohäsiven, also in Bezug auf die Überhänge kompatiblen, oder glatten DNA-Enden erfolgen.

Es wurden Vektor-und Insert-DNA (im Verhältnis 1:3), 1 µl 10x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) gemischt und der Ansatz in bei 16°C inkubiert.

3.3 Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren wird durch ihre negative Nettoladung (Phosphatgruppen) ermöglicht. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Moleküls ist von der Stärke des elektrischen Feldes und Nettoladung des Moleküls abhängig. Die Größe von Molekülen lässt sich durch gleichzeitiges Auftragen von Molekülen bekannter Länge ermitteln (Größenstandard).

3.3.1 Native Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren im Bereich von 100 bp bis 20 kb wird native Agarose als Matrix genutzt. Gele werden, entsprechend der zu analysierenden Fragmentgrößen, in Agarose-Konzentrationen von 0,65 bis 2,0%, mit 0,75-fach TBE-Puffer hergestellt. Vor dem Abkühlen wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml hinzugegeben. DNA-Proben und DNA-Längenstandard wurden, mit 6-fach DNA-Ladepuffer versehen, aufgetragen und konnten nach erfolgter Elektrophorese durch die Interkalation des Ethidiumbromids auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden.

3.3.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1,0% Agarosegelen, die 0,9% Formaldehyd enthalten. Durch diese denaturierenden Bedingungen wurden RNA-Trennartefakte, durch das Auftreten partieller Duplex-RNA-Formungen, ausgeschlossen. Die RNA-Proben wurden mit 2 µl Formaldehyd (37%), 5 µl Formamid deionisiert, 1 µl 10x MOPS-Puffer und 1 µl Ethidiumbromid (400 µg/ µl) versetzt, 15 min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl 6-fach RNA-Ladepuffer wurden Proben und RNA-Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in MOPS-Puffer (1x) unter ständiger Pufferumwälzung bei 4°C. Die Laufstrecken der ribosomalen RNA (28S = 4,7 kb, 18S = 1,9 kb) und des Standards wurden nach erfolgter Elektrophorese mittels UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

3.4 Nukleinsäure-Analysen

Die Polymerase-Kettenreaktion (z.B. Saiki et al., 1988) und die Southern Blot-Methode (Southern, 1975) wurden zum Nachweis homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen, zum Nachweis Cre-vermittelter Deletionen spezifischer DNS-Abschnitte und zur Genotypi-

sierung von transgenen Mausmutanten verwendet. Soweit nicht anders erwähnt, wurde aus embryonalen Stammzellen sowie aus dem Gewebe von Mäusen stammende DNA gleich behandelt.

3.4.1 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von spezifischen DNA-Sequenzen. Da als Ausgangsmaterial theoretisch ein einzelnes DNA-Molekül mit der Zielsequenz genügt, eignet sich diese Methode zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen in einem heterogenen Nukleinsäuregemisch. Für weitere theoretische Grundlagen sei auf Dieffenbach und Dveksler (1995) verwiesen.

Die angegebene $MgCl_2$ -Lsg. (25 mM), der PCR-Puffer (10x) und die Taq-Polymerase (5 U/ μ l) stammten von der Firma Promega. Die dNTP-Lösung (Hybaid-AGS) hatte eine Konzentration von 2 mM bzw. 10 mM, die spezifischen Oligonukleotide wurden in der Konzentration von 25 pmol/ μ l eingesetzt. Alle Reaktionsansätze wurden mit 50 μ l Mineral-Öl (Sigma) überschichtet. Nach Beendigung des PCR-Programmes wurden die Proben gelelektrophoretisch analysiert. In den jeweiligen PCR-Rezepten sind die Namen der Oligonukleotide *kursiv* geschrieben, die Sequenzen sind unter 2.11 aufgeführt.

a) Cx43^{fl}-neu PCR

Reaktionsansatz:

DNA	2 μ l
<i>43delforw</i>	1 μ l
<i>UMPR</i>	1 μ l
PCR-Puffer	2,5 μ l
$MgCl_2$	2 μ l
dNTPs (2 mM)	1,5 μ l
Taq-Polymerase	1 μ l
A. bidest	14 μ l

Reaktionsprogramm:

Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
94°C	4	1
94°C	2	25
65°C	1	
72°C	1,5	
72°C	10	1

Diese PCR liefert im heterozygoten Cx43^{fl/+}-Zustand ein Cx43-Wildtyp-Amplikon bei 500 bp und ein Cx43^{fl}-Amplikon bei etwa 630 bp.

b) 2lox43 PCR

Reaktionsansatz:		Reaktionsprogramm:		
DNA	1 µl	Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
<i>43twoloxforw</i>	1 µl	94°C	4	1
<i>43delrev</i>	1 µl	92°C	1	28
PCR-Puffer	2,5 µl	65°C	0,75	
MgCl ₂	1,5 µl	72°C	0,75	
dNTPs (2 mM)	2 µl	72°C	10	1
Taq-Polymerase	0,5 µl			
A. bidest	15,5 µl			

Diese PCR lieferte den Nachweis der selektiven Deletion der loxP-markierten tk/neo-Selektions-cassette eines Cx43^{fl}-Allels (PCR-Amplikon: 420 bp), bei der die Sequenz der loxP-markierten Cx43-kodierenden Region im Locus erhalten bleibt (Theis et al., 2001).

c) PCR zum Nachweis der (spezifischen) Cre-Rekombinase in transgenen Mäusen

Reaktionsansatz:		Reaktionsprogramm:		
DNA	1 µl	Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
<i>IntCre-rev</i>	0,2 µl	94°C	5	1
<i>up-*</i>	0,2 µl	94°C	1	40
PCR-Puffer	2,5 µl	60°C	1	
MgCl ₂	2 µl	72°C	2	
dNTPs (10 mM)	0,2 µl	72°C	10	1
Taq-Polymerase	0,5 µl			
A. bidest	18,4 µl			

Ein vorhandenes Amplikon zeigt die Anwesenheit der kodierenden Region der (spezifischen) Cre-Rekombinase im Genom der transient transfizierten HM1 ES-Zellen oder der untersuchten Mäuse an.

* IntCre: Amplikon von etwa 420 bp für alle Cre-Transgene (Interne Cre-PCR)

Nestin: Amplikon von etwa 600 bp spezifisch für das Nestin-Cre Transgen

pgk1: Amplikon von etwa 500 bp spezifisch für das PGK-Cre Transgen

d) PCR zum Nachweis der Flp-Rekombinase in transgenen Mäusen

Reaktionsansatz:		Reaktionsprogramm:		
DNA	1 µl	Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
<i>USP Flp</i>	0,2 µl	96°C	5	1
<i>DSP Flp</i>	0,2 µl	95°C	0,5	35
PCR-Puffer	2,5 µl	68°C	1	
MgCl ₂	2 µl	72°C	1,5	
dNTPs (10 mM)	0,2 µl	72°C	10	1
Taq-Polymerase	0,5 µl			
A. bidest	18,4 µl			

Ein Amplikon von etwa 1,2 kb zeigt die Anwesenheit der kodierenden Region der Flp-Rekombinase im Genom der untersuchten Mäuse an.

e) Cx43eGFP PCR

Reaktionsansatz:	
DNA	1 µl
<i>Cx43rev2</i>	1 µl
<i>EGFP3B</i>	1 µl
PCR-Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	2 µl
dNTPs (2mM)	2 µl
Taq-Polymerase	1 µl
A. bidest	14,5 µl

Reaktionsprogramm:		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
95°C	5	1
95°C	0,5	35
69°C	2	
72°C	1	
72°C	10	1

Ein Amplikon von etwa 1,9 kb zeigt die Anwesenheit der kodierenden Region des Cx43- und eGFP-Reportergens in Cx43^{TetOeGFP}-Mäusen.

f) CaMKII-tTA PCR

Reaktionsansatz:	
DNA	1 µl
<i>Tet23</i>	1 µl
<i>Tet27</i>	1 µl
PCR-Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	2 µl
dNTPs (2mM)	2 µl
Taq-Polymerase	1 µl
A. bidest	14,5 µl

Reaktionsprogramm:		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
94°C	3	1
94°C	0,5	35
55°C	0,5	
72°C	1	
72°C	10	1

Ein Amplikon von etwa 220 bp zeigt die Anwesenheit der kodierenden Region des CaMKIIα-tTA-Transgens im Genom der untersuchten Mäuse.

g) TetO-lacZ PCR

Reaktionsansatz:	
DNA	1 µl
<i>F</i>	1 µl
<i>B</i>	1 µl
PCR-Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	3,5 µl
dNTPs (2mM)	1 µl
Taq-Polymerase	1 µl
A. bidest	14,5 µl

Reaktionsprogramm:		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
94°C	2	1
94°C	0,75	35
53°C	0,5	
72°C	1	
72°C	10	1

Ein Amplikon von etwa 410 bp zeigt die Anwesenheit der kodierenden Region des TetO-lacZ-Transgens.

h) delta-Neo PCR

Reaktionsansatz:	
DNA	1 µl
<i>E3rev</i>	0,2 µl
<i>E3forw</i>	0,2 µl
<i>neo</i>	0,2 µl
PCR-Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	2 µl
dNTPs (2mM)	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
A. bidest	17,4 µl

Reaktionsprogramm:		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
94°C	5	1
94°C	1	35
70°C	2	
72°C	1	
72°C	10	1

Ein Amplikon von etwa 550 bp zeigt die Anwesenheit der Neomycin-Selektionskassette an, ein Amplikon von 850 bp das Fehlen dieser Region in Cx45KI36-Mäusen.

i) Cx45flox PCR

Reaktionsansatz:	
DNA	1 µl
<i>E3rev</i>	0,2 µl
<i>I5FCfor</i>	0,2 µl
PCR-Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
A. bidest	18,5 µl

Reaktionsprogramm:		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
94°C	4	1
94°C	2	35
67°C	1	
72°C	1	
72°C	10	1

Ein Amplikon von etwa 500 bp zeigt die Anwesenheit des Wildtyp Cx45-Locus, ein Fragment von 600 bp den geflochten Cx45-Locus und ein 650 bp großes Amplikon den Cx45KI36-Locus an.

3.4.2 RT-PCR-Analysen

Die RT-PCR dient zum Nachweis von Transkripten. Bei dieser Methode wird mRNA *in vitro* mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (aus dem Moloney Murine Leukemia Virus) in cDNA umgeschrieben und als Matrize für eine spezifische PCR Reaktion eingesetzt.

3.4.2.1 Reverse Transkription zur cDNA-Herstellung

Nach der Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Gewebe (siehe 3.1.9) wurde die RNA mit Hilfe von Oligo-dT Startermolekülen revers transkribiert. Hierzu wurde zuerst ein Ansatz von 2 µl Gewebe-RNA (5 µg/µl) und 1 µl Oligo-dT (0,5 µg/µl) auf 12 µl mit DMPC-H₂O aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Für die reverse Transkription wurden dann 1 µl dNTPs (je 10 mM), 4 µl 5x Puffer, 2 µl DTT (0,1

M), 1 µl RNasin (40 U/µl) und 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl) zugefügt. Nach der reversen Transkription für 50 min bei 42°C wurde der Ansatz für 15 min bei 70°C denaturiert. Die so gewonnene cDNA konnte bei -70°C gelagert werden.

3.4.2.2 PCR zur Amplifikation umgeschriebener RNA

Bei allen im Folgenden beschriebenen PCRs handelt es sich um Temperatur-Erniedrigungs-PCRs. Durch stetiges Erniedrigen der Anlagerungstemperatur der Startermoleküle pro Zyklus um ein Grad werden unspezifische Bindungen verhindert. Um eine Amplifizierung von genomischer DNA auszuschließen, wurden Ansätze mit (wenn möglich) intronüberspannenden Startermolekülpaaren gewählt.

a) PCR zur Amplifikation von Cx36

Reaktionsansatz:	
cDNA	1 µl
<i>Cx36 USP</i>	5 µl
<i>Cx36 DSP</i>	5 µl
PCR-Puffer	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTPs	2 µl
Taq-Polymerase	1 µl
A. bidest	28 µl

Reaktionsprogramm:		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
94°C	3	1
94°C	1	10
65°C→55°C	1	
72°C	2	
94°C	1	25
55°C	1	
72°C	2	
72°C	7	1

Das amplifizierte intronüberspannende cDNA-Fragment hat eine Größe von 448 bp.

b) PCR zur Amplifikation von LacZ

Reaktionsansatz:	
cDNA	1 µl
<i>LacZ DSP</i>	5 µl
<i>LacZ USP</i>	5 µl
PCR-Puffer	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTPs	2 µl
Taq-Polymerase	1 µl
A. bidest	28 µl

Reaktionsprogramm:		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
94°C	3	1
94°C	1	10
65°C→55°C	1	
72°C	2	
94°C	1	25
55°C	1	
72°C	2	
72°C	7	1

Das amplifizierte cDNA-Fragment hat eine Größe von 430 bp.

c) PCR zur Amplifikation von Aktin

Reaktionsansatz:		Reaktionsprogramm:		
		Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
cDNA	1 µl	94°C	3	1
<i>Aktin USP</i>	5 µl	94°C	1	10
<i>Aktin DSP</i>	5 µl	65°C→55°C	1	
PCR-Puffer	5 µl	72°C	2	
MgCl ₂	3 µl	94°C	1	25
dNTPs	2 µl	55°C	1	
Taq-Polymerase	1 µl	72°C	2	
A. bidest	28 µl	72°C	7	1

Die Amplifikation der β -Aktin cDNA ermöglicht einen Abgleich der einzelnen PCR-Reaktionen und dient gleichzeitig, aufgrund der intronüberspannenden Startermoleküle, einer Überprüfung auf genomische DNA. Das amplifizierte cDNA-Fragment hat eine Größe von 243 bp, das Fragment aus genomischer DNA eine Größe von 330 bp.

3.4.2.3 Real-Time RT-PCR zum quantitativen Abgleich von Transkriptmengen

In Zusammenarbeit mit Dr. Oksana Shynlova und Prudence Tsui aus der Arbeitsgruppe von Prof. S. J. Lye (Toronto) wurden cDNA-Proben aus Uterusgewebe auf das Expressionsniveau verschiedener Kontraktions-abhängiger Proteingene untersucht. Alle hierzu verwendeten Startermoleküle wurden anhand von GenBank-Sequenzen (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/>) abgeleitet und von ACGT (Toronto, Ontario, Kanada) synthetisiert. Die RT-PCR wurde in einer lichtdurchlässigen 96-Loch-Platte mit dem „ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System“ (Applied Biosystems) und dem SYBR Green Farbstoff durchgeführt. Das verwendete Protokoll war wie folgt: Denaturierung bei 95°C für 10 min, 40 Amplifikations-Zyklen bei 95°C für 15 sec und 60°C für 1 min. Dabei wurde der Schwellenwert der Reaktion (Ct) für jede Probe aufgenommen. Jede Probe wurde dreimal untersucht und der Mittelwert der drei Ct-Werte berechnet. Im Anschluss wurde die relative Bestimmung der Genexpression durchgeführt, um mögliche Expressionsunterschiede festzustellen. Die arithmetische Formel zur vergleichenden Ct-Wert-Bestimmung findet sich im „ABI User Bulletin #2“. Die mRNA-Menge jeder Probe wurde mit der Menge der ribosomalen 18S mRNA abgeglichen, um die relative Genexpression abschätzen zu können.

3.4.3 Southern Blot-Analyse

Bei diesem Verfahren wird die isolierte DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten, die Fragmente entsprechend ihrer Größe durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, denaturiert und zur Hybridisierung auf eine Membran übertragen. Nach Immobilisierung können einzelne DNA-Fragmente mit sequenzspezifischen Sonden nachgewiesen werden.

3.4.3.1 Restriktionsspaltung, Gelelektrophorese und Transfer

Bis zu 20 µg aufgereinigte genomische DNA wurden nach Zusatz von 1-2 µl RNase 2000 und Restriktionsenzymen (5 U/µg DNS) üN gespalten, dann gelelektrophoretisch aufgetrennt. Um den Transfer großer DNA-Fragmente zu erleichtern, wurde das Gel bei RT mit SB-Depurinierungslösung (10 min) und SB-Denaturierungslösung (30 min) schwenkend inkubiert. Unter Verwendung von SB-Transfer-Puffer wurden die DNA-Fragmente mittels Kapillarblot (üN) auf eine Hybond N⁺-Membran (Amersham) übertragen. Nach 24 h wurde die Membran vorsichtig vom Gel abgenommen, in 2x SSC-Puffer geschwenkt und getrocknet. Durch UV-Bestrahlung (UV Stratalinker 2400, Stratagene) wurden die DNA-Fragmente auf der Membran immobilisiert.

3.4.3.2 Sondenmarkierung, Hybridisierung, Waschen und Autoradiografie

Für eine sequenzspezifische Hybridisierung mit der immobilisierten DNA wurden unter Verwendung des "Multiprime DNA labeling"-Systems (Amersham) entsprechend der Herstellerangaben sequenzspezifische Sonden radioaktiv markiert. In die Markierungsreaktion wurden 50 ng zu markierender DNA und 30 µCi radioaktiver $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP Lösung eingesetzt. Die Markierungsreaktion wurde durch Vermessung der jeweiligen Sondenlösung im Szintillationszähler (Beckman LS 1801) überprüft. Vor der Verwendung in der Hybridisierungsreaktion wurden die Sondenmoleküle für 5 min bei 100°C denaturiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h bei 42°C im Rollinkubator mit Prähybridisierungslösung (Quick-Hyb, Stratagene) inkubiert, anschließend die radioaktiv markierte, denaturierte Sonde zugegeben und 1-2 h bei 42°C inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger oder unspezifisch anhaftender Sondenmoleküle wurde die Membran bei abnehmender Salzkonzentration mit SB-Waschlösung bei 65°C gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die feuchte Membran in Plastikfolie eingeschweißt, in einer Röntgenkassette (Siemens Titan 2) mit einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR) bedeckt und für 3 - 21 Tage bei -70°C exponiert. Die Entwicklung des Röntgenfilmes erfolgte in einer Entwicklermaschine (Agfa Curix 60).

3.4.4 Northern Blot-Analyse

Gesamt-RNA wird durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese in Gelen aufgetrennt. Das Gel wird mit angelegtem Fluoreszenzlineal vermessen. Der Übertrag der RNA auf die Nylon N-Membran (Amersham) erfolgt im Gegensatz zum Southern Blot unter neutralen Bedingungen mittels 20x SSC. Das Gel wird 30 min in 20x SSC vorinkubiert. Der Blotaufbau entspricht dem des Southern-Kapillar-Blots. Der Transfer erfolgt für 24 bis 48 h bei RT. Die Membran wird nach Blotabbau und Markierung der Lage der Geltaschen auf der Membranrückseite zweimal für 1 min in 2x SSC gewaschen und zur Immobilisierung der RNA UV-kreuzvernetzt. Die Lagerung der Membran erfolgt bei RT zwischen 3 MM Whatman-Papier. Sondenmarkierung, Hybridisierung, Waschen und Autoradiografie erfolgen wie unter Punkt 3.4.3.2 beschrieben.

3.5. Kompetente Bakterien und Transformation

3.5.1 Herstellung hocheffizienter transformationskompetenter Bakterien

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

Eine einzelne Bakterienkultur (*E. coli* XL I blue) wurde in 2,5 ml SOB-Medium inokuliert und üN in einem Schüttler inkubiert (225 UpM, 37°C, G25, Heraeus). Mit 2 µl dieser üN-Kultur wurden 20 ml SOB-Medium angeimpft. Die Kultur wurde so lange inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war. Die Kultur wurde in zwei 50 ml Röhrchen (Falcon) überführt, auf Eis gestellt und nach 15 min zentrifugiert (5 min, 6.000 UpM, 4°C, Minifuge T, Heraeus). Nach Abnehmen des Überstands wurde das Bakteriensediment in 7 ml TFB-Puffer resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (5 min, 6.000 UpM, 4°C, Minifuge T, Heraeus). Die sedimentierten Bakterien wurden in 2 ml TFB resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 70 µl DnD und eine Inkubation von 15 min auf Eis. Nach der Zugabe weiterer 70 µl DnD wurde die sofortige Transformation mit 200 µl der hergestellten hocheffizienten Bakterien durchgeführt.

3.5.2 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

200 µl hocheffizienter kompetenter Bakterien wurden für eine Transformation zur Plasmid-DNA gegeben (mindestens 10 ng), durchmischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sec im Wasserbad. Der Ansatz wurde für 2 min auf Eis abgekühlt, mit 900 µl SOB-Medium vermischt und für 45 bis 60 min bei 37°C im Schüttler inkubiert (225 UpM, G25, Heraeus). Auf LB-Nährböden, die ein Antibiotikum enthielten, konnte auf die Aufnahme des Plasmids, das eine Antibiotikaresistenz vermittelt, selektioniert werden. Dazu wurden zuerst 100 µl des Ansatzes ausplattiert und anschließend die restlichen Bakterien sedimentiert, in 50 µl Überstand resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Inkubation der Selektionsnährböden erfolgte für 12-20 h bei 37°C.

3.6 Zellkulturtechniken

Alle eukaryontischen Zellen wurden in Heraeus-Inkubatoren in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C gehalten. HeLa-Zellen wurden auf nicht-gelatinisierten Zellkulturplastikgefäßen in D10-Medium bei einem CO₂-Gehalt von 10% kultiviert. Embryonale HM1-Stammzellen (HM1-ES-Zellen) ließen sich bei einem CO₂-Gehalt von 5% auf gelatinisierten Zellkulturplastikgefäßen kultivieren. Beim Arbeiten mit ES-Zellen wurde ausschließlich sterile Einmal-Plastikware verwendet (Falcon, Nunc).

3.6.1 Kultur von ES-Zellen

3.6.1.1 Auftauen und Einfrieren von ES-Zellen

Die in Einfrierröhrchen (Nunc) in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden schnell in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in 9 ml ES-Normalmedium gefüllt, durchmischt und zentrifugiert (7 min, 800 UpM, RT). Nach dem Entfernen des Überstands wurde das Zellsediment in einem gewünschten Volumen Medium resuspendiert und auf eine gelatinisierte Kulturschale gewählter Größe ausgesät.

Zum Einfrieren wurden ES-Zellen trypsiniert (vgl. 3.6.1.3), sedimentiert (7 min, 800 UpM, RT), in 0,5 ml Kulturmedium resuspendiert und in Einfrierröhrchen mit 0,5 ml vorgelegtem 2x ES-Einfriermedium mit 20% (v/v) DMSO vermennt. Die Röhrchen wurden 1 h bei -20°C gelagert, ÜN bei -70°C gefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.6.1.2 Gelatinisieren von Zellkulturplastikgefäßen

Der Boden von Zellkulturplastikgefäßen wurde mit 0,1% (w/v) Gelatinelösung bedeckt, die nach einer Inkubation von mindestens 10 min abgesaugt wurde. Anschließend konnten die Zellen ausgesät werden.

3.6.1.3 Passagieren von ES-Zellen

Nach vollständiger Abnahme des Kulturmediums wurde der Zellrasen zur Entfernung aller Mediumreste und toter Zellen zweimal mit PBS⁻ (37°C) gewaschen. Anschließend wurde mit 1/6 Kulturvolumen ES-Trypsin gewaschen, um PBS⁻-Reste zu entfernen. Durch Zugabe von 1/7 Kulturvolumen ES-Trypsin wurden die adhärent wachsenden Zellen in einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C vom Kulturgefäßboden abgelöst und durch Klopfen an die Kulturgefäßwand vereinzelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einem Volumen Kulturmedium abgestoppt und die Zellen anschließend sedimentiert (7 min, 800 UpM, RT). Das Sediment wurde in einem geeigneten Volumen frischen Mediums resuspendiert und in gewünschter Dichte auf gelatinisierten Kulturgefäßen ausgesät.

3.6.1.4 Elektroporation von ES-Zellen zur homologen Rekombination

Bei der Elektroporation werden die Zellen einem elektrischen Puls ausgesetzt, wodurch kurzzeitig Poren in der Plasmamembran entstehen, durch die exogene DNA ins Zytosol gelangen kann. Zellen, die diese DNA stabil in ihr Genom integrieren, können im Folgenden durch geeignete Selektionsbedingungen angereichert werden. 250 µg der endotoxinfrei präparierten pCx45KI36-IRES-lacZ-DNA wurden in einem Volumen von 500 µl mit 200 Einheiten des Enzyms NotI linearisiert. Für eine effiziente Transfektion mit 250 µg DNA sollten zwischen 20 und 35 Millionen Zellen für eine Elektroporation eingesetzt werden. Dazu wurde der Ausgangszellklon mit Normalmedium bis auf T75-Kulturkolben expandiert. Am Tag der Elektroporation wurden die Zellen vom Kulturgefäßboden gelöst und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Die vereinzelt Zellen wurden sedimentiert und in 700 µl sterilem HBS⁻-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit der linearisierten DNA vermengt und in eine Elektroporationsküvette (4 mm, AGS) überführt. Die Elektroporation wurde für 0,1 sec bei 3,0 µF und 0,8 kV durchgeführt. Die Zellen wurden im Anschluß unter der Sterilbank für 10 min bei RT inkubiert.

3.6.1.5 Selektion und Expansion von G418 resistenten ES-Zellklonen

G418 ist eine dem Neomycin verwandte Substanz, die die Proteinsynthese inhibiert, jedoch durch die vom neo-Gen kodierte Neomycin-Phosphotransferase inaktiviert wird. Da die homologe Rekombination zu einer Resistenz gegen Neomycin führen soll, wird im Folgenden mit G418 selektioniert. Zur Erhöhung der Ausbeute an nicht-identischen ES-Zellklonen wurden die elektroporierten Zellen direkt nach der Transfektion auf sechs 10cm-Kulturschalen aufgeteilt und im Weiteren getrennt voneinander expandiert, bzw. der Selektion ausgesetzt. Das Selektionsmedium wurde erstmals 4 Tage nach dem Aussäen gewechselt, dann jeden dritten Tag. Die Selektionsbedingungen wurden für die isolierten Klone bis zum Einfrieren aufrechterhalten, wobei das Medium ab der Isolierung jeden Tag gewechselt wurde. Die auf die Vertiefung von 48-Loch-Kulturschalen isolierten ES-Zellklone wurden jeweils über 4-6 Passagen bis auf 10 cm-Kulturschalen und T25-Kulturkolben expandiert.

3.6.1.6 Isolierung von ES-Zellklonen

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

3.6.2 Kultur von HeLa-Zellen

3.6.2.1 Einfrieren und Auftauen von HeLa-Zellen

Zum Einfrieren von Kulturzellen wurden die Zellen einer 10 cm-Schale nach der Trypsinbehandlung in 10 ml Medium aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 800 UpM, RT). Der Überstand wurde abgesaugt und die sedimentierten Zellen in 900 µl frischem D10-Medium resuspendiert. In einer Einfrierampulle wurden 100 µl DMSO vorgelegt und die Zellsuspension zugegeben. Die Ampulle wurde ÜN bei -70°C gelagert und anschließend zur Langzeitlagerung in Flüssigstickstoff überführt.

Der Inhalt einer Einfrierampulle wurde nach dem schnellen Auftauen bei 37°C im Wasserbad in ein 15 ml Röhrchen überführt, in dem 9 ml Medium vorgelegt waren. Nach einer Zentrifugation (s. o.) wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und auf der entsprechenden Fläche in Kulturschalen ausgesät.

3.6.2.2 Passagieren von HeLa-Zellen

Das Passagieren von HeLa-Zellen erfordert dieselben Arbeitsgänge, die auch zum Passagieren von HM1-ES-Zellen notwendig sind (vgl. 3.6.1.3). Allerdings wird eine Trypsinlösung anderer Zusammensetzung verwendet (vgl. 2.6).

3.6.2.3 Transiente Transfektion mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation

Bei der Kalzium-Phosphat-Präzipitation wird Fremd-DNA mit Hilfe sich bildender Kristalle in eukaryontische Zellen eingebracht (Chen und Okayama, 1987).

Die zu transfizierenden Zellen wurden 8-12 h vor der Transfektion so ausgesät, dass nach dieser Zeit eine Konfluenz von 60% erreicht wurde. Für eine Transfektion wurden pro 10 cm-Schale 20 µg DNA, pro Vertiefung einer 12-Loch-Schale 600 ng DNA eingesetzt. Die DNA wurde in 500 µl (10 cm-Schale) bzw. 70 µl (Vertiefung einer 12-Loch-Schale) CaCl₂-Lösung aufgenommen. Anschließend wurde das DNA/CaCl₂-Gemisch unter ständigem Schütteln tropfenweise zu derselben Menge 2-fach BBS pipettiert und 12 min bei RT inkubiert. Nach kurzem Mischen wurde das Präzipitat tropfenweise auf die zu transfizierenden HeLa-Zellen gegeben. Die so behandelten Zellen wurden 12 h bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert und anschließend nach zweimaligem Waschen mit PBS⁻ (37°C) weitere 36-48 h in D10-Medium bzw. D10-Hygromyzin-Medium kultiviert (10% CO₂, 37°C).

3.7 Anlegen von Primärzellkulturen von Gehirn und Uterus transgener Mäuse

3.7.1 Gemischte Primärzellkultur von Neuronen und Astrozyten

Um die neuronale Zellkopplung und die Expression von Cx43 in transgenen Cx43^{TetOeGFP}:CaMKIIα-tTA-Tieren zu untersuchen, wurden neugeborene Mäuse mit Isofluran betäubt, für einige Sekunden in 70% Ethanol desinfiziert und das Gehirn unter der Sterilbank präpariert. Dabei wurde das Kleinhirn verworfen und die Menigen sorgfältig entfernt. Nach grober Zerkleinerung des Gewebes mit der Präparationsschere wurde das Gehirn in ein 50 ml Röhrchen mit 10 ml DMEM überführt. Das Gewebe wurde sedimentiert (2000 UpM, 1 min), der Überstand verworfen und die sedimentierten Gewebestücke in 1ml Kulturmedium aufgenommen. Durch mehrfaches Pipettieren wurden die Zellen vereinzelt und die Zellsuspension auf 10 ml mit Kulturmedium aufgefüllt. Nach der Filtration durch sterile Nylon-Gaze (70 µm, Falcon) wurden die Zellen eines Gehirns auf vier 6 cm-Schalen ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C, 10% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von über 95%. Für

spätere Immunfluoreszenzanalysen wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläser ausgesät. Dazu wurden die Deckgläser zunächst für mind. 30 min im Brutschrank mit Poly-L-Lysin-Lösung inkubiert und anschließend zweimal mit H₂O und einmal mit PBS⁻ gewaschen.

3.7.2 Primärzellkultur uteriner Glattmuskelzellen

Adulte Tamoxifen-behandelte Cx43^{fl/fl}; SM-CreERT²-Weibchen sowie die zugehörigen Kontroll-Geschwistertiere wurden durch Genickbruch getötet, die Uteri entnommen, vom Fettgewebe befreit und in 20 ml Initiations-Mix aufgenommen. Unter der Sterilbank wurden die Uteri in eine Petrischale mit HBSS++ überführt, in 1 mm dicke Ringe zerschnitten und in sterile Flaschen mit 10 ml HBSS-- gegeben. Nach drei fünfminütigen Waschschritten in HBSS-- wurden die Gewebestücke mit 10 ml Enzym-Mix vermischt und für 30 min im Schüttelinkubator (100 UpM, 37°C) inkubiert. Anschließend wurden die dissoziierten Zellen mit Hilfe einer Nylon-Gaze (70 µm, Falcon) filtriert, das Filtrat auf Eis gelagert und die nicht gelösten Gewebefragmente erneut mit frischer Enzym-Mix inkubiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis alle Zellen vereinzelt werden konnten. Von jeder Charge wurden 20 µl Aliquots durch Trypan-Blau (Sigma) gefärbt und die Zahl lebender Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Chargen mit weniger als 60% lebenden Zellen wurden verworfen. Anschließend wurden die auf Eis gelagerten Zellsuspensionen vereinigt, zentrifugiert (200 UpM, 15 min, 4°C), der Überstand verworfen und die Zellen in Kulturmedium für Glattmuskelzellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann auf eine 20 cm-Zellkulturschale gegeben. Durch Inkubation für 30 min im Brutschrank setzten sich Fibroblasten auf dem Boden der Kulturschale ab. Glattmuskelzellen blieben in Lösung und wurden abpipettiert. Je 3×10^6 Zellen wurden auf eine 6 cm-Zellkulturschale ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Da glatte Muskelzellen des Uterus in Kultur ihren Phänotyp verändern, wurden alle Experimente nicht später als vier Tage nach Anlegen der Kultur durchgeführt.

3.8 Mikroinjektionen in adhärent wachsende Kulturzellen

Die Mikroinjektion und die darauf folgenden Beobachtungen der Farbstoffausbreitung in Primärkultur- oder transfizierten HeLa-Zellen dient der Charakterisierung von Gap Junction-Kanälen. Dazu sollten die zu untersuchenden Zellen mindestens 2 Tage auf einer 6 cm-Kulturschale kultiviert werden und eine Konfluenz von etwa 60% aufweisen. Am

Untersuchungstag wurden die Zellen vorher zweimal mit PBS⁻ gewaschen, anschließend erneut mit Medium überschichtet und bis zur Analyse im Brutschrank kultiviert.

Die Mikroinjektionsversuche wurden mit dem inversen Mikroskop IM 35 (Zeiss) und der Fluoreszenzeinrichtung HBO 100 W durchgeführt. Die Injektionen wurden durch das Phasenkontrastobjektiv F-LD32/0,40 Ph1 und der Fluoreszenzeinrichtung mit dem entsprechenden Filter verfolgt. Die Injektion der Indikatormoleküle in die Zellen erfolgte durch Iontophorese (20 nA, 2-15 sec) mit Hilfe eines Steuergerätes (Eppendorf). Die 6 cm-Kulturschalen standen während der Mikroinjektion auf einer beheizbaren Platte (Heizgerät TRZ 3700, Zeiss) und wurden so bei annähernd 37 °C gehalten.

Die Kapillaren (Borosilikatglas Kwik-Fil, World Precision Instruments) wurden mit beiden Enden in einen horizontalen Kapillarenzieher (P-97, Sutter Instruments) eingespannt. Der Spitzendurchmesser der so gezogenen Kapillare betrug etwa 1-2 µm. Die Beladung mit der zu injizierenden Farbstoffe (Lucifer Yellow oder Cascade Blue) erfolgte durch eine etwa 5-minütige Inkubation des stumpfen Endes der aufrecht stehenden Kapillare in einem Mikroreaktionsgefäß. Anschließend wurde der Farbstoff in der Kapillare mit Hilfe einer Hamiltonspritze mit LiCl-Lösung luftblasenfrei überschichtet. Die beladene Kapillare wurde anschließend in einen mit LiCl-Lösung gefüllten Mikroelektrodenhalter aus Plexiglas mit einer AgCl-Elektrode (EH-1S, Sachs) eingesetzt. Der Mikroelektrodenhalter wurde an einem steuerbaren Mikromanipulator (Eppendorf) angebracht und konnte über das Steuergerät (Eppendorf) bewegt werden. Die angefärbten Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und fotografiert (Power Shot, Canon, Tokyo, Japan).

3.9 Biocytin-Injektionen in hippocampale Dickschnitte transgener Mäuse

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden von Anke Wallraff aus der Arbeitsgruppe von C. Steinhäuser (Bonn) durchgeführt.

Von zehn Cx43^{TetOeGFP}, CaMKIIα-tTA- und sechs Wildtypmäusen im Alter von 22 bis 48 Tagen wurden hippocampale Dickschnitte (300 µm) angelegt (Steinhäuser et al., 1992). Für die “patch clamp”-Analyse wurden die Schnitte in einer Perfusionskammer auf der Bühne eines Mikroskops (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) plaziert. Die Kammer wurde kontinuierlich mit künstlicher Cerebrospinal-Flüssigkeit (132 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 26 mM Glukose, 1,25 mM NaH₂PO₄, 20 mM NaHCO₃, pH 7,4 bei 35°C) perfundiert. Die verwendete Pipettenlösung bestand aus 130 mM K-Glukonat, 20 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM Na₂ATP, 10 mM HEPES, 0,04 mM EGTA und 0,5% Biocytin (Sigma), pH 7,2. Die

Messpipetten bestanden aus Borosilikatglas (Hilgenberg, Malsfeld) und hatten einen Widerstand von 3 bis 5 MOhm.

Pyramidenneurone der CA1 Region des Hippocampus wurden aufgrund ihrer eGFP-Fluoreszenz oder aufgrund morphologischer Parameter ausgewählt. Während der Ganz-Zell-Ableitungen (20 min) wurden die Zellen über die Injektionspipette befüllt. Strominjektionen in die ausgewählten Neurone riefen Aktionspotentiale hervor, die eine zeitliche Anpassung der Potentialfrequenz zeigten. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die Aufnahmen tatsächlich von Prinzipalzellen stammten. Nur Zellen mit stabilem Eingangswiderstand und Membranpotential über die gesamte Messperiode wurde für die Datenanalyse herangezogen.

Nach den Messungen wurden die Schnitte mit 4% PFA in 0,1 M PBS üN fixiert. Nach der anschließenden Kryoprotektion (30% Sucrose in PBS) wurden Kryoschnitte (60 µm) angefertigt, diese mit 0,1 M Tris-gepufferter Salzlösung (TBS, pH 7.4) gewaschen und mit Cy3-Streptavidin-Antikörpern (Sigma, 1:200 in TBS) für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut in TBS gewaschen und mit "Vectashield mounting medium" (Vector, Burlingham, CA) eingedeckelt.

Biocytin-gefüllte Zellen wurden gezählt (Zeiss Axiophot mit Fluoreszenzoptik) und mit einer Digitalkamera und geeigneter Software aufgenommen (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI).

3.10 Isolierung und Nachweis von Proteinen

3.10.1 Immunoblot-Analyse

Zur Gewinnung der Proteinlysate aus HeLa- und Primärkultur-Zellen wurde RIPA-Puffer auf konfluent bewachsene 10 cm Zellkulturschalen gegeben und für 15 min bei RT schwenkend inkubiert. Die Lysate wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (2 min, 13000 UpM, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde für die Konzentrationsbestimmung zur Immunoblot-Analyse verwendet.

Frisch präparierte Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in vorgekühlten Schraubzylindern mit Metallstäben und einem Hammer zu Pulver zerkleinert und dann, je nach Gewebegröße, für 6-12 h lyophilisiert. Die Gewebe-Lyophilisate wurden in 1 x Complete (Roche) aufgenommen, und nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit Laemmli-Probenpuffer gemischt und in die Gelelektrophorese eingesetzt. Für die Konzentrationsbestimmung wurde der Reagenziensatz „Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination“ (Sigma) entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Die Lysate wurden mittels denaturierender, diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Hierfür wurden 1,5 mm dicke Gele mit 10 - 12,5 % Polyacrylamidgehalt und die Elektrophoresekammern "Mighty Small II" (Hoefer) verwendet. Im Anschluss erfolgte der Elektrotransfer der Proteine (2 h, 4°C, 100 V) unter Verwendung der "Blotting-Chamber Mighty-Small II" (Bio-Rad) aus dem Gel auf eine Hybond-ECL Nitrozellulose-Membran (Amersham) für eine anschließende Chemilumineszenz-Reaktion. Zur Überprüfung der Proteinbeladung und des Proteinübertrages folgten eine Inkubation des Proteingels in Coomassie-Färbelösung (15 min, RT, Wippe) und eine sich anschließende Entfärbung in Coomassie-Entfärber.

Die Membran wurde für mindestens 2 h bei RT schwenkend in WB-Blockierungslösung inkubiert. Hiernach erfolgte unter ständiger Drehung eine Inkubation der Membran mit dem in WB-Blockierungslösung verdünnten Primärantikörper μ N bei 4°C. Überschüssige und unspezifisch anhaftende Antikörpermoleküle wurden im Anschluss durch Waschen mit WB-Waschlösung (3 x 10 min) entfernt. Nach zweistündiger Inkubation mit dem Sekundärantikörper, verdünnt in WB-Blockierungslösung, und erneutem Waschen (3 x 10 min), erfolgte der Nachweis einer spezifischen Immunreaktivität mittels Chemilumineszenz. Hierzu wurde der Reagenziensatz „ECL+Plus“ (Amersham) nach Herstellerangaben verwendet. Die Röntgenfilmentwicklung (Kodak X-OMAT AR) erfolgte in einer Entwicklermaschine (Agfa Curix 60).

Durch reversible Anfärbung der Proteine auf der Membran konnte die beim Elektrobplot übertragene Proteinmenge überprüft werden. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran für 1 min in Ponceau-Färbelösung inkubiert und anschließend gewässert, bis distinkte Proteinbanden sichtbar wurden. Der Abgleich aufgetragener Proteinmengen anhand Coomassie-gefärbter Proteingele oder Ponceau-gefärbter Membranen und die densitometrische Quantifizierung der Bandenintensitäten auf dem Röntgenfilm erfolgte mit dem PC-Programm "Amersham Pharmacia Biotech Image Master Total Lab".

3.10.2 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient zur Fällung eines bestimmten Proteins unter nicht-denaturierenden Bedingungen aus einem Proteingemisch mit Hilfe von Antikörpern. Dadurch wurde eine Anreicherung dieses Proteins erreicht, das anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Immunoblot-Analyse nachgewiesen werden konnte. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Immunpräzipitation wurde durch Dr. Stephanie Urschel (Institut für Genetik, Bonn) durchgeführt.

Der Überstand frischer Retinalysaten in RIPA-Puffer wurde mit 40 µl Sepharose 4B-Gel versetzt und 2 h bei 4°C rotierend vorinkubiert. Durch anschließende Zentrifugation wurden hierbei unspezifisch an Sepharose bindende Proteine sedimentiert. Der Überstand wurde zu einem Gemisch aus 10 µl Sepharose-ProteinA-Gel und 2 µl Antikörper pipettiert, das bereits 30 min auf Eis stehend vorinkubiert. Die Inkubation erfolgte drehend bei 4°C üN. Komplexe aus Antigen, Antikörper und ProteinA-Sepharose wurden sedimentiert. Das Sediment wurde dreimal mit 500 µl RIPA-Waschpuffer und einmal mit A.bidest gewaschen. Das Sediment wurde mit 15 µl 1x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Nach Inkubation bei 65°C, was zu einer Trennung der Verbindungen zwischen Antigen, Antikörper und Protein A-Sepharose führte, wurde Protein A-Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand in der SDS-PAGE eingesetzt.

3.10.3 Kryoschnitte, Dickschnitte und Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Zur Erstellung von Dünnschnitten (5-10 µm) am Kryostaten (Microm) wurden die gefrorenen Organe in Tissue-Tec (Sakura) eingebettet und die Schnitte auf SuperFrost-Plus-Objektträger (Menzel-Gläser) aufgenommen. Für Dickschnitte des Gehirns wurde mit 4% PFA fixiertes Gewebe auf 100 µm Dicke am Vibratom (VT 1000S, Leica) geschnitten und bis zur weiteren Behandlung in 4% PFA auf Eis gelagert.

Nach fünfminütiger Fixierung in 4% PFA wurden die Kryoschnitte in PBS⁻ gewaschen (3 x 5 min). Hiernach erfolgte unter Lichtausschluss die Markierung der Zellkerne mit dem DNA-bindenden Hoechst 33258-Farbstoff (1:1000 in PBS⁻) durch 15 min Inkubation bei RT. Nachfolgende Wasch- und Inkubationsschritte (feuchte Kammer) wurden unter Lichtausschluss vorgenommen. Nach einem Waschschrift in PBS⁻/IF-Waschpuffer erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit IF-Blockierungslösung 1 oder 2 für 1 h. Hiernach wurden die Schnitte mit einer entsprechenden Verdünnung des Erstantikörpers in Blockierungslösung für 1 h bei RT oder bei 4°C üN inkubiert. Nach Waschen in PBS⁻/IF-Waschpuffer 2 erfolgte eine 45-minütige Inkubation (RT) mit entsprechender Zweitantikörperverschüttung in IF-Blockierungslösung 1. Hiernach wurden die Objektträger in PBS⁻ und in A. bidest gewaschen und anschließend mit "Fluorescent Mounting Medium" (Dako) oder "Aqueous Mounting Medium" (Permafluor) eingedeckelt. Die fotografische Auswertung erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop Axiophot (Zeiss) mit angeschlossener AxioCam Color HR Kamera unter Verwendung des PC-Programmes AxioVision (Zeiss) oder am Laser Scanning Mikroskop (LSM 510, Zeiss). Dickschnitte wurden zunächst dreimal kurz mit IF-Waschpuffer gewaschen, für 30 min mit RNase2000 verdaut (1: 100 in IF-Waschpuffer), abermals gewaschen und anschließend für 2 h bei RT blockiert (Blockierungslösung 2). Die Inkubation des primären

Antikörpers erfolgte bei 4°C üN auf dem Sonnenrad. Nach 3 Waschschritten von je 15 min wurden die Schnitte unter Lichtausschluss für 2 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert, abermals gründlich gewaschen, auf Objektträger gezogen und eingedeckelt. Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben für Kryoschnitte beschrieben.

3.10.4 Immunfluoreszenzfärbung an Primärkulturzellen

Für Immunfluoreszenzfärbungen an auf Deckgläsern wachsenden primären Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen dreimal kurz mit PBS⁻ gewaschen und fixiert. Uterine Glattmuskelzellen wurden dazu fünf Minuten mit 4% PFA, Neurone und Astrozyten 5 min mit PFA/Pikrinsäure (15% Pikrinsäure in 4% PFA) behandelt. Nach weiteren kurzen Waschschritten wurden die Primärzellen für 45 min mit Blockierungslösung 1 und 1 h (RT) bzw. üN (4°C) mit den primären Antikörpern inkubiert. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern erfolgte für 45 min bei RT, nachdem die Zellen zunächst dreimal mit PBS⁻ gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen (PBS⁻) und mit "Aqueous Mounting Medium" (Permafluor) auf Objektträgern eingedeckelt. Die mikroskopische Analyse erfolgte wie unter Punkt 3.10.3 beschrieben.

3.10.5 X-Gal-Färbungen von Zellen und Geweben

Da es nach vollständiger Deletion der loxP-markierten Cx43-DNA-Sequenz bzw. dem Austausch des Cx45Exon3 gegen die Cx36 kodierende Sequenz zur Aktivierung eines β -Gal-Reportergens kommt, konnte die X-Gal-Färbung zum *in situ* Nachweis der Cre-vermittelten Deletion von Cx43 und Cx45 und dem Nachweis der jeweiligen Promotoraktivität eingesetzt werden. Die β -Galaktosidase katalysiert hierbei die Hydrolyse des Substrates X-Gal zum sichtbaren blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo. X-Gal-Färbungen an Schnitten erfolgten entsprechend der Angaben in Akagi et al. (1997).

3.10.5.1 X-Gal-Färbung transfizierter Zellen

Zunächst wurden die Zellen zweimal mit PBS⁻ gewaschen. Nach vollständiger Entfernung der Waschlösung wurden die Zellen 5 min in LacZ-Fixierlösung inkubiert und anschließend dreimal mit PBS⁻ gewaschen. Nach dem letzten Waschschriff wurde die LacZ-Substratlösung hinzugegeben, die Inkubationsschalen mit Parafilm luftdicht verschlossen und 2 bis 12 h bei

37°C inkubiert. Die Färbung wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS⁻ abgestoppt. Zur Lagerung bei 4°C wurden die Zellen mit 70% (v/v) Glycerol überschichtet.

3.10.5.2 X-Gal-Färbung an Gewebe-Kryoschnitten

Hierfür wurden Objektträger mit 5 - 25 µm dicken Kryoschnitten der gewünschten Organe oder verschiedener embryonaler Stadien zunächst 5 min in LacZ-Fixierungslösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in LacZ-Waschlösung (je 5 min), wurden die Objektträger in LacZ-Substratlösung üN bei 37°C luftdicht verschlossen inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger bis zum Entfernen möglicher Salzkristalle in LacZ-Waschlösung gewaschen, getrocknet und dann in „Entellan“ (Merck) eingedeckelt. Die Dokumentation erfolgte entweder am Axiophot oder am Binokular MS5 (Leica).

3.10.5.3 Nachweis des grün fluoreszierenden Proteins (eGFP) in lebenden Zellen und Gewebedickschnitten

Der Nachweis des eGFP-Reporterproteins erfolgte mit dem inversen Mikroskop IM 35 (Zeiss) und der Fluoreszenzeinrichtung HBO 100 W. Da die Anregungswellenlänge des eGFP bei 398 nm liegt, wurden die Beobachtungen mit dem Filter BP 365, FT 395, LP 397 durchgeführt.

3.11 Herstellung und Verwendung verschiedener Mauslinien

3.11.1 Erzeugung, Haltung und Handhabung transgener Mäuse

Die in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden nach den Vorgaben des geltenden Tierschutzgesetzes nach vorheriger Genehmigung durch die Bezirksregierung Köln durchgeführt (Aktenzeichen 23.203.2 BN 49, 28/94 und 15/96 sowie 50.203.2 BN 49, 32/01 mit dem Titel „Untersuchung des Einflusses defekter interzellulärer Kommunikation auf die Tumorentstehung, Organentwicklung und Physiologie von Mäusen“).

3.11.2 Zucht- und Haltungsbedingungen von Mäusen

Die Mäuse wurden in offenen Tierställen bei einem konstanten Licht-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Für die Bestimmung des embryonalen Entwicklungsstadiums wird von einer Kopulation zur Mitte der Dunkelphase ausgegangen. Verpaarungen werden durch die gemeinsame Haltung eines Männchens mit 1-2 Weibchen in

einem Käfig angesetzt. Erfolgreiche Verpaarungen werden zu Beginn der nächsten Lichtphase anhand eines als Vaginalpfropf in der Vagina des Weibchens verbliebenen Ejakulats erkannt. Die Mitte der Lichtphase nach der Kopulation wird als 0,5 dpc (dies post coitum) definiert. Die Geburt des ersten Jungtieres von Wildtyp-Müttern fand zu 98% zwischen 04.00 und 08.00 am Tag 19,5 statt.

3.11.3 Superovulation von C57BL/6-Spenderweibchen

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

3.11.4 Injektion von ES-Zellen in Blastozysten und Retransfer in scheinschwangere Weibchen

Eine detaillierte methodische Beschreibung zur Erzeugung chimärer Mäuse findet sich bei Nagy et al. (2003b). Die Injektionen embryonaler Stammzellen mit dem Genotyp Cx45KICx36^{fl/+} in Blastozysten sowie der Transfer der manipulierten Blastozysten in die Uteri scheinschwangerer Weibchen wurden von Ina Fiedler (Universität Bonn) durchgeführt.

Zur Identifizierung genetisch veränderter Mäuse nach Blastozysteninjektion homolog rekombinierter embryonaler Stammzellen wird häufig die Fellfarbe als genetischer Marker genutzt (Nagy et al., 2003b). Wildtyp-ES-Zellen der Linie HM1 (Magin et al., 1992) aus dem Mausstamm 129P2/OlaHsd waren die Ausgangszellen zur Erzeugung von Cx45KICx36-ES-Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit zur Erzeugung einer Cx45KICx36-Mauslinie verwendet wurden. Mäuse des entsprechenden Stammhintergrundes prägen aufgrund einer Inhibition der Melaninproduktion in den Haarfollikeln die Fellfarbe agouti dominant aus. Die Cx45KICx36-ES-Zellen wurden in Blastozysten von C57BL/6-Weibchen (Fellfarbe: schwarz) transferiert. Der Beitrag der transferierten ES-Zellen zur Entwicklung der Nachkommen konnte anhand des Fellfarbenschimärismus abgeschätzt werden (Anteil agouti an schwarz). Der Beitrag der manipulierten ES-Zellen zur Bildung von Keimzellen wurde durch Verpaarung dieser Chimären mit

C57BL/6-Mäusen überprüft. Das Auftreten vollständig agoutifarbener Nachkommen wies Keimbahntransmission nach. Diese Nachkommen wurden nach Genotypisierung und Verpaarung mit C57BL/6-Mäusen zur Expansion der neuen Mauslinie eingesetzt.

3.11.5 Erzeugung der Cx43^{TetOeGFP}-Mauslinie durch Vorkerninjektion

Mäuse dieses Genotyps wurden durch Vorkerninjektion des aufgereinigten Vektors pTetOCMVbiCx43eGFPIsolator (Döring, 2001) in der Umeå Transgene Core Facility, Umeå, Schweden hergestellt. Dabei wurden 30 ng der aufgereinigten und durch Sall-Spaltung vom bakteriellen Vektorrückgrat befreiten DNA in den männlichen Vorkern befruchteter Eizellen injiziert. Die verwendeten Zygoten entstammten Mäusen mit gemischtem C57BL/6, FVB/N-Hintergrund. Nach der Injektion der Vektor-DNA wurden die Zygoten in Oviduktscheinschwangerer Leihmütter transferiert.

Die Nachkommen wurden durch Southern Blot und PCR Analysen genotypisiert und die als transgen identifizierten Tiere mit CaMKII α -tTA-Mäusen (Mayford et al., 1996) verpaart. Jedes zur Verpaarung eingesetzte Tier ist dabei der Begründer einer eigenen Linie.

3.12 Funktionale Analysen an transgenen Tieren

3.12.1 Induzierbare Ausschaltung von Cx43 in adulten Mäusen

3.12.1.1 Verwendung von Tamoxifen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Cre-Mauslinie SM22CreERT²-Cre (Kühbandner et al., 2000) zur induzierbaren Ausschaltung von Cx43 in adulten Tieren verwendet. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Injektionslösungen frisch verwendet und die Tiere ein bis 12 Wochen nach Induktionsbeginn für die weiteren Versuche verwendet.

Für die Untersuchungen zur induzierbaren Ausschaltung von Cx43 wurden Cx43^{fl/fl}:SM-CreERT²- und Cx43^{2lox/2lox}:SM-CreERT²-Mäuse sowie entsprechende Kontrolltiere verwendet. Im Ergebnisteil sind die Genotypen der jeweils verwendeten Kontrolltiere aufgeführt.

Zur Induktion der Translokation der Cre-ERT²-Rekombinase aus dem Zytosol in den Zellkern oder als Kontrollversuch wurde den Tieren Tamoxifen oder das Suspensionsmittel Erdnussöl (Originalabfüllung aus Apotheken) injiziert. Zur Herstellung einer Tam-Injektionslösung (1 mg/100 μ l) wurden 500 μ l EtOH zu 100 mg Tamoxifen gegeben. Nach intensivem Mischen auf dem Strudelmischer und Behandlung im Ultraschallwasserbad wurden dem Ansatz 9,5 ml Erdnussöl zugegeben. Nach weiterer Mischung auf dem Strudelmischer und im Ultraschallbad

wurde den Mäusen, basierend auf den Angaben von Feil et al. (1996), für fünf Tage alle 24 Stunden 1 mg der Suspension intraperitoneal injiziert.

3.12.1.2 Verwendung von Doxyzyklin

Zur funktionalen Überprüfung des verwendeten Tet-OFF-Systems und möglicher Nebenwirkungen der Doxyzyklin-Applikation in Cx43^{TetOeGFP}-Tieren, wurden doppelt-transgene (Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA), einfach transgene (Cx43^{TetOeGFP} oder CaMKII α -tTA) und Wildtypiere desselben Wurfs mit Doxyzyklin-haltigem Trinkwasser versorgt. Dazu wurden den Tieren für zwei Wochen 50 mg/l des Antibiotikums mit 5% Sucrose in lichtgeschützten Flaschen verabreicht. Da Doxyzyklin bei höheren Konzentrationen ausfällt, wurde das Wasser täglich gewechselt.

3.12.2 Messung der gastrointestinalen Transitzeit

Männlichen Mäusen im Alter von 10 bis 12 Wochen wurde 16-20 h vor den Versuchen die Futter-, nicht aber die Wasserversorgung entzogen, um die gastrointestinale Motilität unter nüchternen Bedingungen untersuchen zu können und mögliche Motilitäts-Beeinträchtigungen durch (nicht-) allergene Futterantigene auszuschließen (Fargeas et al., 1993). Die Messung des gastrointestinalen Transports wurde nach einer von De Winter et al. (1997) beschriebenen Methode abgeändert durchgeführt. Den Tieren wurden 0,1 ml Methylenblau (50 mg in 1 ml 0,9% NaCl mit 0,5% Methylzellulose) mit Hilfe einer kurzen Kanüle ins Maul appliziert. Nach 15 min wurden die Mäuse getötet, der Magen-Darmtrakt entnommen und die Wanderungsstrecken des Farbstoffs vom Pylorus bestimmt. Da die Gesamtlänge des Darmes zwischen den untersuchten Tieren schwankte, wurde der gastrointestinale Transit als Wanderungsstrecke in Prozent der Darmlänge ausgedrückt.

3.12.3 Bestimmung der Gewichtszunahme von Mäusen und des Wassergehalts gastrointestinalen Gewebes

Um zu untersuchen, ob der Verlust von Cx43-vermittelter Kopplung zwischen Glattmuskelzellen des Darmes einen Einfluss auf die Nährstoffaufnahme und damit auf das Gewicht der Tiere und die Entstehung von Ödemen hat, wurden Tamoxifen-behandelte und unbehandelte Cx43^{fl/fl}: SM-CreER^{T2}- und Cx43^{fl/fl}-Mäuse einmal pro Woche von der vierten bis zur zwanzigsten Woche nach der Geburt gewogen. Nach der letzten Messung wurden allen Tiere getötet, der Darm

entnommen, gewogen und bei 90°C bis zu einem konstanten Gewicht getrocknet. Der prozentuale Wasseranteil wurde folgendermaßen berechnet:

$$W = 100 \times (\text{Nassgewicht} - \text{Trockengewicht}) / \text{Nassgewicht}.$$

3.12.4 Analyse der viszeralen Schmerzempfindlichkeit

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden von Dr. Birgit Adam und Dr. Tobias Liebrechts in der Arbeitsgruppe von Prof. G. Holtmann (Essen) durchgeführt.

Männlichen, Tamoxifen-behandelten und unbehandelten Cx43^{fl/fl}: SM-CreER^{T2}- und Cx43^{fl/fl}-Mäusen (25-30 g) wurden zunächst Elektroden zur elektromyographischen Untersuchung (EMG) implantiert. Dazu wurde den anästhesierten Tieren das Abdomen geöffnet und Teflon-isolierte Silberdrähte (Cooner Wire Co., Chatsworth, CA/USA) als bipolare Elektroden in den *musculus obliquus externus* über dem *ligamentum inguinale* implantiert. Die EMG Elektroden wurden durch einen Schnitt im Nacken der Tiere nach außen geführt. Alle Tiere wurden nach der Operation für fünf Tage in Einzelkäfigen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Der viszeromotorische Reflex (VMR), der durch colorektale Distension ausgelöst wird, wurde durch EMG-Aufnahmen der Kontraktionen der Abdominalwand quantifiziert (Ness und Gebhard, 1990). Distensionen des Colons und Rektums wurden mit Hilfe von Druck-kontrollierten, aufblasbaren Ballons (1 cm Länge) erreicht, deren Volumen über einen Barostaten (Distender Series II barostat, G&J Electronics, Willowdale, Ontario, Kanada) geregelt wurde. Nach einer Fasten-Periode von 18 h wurde der Ballon in das Colorektum inseriert und etwa 1 cm proximal zum Anus unter leichter Halothan-Anästhesie (Halothan Eurim, Eurim-Pharm Arzneimittel, Piding) positioniert. Mindestens 45 min nach der Anästhesie wurden die EMG Elektroden an das EMG-Aufnahme System (ISOLAB/IDAA, Intestinal Data Acquisition and Analysis, Fa. Standard Instruments, Karlsruhe) angeschlossen. Das durchgeführte Protokoll bestand aus zwei tonischen Distensionen von drei Minuten Dauer und einem Druck von 60 mmHg.

3.12.5 Kontraktionsanalysen

Die mechanische Aktivität von Segmenten des Maus-Jejeunums wurden durchgeführt, wie zuvor von Lucius et al. (1998) beschrieben. Dazu wurden Streifen des zirkulären Muskels (1 x 10 mm), in einem Organbad (5 ml) befestigt, das mit 37°C warmer, physiologischer Salzlösung (118 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM MgCl₂, 1.6 mM CaCl₂, 24 mM HEPES, 10 mM Glukose, pH 7,4) gefüllt war und mit 100% O₂ begast wurde. Die isometrische Kraft wurde durchgehend mit Hilfe eines “KG 7 force-displacement Transducers” (Scientific Instruments,

Heidelberg) aufgenommen. Jedes Streifenpräparat wurde für 1 h im Organbad äquilibriert und dann stufenweise bis auf seine optimale Länge gedehnt. Dosis-Wirkungskurven wurden durch Zugabe ansteigender Konzentrationen der muskarinergen Agonisten Carbachol (0,01-100 μ M) und KCl (10-60 mM) für 25 min, gefolgt von 30-minütigen Waschschritten, aufgenommen. Diese Untersuchungen wurden im Labor der Arbeitsgruppen von Prof. G. Pfister (Köln) durchgeführt.

3.12.6 Bestimmung des Progesterongehalts im Blut von Mäusen

Tamoxifen-behandelte und unbehandelte Cx43^{fl/fl}: SM-CreERT²- und Cx43^{fl/fl}-Weibchen wurden an Tag 16,5 und zum Zeitpunkt der Geburt mit Isofluran betäubt, dekapitiert und das Blut in heparinisierten Röhrchen (Sarstedt) gesammelt. Nach der Zentrifugation (13.000 UpM, 10 min, 4°C) wurde das Plasma abgenommen und bei -70°C gelagert. Die Konzentration des Plasma-Progesterons wurde mit Hilfe eines humanen Radioimmunoassay-Systems (Coat-A-Count; DPC, Los Angeles, CA) nach den Angaben des Herstellers in Zusammenarbeit mit Dr. Oksana Shynlova (Toronto) durchgeführt.

3.12.7 Verhaltensanalysen

Alle gezeigten Analysen wurden von Dr. Ekrem Dere aus der Arbeitsgruppe von J. P. Huston (Düsseldorf) an 18 Wochen alten, männlichen Cx43^{TetOeGFP}: CaMKII α -tTA-Mäusen und gleichaltrigen Kontroll-Geschwistertieren durchgeführt. Die Tiere wurden eine Woche vor den Analysen in Einzelkäfigen gehalten.

3.12.7.1 Offenfeld-Test

Um die exploratorische Aktivität in einer neuen Umgebung und die räumliche Habituation zu untersuchen, wurden die Tiere in zwei Durchläufen (im Abstand von 24 h) in der Offenfeld-Apparatur (30 x 30 x 40 cm) aus grauem PVC- Kunststoff und einem weißen Boden getestet. Die Apparatur wurde mit diffusem weißem Licht beleuchtet. Bewegungen dieser Tiere wurden mit einer Videokamera aufgezeichnet, die 1 m über der Apparatur befestigt war. Das digitalisierte Bild der Bewegung wurde mit einem halbautomatischen Überwachungsgerät (EthoVision, Noldus, Niederlande) analysiert. Nach jedem Durchlauf wurde die Apparatur mit Ethanol gereinigt. Folgende Verhaltens-Parameter wurden in den 5-minütigen Durchläufen untersucht: (1) Häufigkeit des Aufrichtens, bei dem das Tier auf seinen Hinterläufen steht, (2)

Lokomotion als Distanz in cm, die das Tier zurückgelegt hat, (3) Zeit, die sich das Tier in der Mitte (10 x10 cm) der Apparatur aufhielt, (4) Zeit, die sich das Tier in den vier Ecken (10 x 10 cm) der Apparatur aufhielt und (5) Laufgeschwindigkeit.

3.12.7.2 Objekterkennung

Jede Maus wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen in einem bekannten Offenfeld mit vier Durchläufen pro Tag und Zwischenintervallen von acht Minuten getestet. Jeder Durchlauf dauerte zwei Minuten, während dessen zwei unterschiedliche Objekte (aus Glas mit unterschiedlicher Form, Größe, Oberflächenbeschaffenheit und Farbe) im Offenfeld präsentiert wurden. Im ersten Durchlauf des ersten und zweiten Tages durften die Mäuse die Objekte untersuchen. Im zweiten Durchlauf jeden Tages wurde ein bekanntes Objekt durch ein unbekanntes ersetzt. Im dritten Durchlauf wurde das neuere Objekt im Offenfeld belassen, aber das alte ersetzt. Der vierte Durchlauf bestand darin, wiederum das ältere Objekt durch ein neues zu ersetzen. Nach jedem Durchlauf wurde die Apparatur mit Ethanol gereinigt. Die Zeit, die ein Tier ein Objekt untersuchte, wurde separat gemessen (Stoppuhrmessungen der auf Videoband aufgezeichneten Durchläufe).

3.12.7.3 Gestaffelter Ängstlichkeitstest

Die Testapparatur bestand aus zwei offenen (29 x 5 cm) und zwei begrenzten Armen (19 x 5 x 15), die nach oben hin offen und um eine zentrale Plattform orientiert waren. Dabei standen sich die Arme eines Typs gegenüber. Ein Arm hatte transparente Wände und einen weißen Boden, der anderen opaque-graue Wände und einen schwarzen Boden. Die offenen Arme waren entweder mit einem weißen oder schwarzen Boden ausgestattet. Die Apparatur befand sich 40 cm über dem Boden und wurde nach jedem Durchlauf mit Ethanol gereinigt. Zu Versuchsbeginn wurden die Mäuse auf die zentrale Plattform gesetzt und für 5 min beobachtet. Anschließend wurde die Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Arme der Testapparatur bestimmt.

3.12.7.4 Rotarod-Test

Die Motorkoordinationsfähigkeit und das motorische Lernvermögen wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen mit einem Rotarod-Apparat (Modell Nr. 7650, TSE Systems, Bad Homburg) getestet. Der rotierende Stab hatte einen Axendurchmesser von 3,5 cm, eine schwarze Kunststoffoberfläche und befand sich 10 cm über dem Boden. Am ersten Tag wurde in einem Durchlauf die grundsätzliche Motorkoordinationsfähigkeit bestimmt. Am zweiten Tag wurde

jede Maus in drei Durchläufen auf ihre motorische Lernfähigkeit untersucht. Dabei mussten die Mäuse für längstens fünf Minuten auf dem sich beschleunigend drehenden (0-40 UpM) Stab laufen, wobei die Zeit, die die Tiere auf dem Stab verblieben, gemessen wurde.

3.12.8 Neurochemische Analysen

Nach den Verhaltensanalysen wurden die Tiere getötet und die Konzentrationen verschiedener Monoamine (Dopamin, Noradrenalin, Serotonin), ihrer Metabolite sowie Acetylcholin und Cholin in verschiedenen Gehirnnarealen gemessen (Damsma et al, 1987; Potter et al., 1983). Dazu wurden die Tiere durch Genickbruch getötet, dekapitiert und das Gehirn entnommen. Auf einer eiskalten Unterlage wurden Frontaler Cortex, Amygdala, Hippocampus, Neo- und ventrales Striatum und Cerebellum präpariert. Das Gewebe wurde gewogen und in eiskalter 0,05 N Perchlorsäure mit Ethylhomocholin und Deoxyepinephrine als interner Standard homogenisiert. Das Homogenisat wurde zentrifugiert, gefiltert und bei -70°C gelagert. Anschließend wurden die Proben flüssigchromatographisch und mit Hilfe elektrochemischer Detektion vermessen. Diese Analysen wurden von Dr. Maria A. De Souza-Silva aus der Arbeitsgruppe von J. P. Huston (Düsseldorf) durchgeführt.

3.12.9 Untersuchung der Epilepsieneigung transgener Mäuse (Timm-Färbung)

Die Tiere wurden gewogen, in Einzelkäfige gesetzt und mit dem Parasympathikolytikum Methylscopolamin (1 mg/kg in Ringerlösung) zur Abschwächung peripherer muskarinerger Effekte intraperitoneal vorinjiziert. Nach 30 min wurde den Tieren 250 mg/kg Pilocarpin (direktes Parasympathikomimetikum) intraperitoneal injiziert, die Mäuse für 160 min beobachtet und die Anfallsstadien in 10-Minuten-Intervallen aufgezeichnet. Dabei wurden die Anfallsstadien nach einer leicht modifizierten Skala von Racine (1972) und Schauwecker und Steward (1997) beurteilt:

- Stadium 0: normale Aktivität
- Stadium 1: Immobilität, stereotypes Schnüffeln
- Stadium 2: ausgestreckter Schwanz, Kaubewegungen
- Stadium 3: unilateraler Vorderextremitätenklonus, Kopfnicken
- Stadium 3,5: leichter kompletter Körperklonus, Stellreflexe sind vorhanden
- Stadium 4: Aufrichten des Rumpfes und bilateraler Vorderextremitätenklonus

- Stadium 4,5: starker kompletter Körperklonus ohne Aufrichten des Rumpfes aber mit seitlichem Wegdrehen des Rumpfes
- Stadium 5: Aufrichten des Rumpfes, bilateraler Vorderextremitätenklonus, Verlust der Stellreflexe
- Stadium 6: Stadium 5 mit explosionsartig einsetzendem Rennen und Springen

Nach der Beobachtungsperiode wurden die Tiere mehrfach intraperitoneal mit 5% Dextrose in Ringer-Lactatlösung injiziert und mit Wasser sowie in Dextroselösung aufgeweichtem Futter so lange wie nötig versorgt.

Das Wachstum von Moosfasern, den Axonen der Körnerzellen des Gyrus dentatus, ist ein häufiger pathologischer Befund in Epilepsiepatienten und -Versuchstieren. Zur Darstellung dieser Form der synaptischen Reorganisation dient die Timm-Färbung, die die Anwesenheit von Zink in den dendritischen Enden der Moosfasern nachweist.

Um die Versuchstiere auf histopathologische Veränderungen des Gehirns (Moosfasersprossung, neuronaler Zellverlust) zu untersuchen, wurden die Mäuse 30 Tage nach Versuchsbeginn getötet, die Gehirne entnommen und 400 µm dicke Vibratomschnitte (VT 1000S, Leica) angefertigt. Bei allen folgenden Schritten musste unbedingt darauf geachtet werden, dass nur Plastik-Gefäße und kein Glas verwendet wurde.

Die Schnitte wurden für 10 min in Timm-Reaktionslösung, dann für 10 min in Timm-Fixierungslösung eingelegt, schließlich für 1-14 Tage in 70% Ethanol fixiert und in Timm-Sucroselösung überführt (üN, 4°C). Anschließend wurden aus den so behandelten Dickschnitten 20 µm dicke Kryoschnitte angefertigt und diese nach dem Trocknen für 15 min in Timm-Phosphatpuffer gewaschen. Danach wurden die Objektträger in eine Plastikkuvette mit Timm-Entwicklerlösung gegeben und 20-30 min unter Lichtausschluss inkubiert, bis eine braune Anfärbung der Moosfasern sichtbar wurde. Nach gründlichem Waschen mit Leitungswasser und A. bidest wurde die Reaktion durch eine Inkubation der Objektträger für 1 min in Timm-Stopplösung beendet und die Schnitte erneut mit A. bidest. gewaschen. Im Anschluss wurden Zellkerne und das Soma der Pyramidenneurone durch das azidophile metachromatische Färbemittel Toluidinblau dargestellt (10 sec), die Schnitte kurz in A. bidest getaucht, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (1x 50% EtOH, 1x 70% EtOH, 2x 100% EtOH, 1x 100% Isopropanol, 2x Xylol, jeweils 5 min), mit Entellan (Merck) eingedeckelt und lichtmikroskopisch ausgewertet (Axiophot, Zeiss).

3.13 Morphologische und histologische Untersuchungen

3.13.1 Eosin-Färbung von Kryoschnitten

Der schwach saure Farbstoff Eosin färbt Zytoplasma, Bindegewebe, Erythrozyten und Kollagenfasern rötlich. Die Kryoschnitte (20 µm) wurden mit LacZ-Fixierungslösung fixiert (5 min RT), in A. bidest gewaschen und für 15 - 30 min in Eosin-Lösung (0,1 %, Fluka) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen unter laufendem Leitungswasser wurden die Schnitte unter Verwendung von "Fluorescent Mounting Medium" (Dako) eingedeckelt und im Anschluss lichtmikroskopisch ausgewertet.

3.13.2 Myeloperoxidase-Färbung von Darmgewebe

Über die Myeloperoxidase- (Hanker-Yates-) Färbung lassen sich neutrophile Granulozyten im Gewebe darstellen. Diese weißen Blutzellen produzieren das lysosomale Enzym Myeloperoxidase, das zur Produktion von Hypochlorsäure dient, die Bakterien zerstört.

Einzelne 5 cm lange Segmente des Jejunums wurden präpariert und mit Insektennadeln auf einer Sylgard-Platte befestigt, mit PBS⁻ gespült und für 10 min mit 100% Ethanol fixiert (Kalff et al., 1998). Anschließend wurden die Segmente zweimal mit PBS⁻ gewaschen und Mucosa und Submucosa unter mikroskopischer Beobachtung (MS5; Leica) entfernt, so dass die verbleibende Muskularis für die folgende Färbung eingestzt werden konnte. Neutrophile Zellen wurden dabei durch eine 10-minütige Inkubation mit Hanker-Yates-Färbelösung dargestellt. Die Reaktion wurde durch Auswaschen mit PBS⁻ gestoppt, das Gewebe mit Kaisers Glycerol Gelatine (Merck) eingedeckelt und mikroskopisch ausgewertet (Axiophot, Zeiss). Dabei wurden die Leukozyten in zehn zufällig ausgewählten Arealen bei einer Vergrößerung von 100x gezählt.

3.13.3 Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat-Diaphorase Histochemie

Ein histochemischer Marker für das Enzym Stickstoff-Synthase (NOS) ist die NADPH-Diaphorase. Die NADPH-Diaphorasefärbung beruht auf einer Umsetzungsreaktion von Nitrotetrazoliumblau (NBT) unter Verbrauch von NADPH zu blauem Formazan (Hope u. Vincent, 1989).

Um NOS-positive enterische Neurone darstellen zu können, wurden jejunale Kryoschnitte (20 µm) für 5 min mit 4% PFA fixiert, für 10 min in Tris-Waschpuffer und 10 min in Vorinkubationslösung gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 15-30 min in einer feuchten Kammer unter Lichtausschluss bei 37°C mit NADPH-Diaphorase-Färbelösung

inkubiert. Nach vorsichtigem Waschen mit PBS⁻ wurden die Schnitte getrocknet und mit Entellan (Merck) eingedeckelt.

3.13.4 Untersuchung auf Hyperplasie

Um den Einfluss von Hyperplasie (vermehrte Zellzahl) auf die Wanddicke des Jejunums abschätzen zu können, wurde die Anzahl an Zellkernen in Kryoschnitten des Jejunums bestimmt. Dazu wurden 5x 20 µm Schnitte, die etwa 500 µm voneinander entfernt waren, von fünf Tamoxifen-behandelten und fünf unbehandelten Cx43^{fl/fl}: SM-CreER^{T2}-Mäusen mit Hoechst 33258 Farbstoff gefärbt, durch Fluoreszenzmikroskopie (Axiophot, Zeiss) dargestellt und bei einer Vergrößerung von 100x gezählt. Vorausgesetzt, dass Glattmuskelzellen nicht polynukleär sind, repräsentiert die Anzahl an Zellkernen die Anzahl an glatten Muskelzellen (Blennerhasset et al., 1992).

3.13.5 Acetylcholin-Esterase-Färbung

Acetylcholin-Esterase als charakteristisches Enzym der Erythrozyten, Nervenzellen, Synapsen und der motorischen Endplatten der quergestreiften Muskulatur wurde in Herz-Kryoschnitten (20 µm) zur Darstellung des Reizleitenden Systems eingesetzt.

Die Schnitte wurden in 4% PFA fixiert und in 0,22 M Sucrose inkubiert (10 min, RT). Nach zwei Waschschritten in PBS⁻ wurden die Schnitte für 2 h bei 37°C in Acetylcholin-Esterase-Färbelösung inkubiert, anschließend zweimal in PBS⁻ gewaschen, mit Eosin gegengefärbt, getrocknet und eingedeckelt (Entellan, Merck).

3.14 Statistische Auswertungen

Wenn nicht anders vermerkt, sind die Messdaten als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung oder dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Vergleiche von mehr als zwei unterschiedlichen Gruppen erfolgten mit dem "One way ANOVA"-Test. Die Daten des Tests zur gestaffelten Ängstlichkeit wurden mit Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Werte und Wilcoxon-Tests für abhängige Werte analysiert. Der statistische Vergleich von Daten zweier Gruppen erfolgte unter Verwendung des t-Tests. In allen Fällen wurden Wahrscheinlichkeitswerte von $p < 0,05$ als statistisch signifikant bewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Erzeugung und Analyse von Mausmutanten mit Glattmuskel-spezifischer Ausschaltung von Connexin43

In diesem Kapitel werden die experimentellen Untersuchungen zur Glattmuskel-spezifischen Inaktivierung von Cx43 unter Verwendung des durch Tamoxifen induzierbaren CreER^{T2}-Systems dargestellt. Ziel dieses Ansatzes war die zelltypspezifische, induzierbare Ausschaltung von Cx43 in glatten Muskelzellen, in denen der Cx43-Promotor zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiv ist, um auf diese Weise die funktionelle Bedeutung von Cx43 in diesem Zelltyp in adulten Mäusen bestimmen zu können.

4.1.1 Erzeugung von Mäusen mit Glattmuskel-spezifischer Deletion von Connexin43 im Darm

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von Connexin43 (Cx43) Gap Junction-Kanälen während koordinierter Kontraktion in Darm wurden homozygot gefloxe Cx43^{fl/fl} (Theis et al., 2001) und Cx43^{2lox/2lox} (Eckardt et al., 2004) Tiere mit heterozygoten SM-CreER^{T2}(ki)-Mäusen (Kühbandner et al., 2000) verpaart. Diese Tiere exprimieren die Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des SM22 Promotors, der eine spezifische Aktivität in glatten viszerale und vaskulären Muskelzellen adulter Mäuse aufweist (Solway et al., 1995; Li et al., 1996). Da keine funktionalen Unterschiede zwischen Tieren mit (Cx43^{fl/fl}) oder ohne Neomycin-Resistenzkassette (Cx43^{2lox/2lox}) festgestellt werden konnten, werden beide Gruppen im Folgenden als Cx43^{fl/fl}-Tiere zusammengefasst. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Untersuchungen an Tieren mit gemischtem genetischem Hintergrund (129/P2/OlaHsd-129/Sv-C57BL/6-FVB/N) durchgeführt.

4.1.1.1 SM-CreER^{T2} vermittelt *in vivo* eine effiziente Deletion von Cx43 in glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltrakts

Zum Nachweis des Umfanges der Cx43-Inaktivierung im gastrointestinalen Trakt wurden Immunoblot-, Immunfluoreszenz-Analysen und X-Gal-Färbungen durchgeführt. Anhand von X-Gal-gefärbten Kryoschnitten konnte gezeigt werden, dass Cx43 in nahezu allen glatten Muskelzellen der zirkulären Muskelschicht des Darms Tamoxifen-behandelter Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäuse ausgeschaltet wurde (Abb. 4.1.1 B), in Kontrolltieren jedoch in keinem Fall eine

Blaufärbung beobachtet werden konnte (Abb. 4.1.1 A). Mit Cx43-spezifischen Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurde das nahezu vollständige Fehlen von Cx43-Protein in behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Därmen *in situ* dargestellt (Abb. 4.1.1 C, D). Zusätzliche Immunoblot-Analysen von Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Därmen und entsprechender Kontrollen ergaben eine etwa 90 prozentige Verringerung der Cx43-Proteinmenge (Abb. 4.1.1 E). Die durchgeführten Untersuchungen bestätigten somit eine effiziente Deletion von Cx43 im Gastrointestinaltrakt von Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tieren.

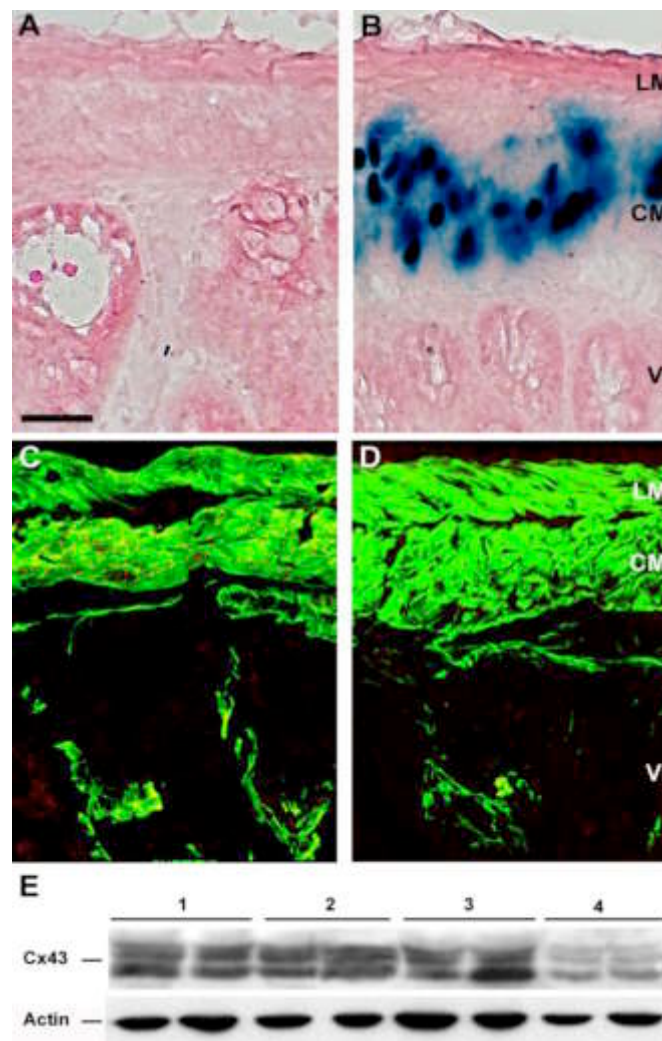


Abb. 4.1.1 Untersuchungen zur Effizienz der SM-CreER^{T2}-vermittelten Deletion von Cx43.

A, B Die X-Gal-Färbung von Darmkryoschnitten (Jejunum) zeigte die gleichmäßige Deletion von Cx43 in der zirkulären Muskelschicht Tamoxifen-behandelter Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tiere (B) im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollen (A). **C, D** Cx43-Immunfluoreszenz-Analyse von Kryoschnitten zweier Jejunum-Abschnitte der Genotypen Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}, nicht behandelt (C) und Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}, Tamoxifen-behandelt (D). In (C) ist das reguläre Cx43-Expressionsmuster (rote Signale) erkennbar, während die Glattmuskel-spezifische Deletion zu fast vollständigem Verlust von Cx43-Immunfluoreszenzsignalen führte (D). Die Anfärbung der glatten Muskulatur wurde durch Verwendung SM-Aktin-spezifischer Antikörper (grün) erzielt. Gelbe Signale stellen die Überlagerung der roten Cx43- und der grünen Aktin-Markierungen dar. **E** Cx43-Immunoblot-Untersuchungen von unbehandelten (1) und behandelten Cx43^{fl/fl} (2) sowie unbehandelten (3) und mit Tamoxifen behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Jejunumlysaten (4) bestätigten den nahezu vollständigen Verlust der Cx43-Proteinexpression nach Glattmuskel-spezifischer Deletion von Cx43. LM: longitudinale Glattmuskelschicht, CM: zirkuläre Glattmuskelschicht, Vi: Villi. Größenbalken in A: 50 µm.

4.1.1.2 Neben Cx43 wird nur Cx45 in der glatten viszerale Muskulatur der Maus exprimiert

Da widersprüchliche Resultate über das Expressionsmuster von Connexinen in viszerale Glattmuskelzellen vorliegen (Wang et al., 2001; Nakamura et al., 1998; Seki et al., 2001; Krüger et al., 2000), wurden neben Analysen zur Expression von Cx43 auch Immunfluoreszenz-Färbungen zum Nachweis von Cx40 und Cx45 durchgeführt. Dabei wurden für Cx40 keine Signale in der *Tunica muscularis* des Dünndarms von Tamoxifen-behandelten (B) und unbehandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tieren (A) nachgewiesen. Eine starke Anfärbung durch Cx40-spezifische Antikörper wurde jedoch in beiden Genotypen in Blutgefäßen beobachtet (Abb. 4.1.2 A, B). Über Cx45-spezifische Antikörper wurde eine starke Cx45-Expression sowohl in der longitudinalen als auch der zirkulären Muskelschicht sowie im Auerbach und Meissner Plexus gefunden (Abb. 4.1.2 C, D). Dieses Ergebnis wird von den Untersuchungen von Krüger et al. (2000) bestätigt, die eine starke Transkription des Cx45-Gens durch LacZ-Signale innerhalb der *Tunica muscularis* gezeigt haben. Eine mögliche kompensatorische Veränderung der Expressionsstärke von Cx40 oder Cx45 durch die Deletion von Cx43 in Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tieren wurde nicht beobachtet. Damit scheinen Cx43 und Cx45 die beiden einzigen Connexine zu sein, die in viszerale Glattmuskelzellen der Maus exprimiert werden.

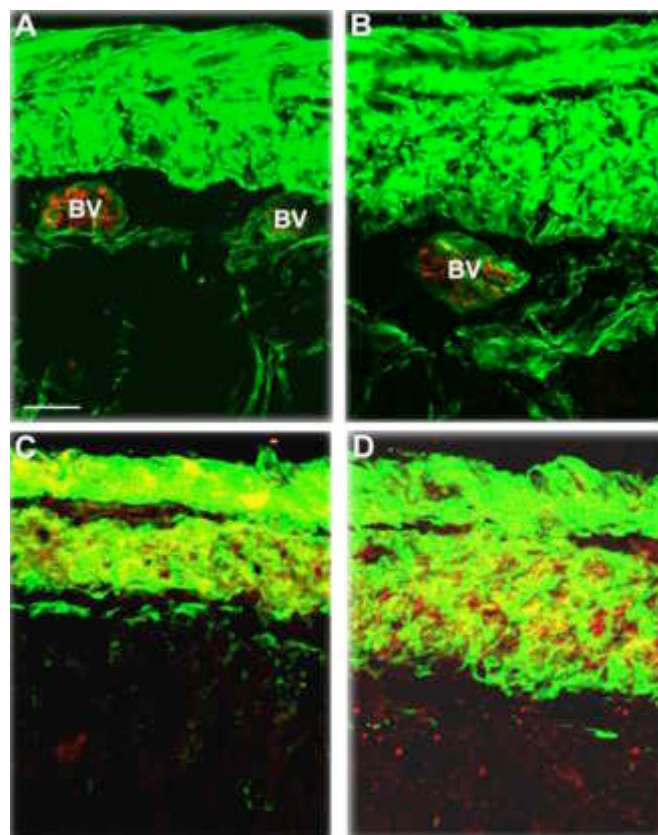


Abb. 4.1.2 Immunfluoreszenz-Untersuchungen zur Ausprägung von Cx40 und Cx45 im Dünndarm der Maus.

A, B Durch spezifische Antikörper (rot) konnte Cx40 nur in Dünndarm-assoziierten Blutgefäßen von unbehandelten (A) und Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tieren nachgewiesen werden, nicht

aber in glatten viszerale Muskelzellen. **C, D** Immunfluoreszenz-Analysen von Dünndarmkryoschnitten (Jejunum) zeigte die gleichmäßige Expression von Cx45 in der kompletten Tunica muscularis Tamoxifen-behandelter (D) und unbehandelter Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tiere (C). Die spezifische Anfärbung der glatten Muskelzellen (grün) wurde durch Verwendung SM-Aktin-spezifischer Antikörper erreicht. Gelbe Signale stellen die Überlagerung der roten Cx43- und der grünen Aktin-Markierungen dar. BV: Blutgefäß. Größenbalken in A: 50µm.

4.1.1.3 Die Glattmuskel-spezifische Cx43-Deletion führt zu einer Verdickung der Muskelzellschicht und zu morphologischen Anomalien des Auerbach-Plexus

Da Cx43 nicht nur von glatten Muskelzellen, sondern auch von Cajal-Zellen (ICC) exprimiert wird, die so nicht nur untereinander sondern auch mit Glattmuskelzellen gekoppelt sind, sollten morphologische Analysen Aufschluss darüber geben, ob die konditionale Ausschaltung von Cx43 zu Fehlbildungen führte.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Kryoschnitte des Jejunums von unbehandelten und Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tieren untersucht. Wie in den Abb. 4.1.1 und 4.1.2 zu erkennen ist, wiesen die Därme Tamoxifen-behandelter Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäuse eine Verdickung der Darmwand auf, die in Kontrolltieren nicht beobachtet wurde. Da Zählungen Höchst 33258-gefärbter Muskelzell-Kerne nur eine leichte Erhöhung in Tamoxifen-behandelten gegenüber nicht behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tieren zeigte (75 ± 5 vs. 58 ± 8 , $p = 0,048$), hängen die morphologischen Veränderungen wahrscheinlich mit einer Kombination aus Hypertrophie und Hyperplasie zusammen.

Um zu untersuchen, ob die spezifische Deletion von Cx43 in Glattmuskelzellen Auswirkungen auf die Morphologie von ICC und NO-Synthase-positiven enterischen Neuronen hat, wurden ICC-spezifische Antikörper gegen den Tyrosin-Kinase Rezeptor c-kit und eine immunhistochemische NADPH-Diaphorase-Färbung eingesetzt. Wie in Abb. 4.1.3 gezeigt, wiesen Tamoxifen-behandelte (Abb. 4.1.3 B) im Gegensatz zu unbehandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tieren (Abb. 4.1.3 A) eine veränderte Morphologie der ICC des Auerbach-Plexus (myenterischer Plexus) auf. Die Cajal-Zellen dieser Tiere waren lang gestreckt und in den Zwischenräumen der zirkulären Muskelschicht lokalisiert. Im Gegensatz dazu zeigten die Cajal-Zellen des Meissner-Plexus (tiefmuskulärer Plexus) sowie die enterischen Neurone keine morphologischen Änderungen zwischen unbehandelten (Abb. 4.1.3 C) und behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tieren (Abb. 4.1.3 D).

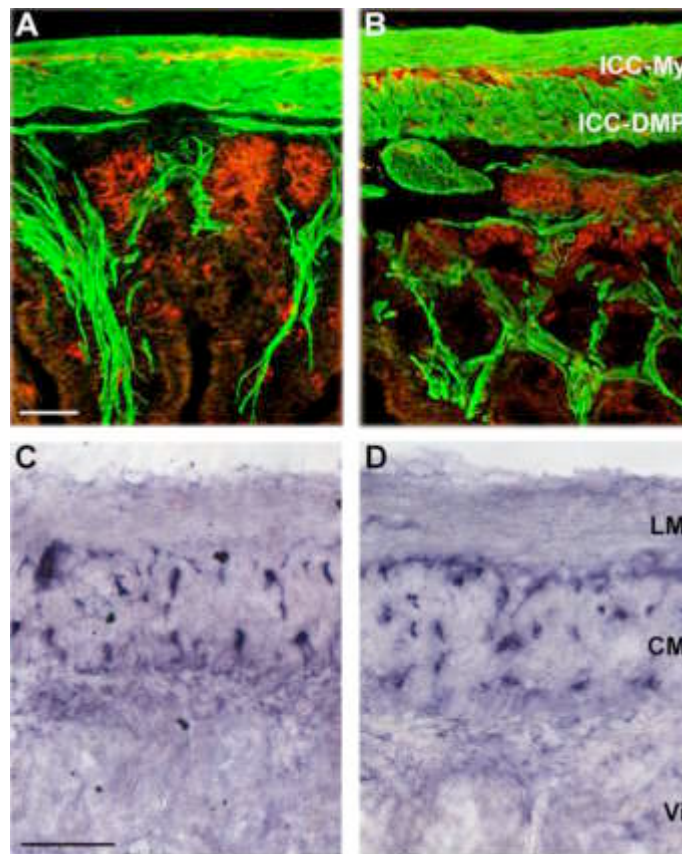


Abb. 4.1.3 Morphologische Untersuchungen der Cajal-Zellen und enterischen Neurone von Tieren mit Glattmuskel-spezifischer Cx43-Defizienz.

A, B Aufnahmen von c-kit- (rot) und SM-Aktin (grün)-gefärbten Kryoschnitten von unoperierten (A) und Tamoxifen-behandelten $Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}$ -Tieren (B). Dargestellt ist die veränderte Morphologie der ICC des Auerbach-Plexus (ICC-My) von Tamoxifen-behandelten $Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}$ -Tieren. Der Meissner-Plexus (ICC-DMP) wies keinen morphologischen Unterschied auf. C, D Die immunhistochemische Anfärbung enterischer Neurone zeigte in unoperierten (C) und Tamoxifen-behandelten $Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}$ -Tieren ein ähnliches Verteilungsmuster. ICC-My: Auerbach-Plexus, ICC-DMP: Meissner-Plexus, LM: longitudinale Muskelschicht, CM: zirkuläre Muskelschicht, Vi: Villi. Die Größenbalken entsprechen 50 μm .

4.1.1.4 Tamoxifen-behandelte $Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}$ -Tiere zeigen eine verstärkte neutrophile Infiltration des intestinalen Muskels

Auf Grund von Publikationen, die einen Zusammenhang zwischen verdickter Darmwand und Entzündungsreaktionen des Gewebes nachwiesen (Blennerhassett et al., 1992; Moreels et al., 2004), wurden neutrophile Zellen in Komplet-Präparaten des Jejunums durch Myeloperoxidase (MPO)-Färbung dargestellt. Abb. 4.1.4 zeigt die signifikante Erhöhung ($p < 0,0001$) der Anzahl MPO-postiver Entzündungszellen im Jejunum Tamoxifen-behandelter $Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}$ -Tiere (189 ± 12 ; B, C) im Vergleich zu Kontrollen (14 ± 5 ; A, C).

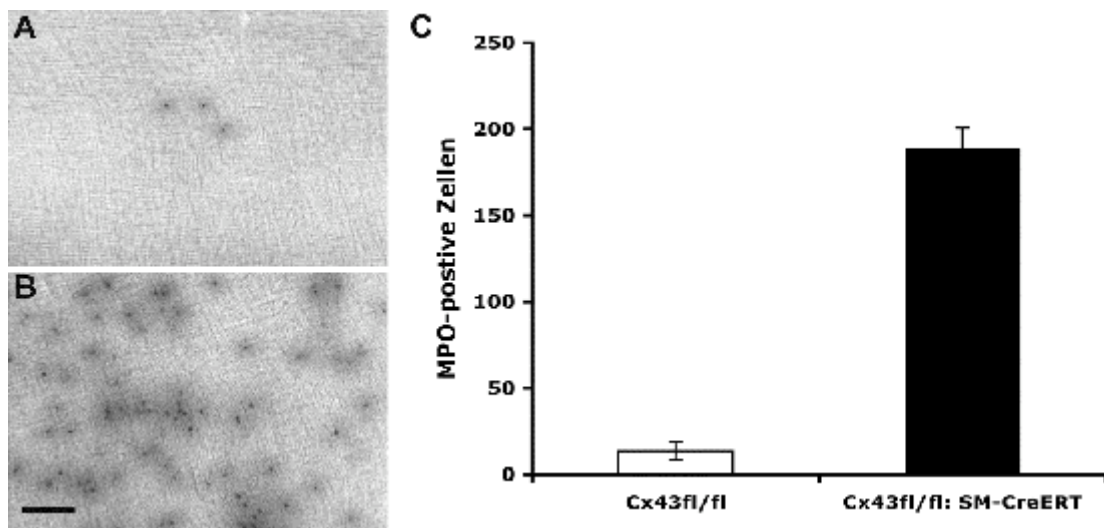


Abb. 4.1.4 Untersuchungen Myeloperoxidase-gefärbter neutrophiler Zellen im Darm von Tieren mit Glattmuskel-spezifischer Cx43-Defizienz.

A, B Myeloperoxidase-gefärbte Komplettdarmpräparate von Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl} (A) und Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}-Tieren (B). **C** Anzahl der infiltrierenden, MPO-positiven Neutrophilen in Jejunum-Präparaten derselben Genotypen. Die Daten sind als \pm SEM-Werte dargestellt (n = 3). Größenbalken: 100 μ m.

4.1.1.5 Die spezifische Deletion von Cx43 in glatten Muskelzellen führt zu verschiedenen funktionalen Veränderungen

Um zu untersuchen, ob der Verlust von Cx43 in glatten Muskelzellen neben morphologischen auch zu funktionalen Veränderungen führt, wurden Messungen zur kontraktile Aktivität, zum gastrointestinalen Transport, zur Gewichtszunahme und zum viszerale Schmerzempfinden durchgeführt.

Da die Glattmuskel-spezifische Deletion von Cx43 zu Änderungen der Kontraktilität des intestinalen Muskels führen könnte, wurden Streifenpräparate des Jejunums im Organbad näher untersucht. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. G. Pfützer (Universität Köln) wurden die Präparate mit dem muskarinergen Agonisten Carbachol (CCh) und KCl stimuliert. Sowohl in Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}-, als auch in behandelten Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}-Tieren konnte auf diese Weise eine starke Kontraktion ausgelöst werden. Die kontraktile Kraft, die nach Bad-Applikation von CCh an Muskelstreifen von Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}-Tieren gemessen wurde, war im Vergleich zu den Kontrollen nur bei der höchsten Dosis an CCh (100 μ M) signifikant verschieden (Abb. 4.1.5 A). Im Gegensatz dazu zeigten die KCl-stimulierten Dosis-Wirkungskurven eine signifikante Kontraktions-Abnahme bei Konzentrationen von 10 bis 20 mM KCl, aber eine höhere kontraktile Kraft bei 40 bis 60 mM KCl, in Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}- gegenüber behandelten Cx43^{fl/fl}-Tieren ohne Cre-Transgen (Abb. 4.1.5 B).

Zur Messung des gastrointestinalen Transits wurde nüchternen Tieren der Farbstoff Methylen-Blau verabreicht und die Wanderungstrecke des Farbstoffes als Prozent der Darmlänge ausgedrückt. Eine signifikante Abnahme ($p < 0,0002$) des Farbstofftransports von $34 \pm 0,3\%$ ($n = 17$) in Tamoxifen-behandelten $Cx43^{fl/fl}$ -Mäusen, die kein Cre-Transgen besitzen, auf $24 \pm 1,3\%$ ($n = 14$) in behandelten $Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}$ -Tieren ist in Abb. 4.1.5 C gezeigt. Der Transit in unbehandelten $Cx43^{fl/fl}$ - ($n = 18$) und unbehandelten $Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}$ -Mäusen ($n = 16$) glich dem der behandelten $Cx43^{fl/fl}$ -Tiere ($32 \pm 0,9\%$ bzw. $34 \pm 1\%$; Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Glattnuskel-spezifische Deletion von $Cx43$ mit einer Hemmung des gastrointestinalen Transits assoziiert ist und nicht von möglichen Nebeneffekten des Tamoxifens beeinflusst wird.

Möglicherweise könnte der veränderte gastrointestinale Transport die Aufnahme von Nährstoffen beeinflussen. Daher wurde die Gewichtszunahme von je 10-15 Tieren aller Genotypen untersucht. Die wöchentliche Messung des Gewichts von Tamoxifen-behandelten und unbehandelten $Cx43^{fl/fl}$ -Mäusen mit und ohne das Cre-Transgen ergab keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtszunahme oder der Entwicklung von Ödemen (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die konditionale Deletion von $Cx43$ in glatten Muskelzellen eine veränderte viszerale sensorische Funktion auslösen kann, wurde das viszerale Schmerzempfinden in Tamoxifen-behandelten $Cx43^{fl/fl}$ - und $Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}$ -Tieren untersucht. In Mäusen wie auch in Ratten und Menschen lösen kolorektale Distensionen (CRD) starke Kontraktionen der abdominalen Muskulatur aus, den viszeromotorischen Reflex (VMR). Wie in Abb. 4.1.5 D gezeigt, war der VMR von Tamoxifen-behandelten $Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}$ -Tieren signifikant auf $1757 \pm 121 \mu V$ ($n = 10$) erhöht ($p = 0,005$). Im Vergleich dazu zeigten behandelte $Cx43^{fl/fl}$ -Mäuse eine Reaktion von $834 \pm 269 \mu V$ ($n = 11$). Unbehandelte $Cx43^{fl/fl}$ - ($n = 11$) und $Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}$ -Tiere ($n = 9$) zeigten einen ähnlichen VMR wie behandelte $Cx43^{fl/fl}$ -Mäuse ($690 \pm 166 \mu V$ bzw. $797 \pm 175 \mu V$, Daten nicht gezeigt). Daher führt die Deletion von $Cx43$ in intestinalen glatten Muskelzellen zu einer erhöhten Sensitivität auf viszerale schmerzauslösende Stimuli, die nicht mit möglichen Nebenwirkungen der Applikation von Tamoxifen zusammenhängen.

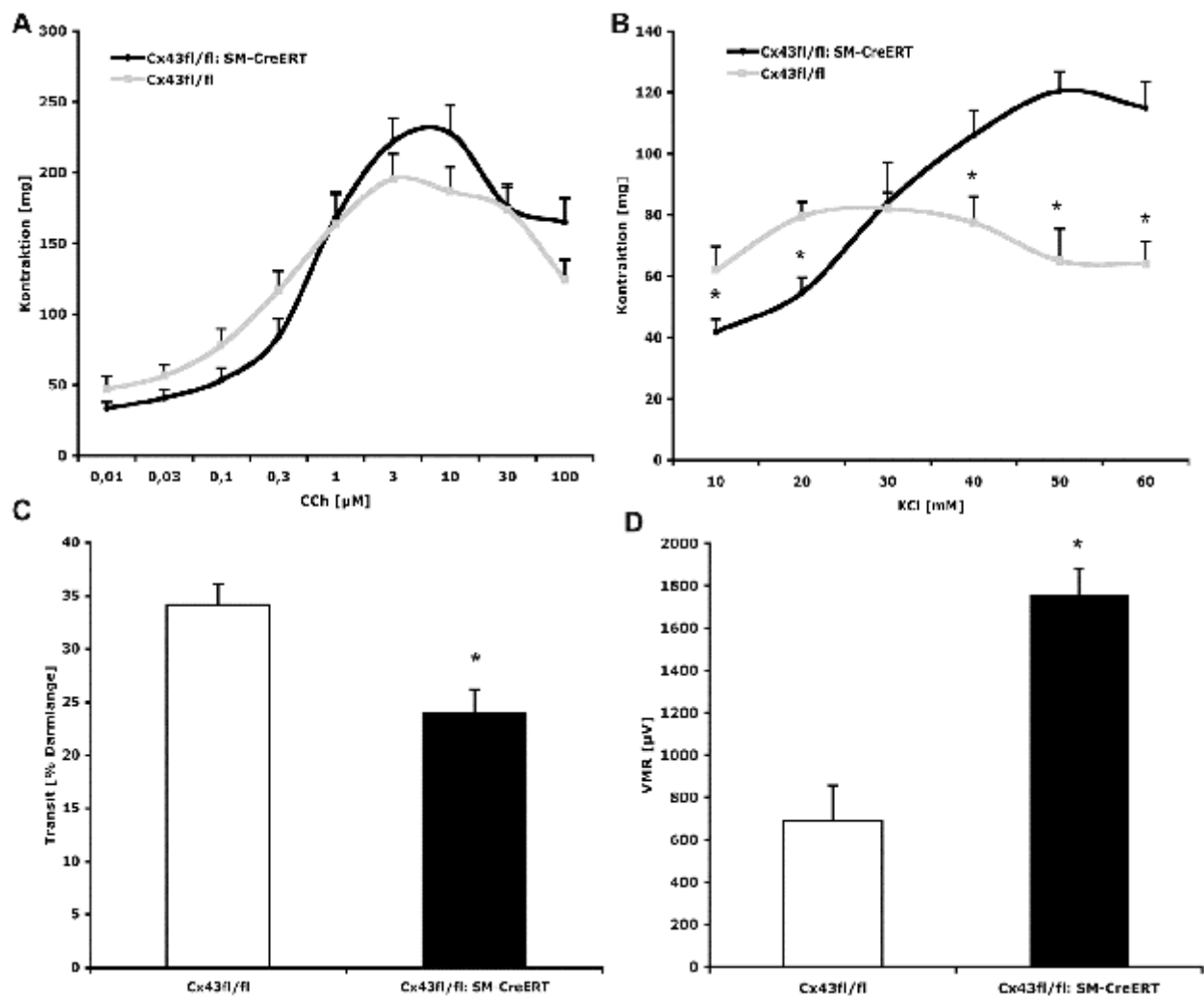


Abb. 4.1.5 Untersuchungen zu funktionalen Effekten Glattmuskel-spezifischer Cx43-Defizienz.

A, B Carbachol (CCh, A) und KCl-stimulierte Dosis-Wirkungskurven der kontraktiven Aktivität Tamoxifen-behandelter zirkulärer Muskelstreifen von Tamoxifen-induzierten Cx43^{fl/fl}- (grau) und Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tieren (schwarz). Die Daten sind als \pm SEM dargestellt (n = 5-7). **C** Effekt der Cx43-Deletion auf den gastrointestinalen Transit. Die Ergebnisse werden als Wanderungstrecke des Methylens-Blaues in Prozent der Darmlänge von Tamoxifen-induzierten Cx43^{fl/fl}- (weiß) und Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tieren (schwarz) dargestellt und als \pm SEM ausgedrückt (n = 14-17). * p < 0,0002. **D** Untersuchung des viszeromotorischen Reflexes (VMR) nach kolorektaler Distension von Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}- (weiß) und Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tieren (schwarz). * p = 0,005. Die Daten sind als \pm SEM dargestellt (n = 10-11).

4.1.2 Erzeugung von Mäusen mit Glattmuskel-spezifischer Deletion von Connexin43 im Uterus

Neben den zuvor dargestellten Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von Cx43 Gap Junction-Kanälen durch induzierbare, Zelltyp-spezifische Inaktivierung in glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltrakts wurden dieselben Mausmutanten auch im Hinblick auf das Fehlen von Cx43 in Myometrium-Zellen des Uterus charakterisiert. Um das Expressionsprofil von Cx43 im Uterus mit Hilfe des LacZ-Reportergens vollständig darstellen zu können, wurden Cx43^{del/+}-Tiere eingesetzt (Theis et al., 2001).

4.1.2.1 Im Myometrium führt SM-CreER^{T2} zu einer Deletion von Cx43 in 30-40% der glatten Muskelzellen *in vivo*

Nach SM-CreER^{T2}-vermittelter Deletion der Cx43 kodierenden Region wurde eine Expression des LacZ-Reportergens in 30-40% aller Cx43-exprimierenden myometrialen Muskelzellen, verglichen mit der nahezu ubiquitären X-Gal-Färbung in Cx43^{del/+}-Tieren, beobachtet. Der variierende Umfang der LacZ-Expression hing dabei wahrscheinlich mit dem unterschiedlichen Grad der Tamoxifen-Induktion der Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäuse zusammen. In nicht-induzierten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäuse oder Cx43^{fl/fl}-Kontrollen wurde nie eine Blaufärbung beobachtet (Abb. 4.1.6 A-C).

Cx43-spezifische Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigten eine geringe Reduktion der Cx43-Immunreaktivität im Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Uterus (Abb. 4.1.6 D, E). Da bekannt ist, dass Cx43, außer in glatten Muskelzellen, auch in anderen Zelltypen des Myometriums exprimiert wird, handelt es sich bei den Cx43-positiven Zellen wahrscheinlich um Fibroblasten, Gefäß-assoziierte Endothelzellen und Mastzellen (Reynolds and Redmer, 1999; Yeh et al., 1997; Oviedo-Orta and Howard Evans, 2004).

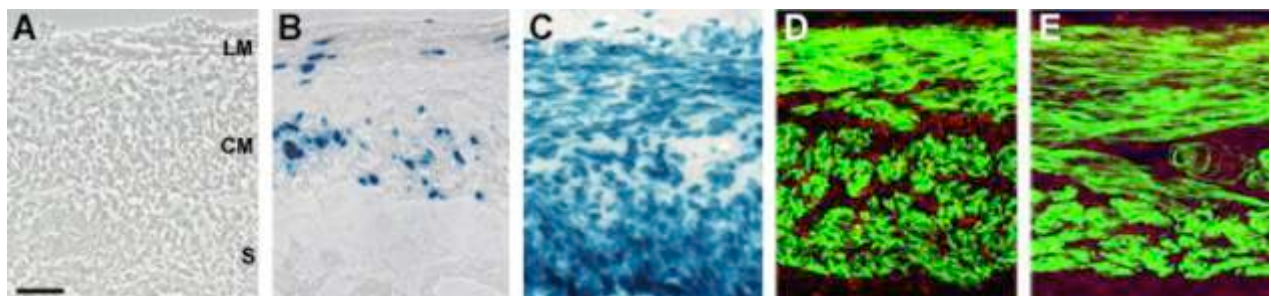


Abb. 4.1.6 Untersuchungen zur Effizienz der SM-CreER^{T2}-vermittelten Deletion von Cx43 im Myometrium.

A-C Die X-Gal-Färbung von Uteruskryoschnitten zeigte die Deletion von Cx43 in der longitudinalen und zirkulären Muskelschicht Tamoxifen-behandelter Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tiere (B) im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollen (A). Cx43^{del/+}-Tieren zeigten eine LacZ-Expression in nahezu jeder Zelle (C). **D, E** Cx43-Immunfluoreszenz-Analyse von Uterusgewebe der Genotypen Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}, nicht

behandelt (D), und Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}, Tamoxifen-behandelt (E). In (D) ist das reguläre Cx43-Expressionsmuster (rote Signale) erkennbar, während die Glattmuskel-spezifische Deletion zu einer geringen Reduktion der Cx43-Immunfluoreszenzsignale führte (E). Die glatte Muskulatur wurde durch Verwendung SM-Aktin-spezifischer Antikörper (grün) dargestellt. LM: longitudinale Glattmuskelschicht, CM: zirkuläre Glattmuskelschicht, S: Stroma. Größenbalken: 50 µm.

4.1.2.2 Der Verlust von Cx43 in primären Glattmuskel-Zellkulturen führt zu einer Reduktion des interzellulären Farbstofftransfers

Um zu untersuchen, ob das oben genannte Ausmaß der Cx43-Deletion einen funktionalen Effekt zeigt, d.h. die Eigenschaft des Myometriums als gekoppeltes Synzytium beeinflusst, wurden Primärzellkulturen glatter Muskelzellen aus Uteri un behandelter und Tamoxifen-behandelter Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäuse angelegt. Mikroinjektionen des Farbstoffes Lucifer Yellow führten in nicht-induzierten Kulturen zu einer Kopplung von 0-4 Zellen mit einem durchschnittlichen Farbstofftransfer in 2,07 Zellen. Die Kopplung Cx43-deletierter glatter Muskelzellen war auf durchschnittlich 0,47 Zellen reduziert (Farbstofftransfer in 0-2 Zellen). Abb. 4.1.7 zeigt repräsentative Beispiele der Kopplung.

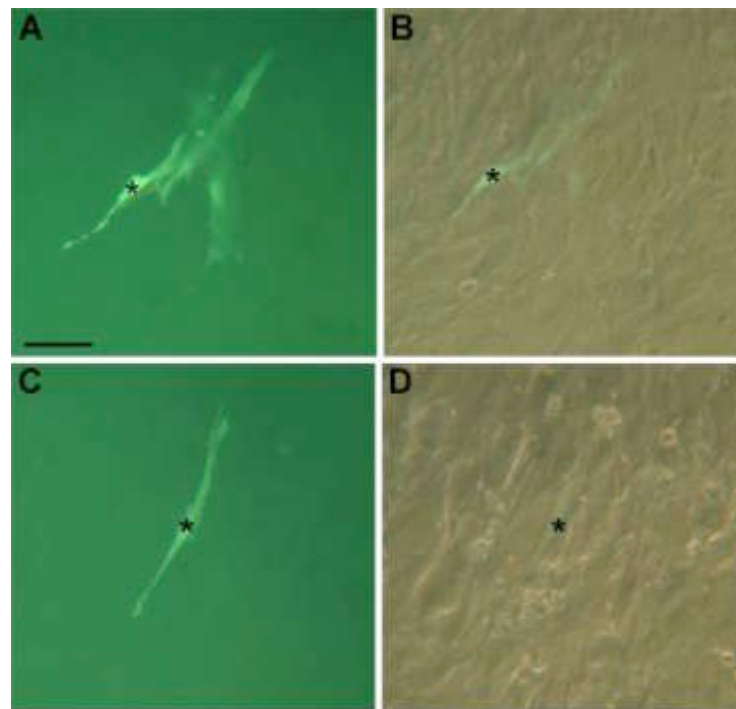


Abb. 4.1.7 Mikroinjektion von Lucifer Yellow in Primärzellkulturen glatter Muskelzellen des Maus-Uterus.

A-D Repräsentative Aufnahmen des Lucifer Yellow-Transfers in konfluenten Primärzellkulturen myometrialer Zellen (A, C) sowie Phasenkontrast-Aufnahmen (B, D) der injizierten Zelle (*). Unbehandelte Zellen (A, B) wiesen eine höhere Farbstoffkopplung auf als Tamoxifen-behandelte Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Primärzellen (C, D). Größenbalken: 50 µm.

Eine Reduktion des Cx43-Protein-Gehalts um mehr als 60% in kultivierten primären Glattmuskelzellen Tamoxifen-behandelter im Vergleich zu unbehandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäusen wurde durch Immunfluoreszenz- und Immunoblot-Analysen nachgewiesen (Abb. 4.1.8)

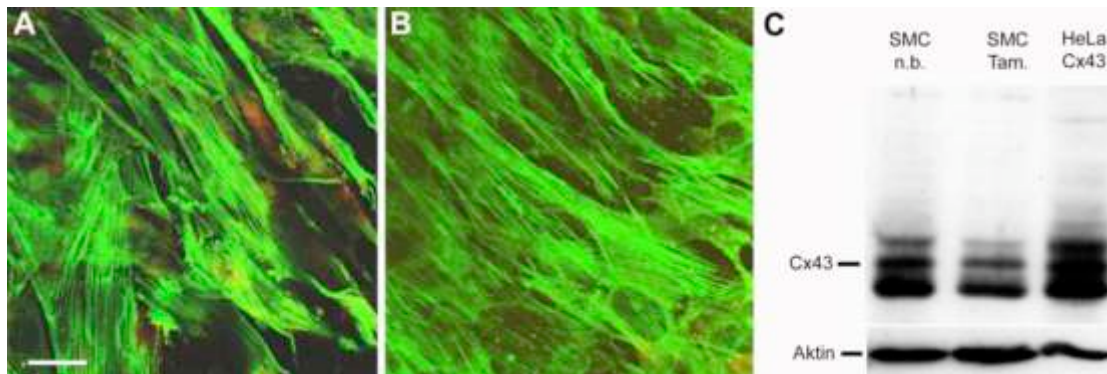


Abb. 4.1.8 Überprüfung der Cx43-Deletion in Primärzellkulturen glatter Muskelzellen des Uterus.

A, B Die Immunfluoreszenz-Analyse von myometrialen Primärzellkulturen mit Cx43-spezifischen Antikörpern (rot) zeigte die Reduktion der Cx43-Expression in Tamoxifen-behandelten (B) im Vergleich zu unbehandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäusen (A). Die glatten Muskelzellen wurden durch eine Gegenfärbung mit SM-Aktin-spezifischen Antikörpern (grün) dargestellt. **C** Cx43-Immunoblot-Untersuchungen von Lysaten unbehandelter (SMC n.b.) und behandelter Glattmuskel-Kulturzellen (SMC Tam.) zeigten nach β -Aktin-Abgleich eine Reduktion der Cx43-Proteinexpression um 63% in mit Tamoxifen-induzierten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäusen. HeLa Cx43: Lysat Cx43-exprimierender HeLa-Zellen. Größenbalken: 50 μ m.

4.1.2.3 Die zelltypspezifische Deletion von Cx43 in myometrialen Glattmuskelzellen *in vivo* beeinflusst das Geburtsverhalten

Der Geburtszeitpunkt des ersten Jungtieres schwangerer unbehandelter und Tamoxifen-behandelter Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Weibchen wurde aufgezeichnet, um mögliche Veränderungen des Geburtsvorgangs durch die Reduktion der Cx43-vermittelten Gap Junction-Kopplung zu untersuchen. Wie in Abb. 4.1.9 A gezeigt ist, warfen 89% (16 von 18) der nicht mit Tamoxifen behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäuse an Tag 19,5 zwischen 4 und 8 Uhr morgens. Nur 11% (2 von 18) dieser Gruppe warfen zwischen 8 und 12 Uhr. Im Gegensatz dazu setzte die Geburt bei 82% (14 von 17) der schwangeren Tamoxifen-induzierten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäuse erst nach acht Uhr morgens ein. Sechs dieser „spät-gebärenden“ Tiere warfen ihr erstes Jungtier, das häufig verstorben und teilweise degradiert war, an Tag 20 bis 22 der Schwangerschaft (Abb. 4.1.9 B). Ein normales Geburtsverhalten, d.h. der Wurf des ersten Jungtieres zwischen 4 und 8 Uhr an Tag 19,5, wurde nur bei 18% (3 von 17) der Tamoxifen-induzierten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Weibchen beobachtet. Zusätzlich wurden schwangere homozygot gefloxt Cx43^{fl/fl}-Mäuse, die kein Cre-Transgen exprimierten, untersucht. Nur drei von 16 Tamoxifen-behandelten und keins von 18 unbehandelten Cx43^{fl/fl}-Weibchen zeigte eine Verzögerung des

Geburtsprozesses (Daten nicht gezeigt). In Cx43^{del/+}-Tieren konnte keine Veränderungen des Geburtsverhaltens festgestellt werden (nicht gezeigt).

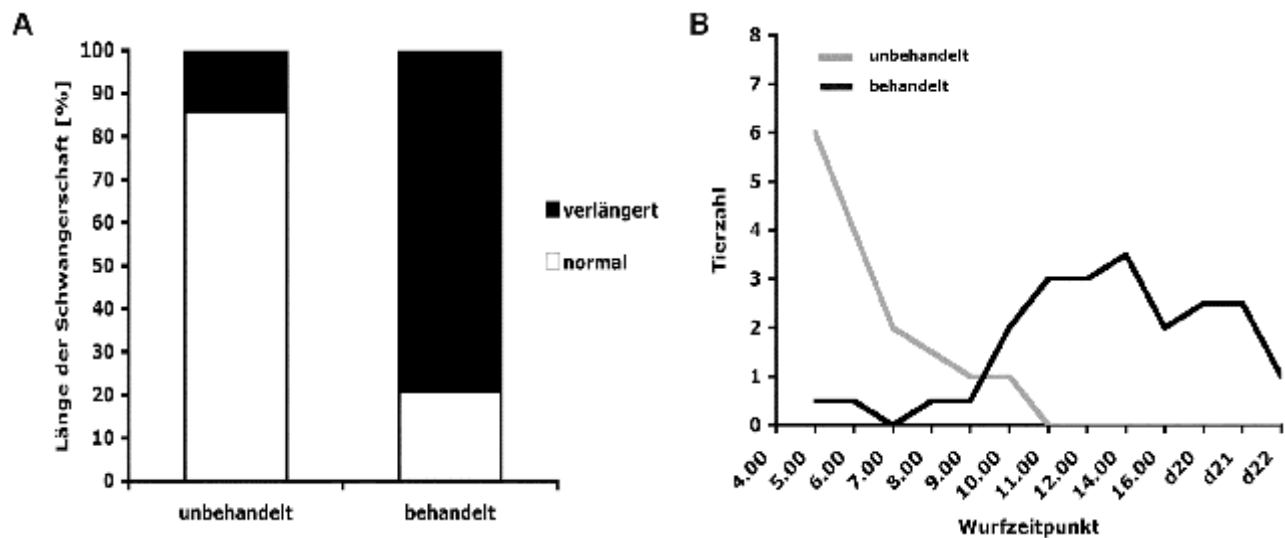


Abb. 4.1.9 Auswirkung der Cx43-Deletion auf den Geburtsprozess.

Der Geburt des ersten Jungtieres unbehandelter und Tamoxifen-behandelter Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäuse wurde beobachtet. Das Einsetzen der Geburt bis 8.00 Uhr morgens wurde als normal klassifiziert, ein Geburtsbeginn zu späteren Zeitpunkten wurde als verlängerte Tragezeit dargestellt. In **A** werden die Ergebnisse als Prozentzahlen in Bezug auf die Länge der Schwangerschaft, in **B** als gleitender Durchschnitt der absoluten Tierzahlen bezogen auf den Wurfzeitpunkt an Tag 19 bzw. 20 bis 22 dargestellt.

4.1.2.4 Die Expressionsstärke ausgewählter Kontraktions-assoziiierter Protein-Gene und der Progesteron Gehalt wird durch die Deletion des Cx43-Locus nicht verändert

Die Analyse myometrialer cDNA schwangerer Mäuse an Tag 16,5 (d16,5) und zum Zeitpunkt der Geburt (d19) durch quantitative Real-Time PCR zeigte keine signifikanten Veränderungen in der Expressionsstärke der Kontraktions-assoziierten Protein-Gene (CAP) Oxytozin Rezeptor (d16,5: p=0.98; d19: p=0.09), Prostaglandin Rezeptor (d16,5: p=0.39; d19: p=0.85) und c-fos (d16,5: p=0.14; d19: p=0.87) zwischen unbehandelten und Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tieren (Abb. 4.1.10). Von denselben Tieren wurde zusätzlich die Konzentration des im Blut zirkulierenden Progesterons bestimmt. Durch Radio-Immuno-Analyse wurden signifikant reduzierte Mengen an Progesteron von Tag 16,5 im Vergleich zum Tag der Geburt in unbehandelten und Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Weibchen festgestellt (p=0,0003 bzw. p=0,0004). Diese Ergebnisse zeigen, dass Tamoxifen-behandelte Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tiere in Bezug auf die Expression der CAP-Gene und den Progesteron Gehalt nicht von unbehandelten Kontrollen zu unterscheiden sind. Damit kann ausgeschlossen werden, dass der unter Punkt 4.1.2.3 beschriebene Phänotyp auf die Reduktion der Cx43-Expression zurückzuführen ist und nicht mit molekularen Änderungen anderer Art zusammenhängt.

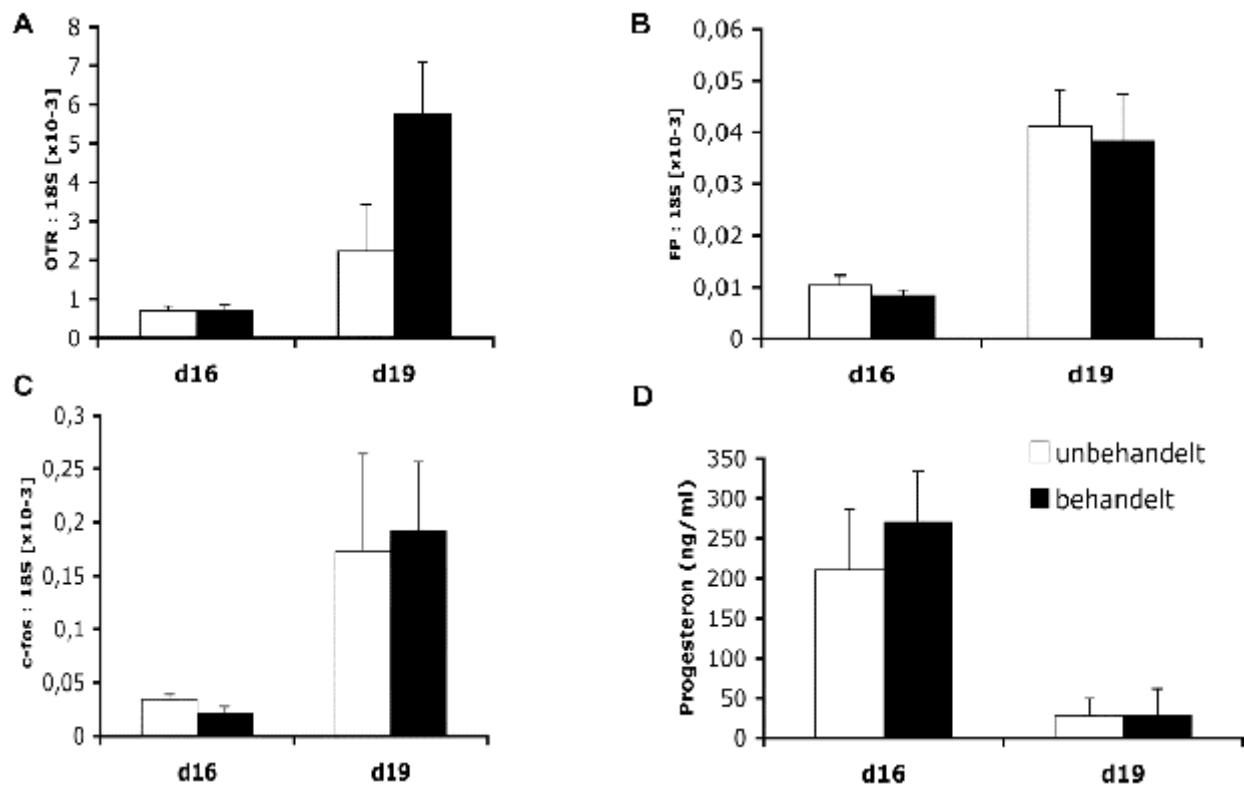


Abb. 4.1.10 Quantitative Real-Time PCR-Analyse myometrialer cDNA und Bestimmung des Blut-Progesterongehalts.

Die zeitliche Veränderung des Expressionsniveaus der Kontraktions-assoziierten Protein-Gene **A** Oxytozin Rezeptor (OTR), **B** Prostaglandin Rezeptor (FP) und **C** c-fos von unbehandelten (weiße Balken) und Tamoxifen-behandelten (schwarze Balken) Cx43^{fl/n}:SM-CreER^{T2}-Mäusen wurde als Verhältnis der Expressionsstärke des jeweiligen Gens zur Expression der 18S-RNA dargestellt. **D** Die Menge des im Blut zirkulierenden Progesterons wurde durch Radio-Immuno-Analyse bestimmt. Alle Proben wurden von Mäusen an Tag 16 zwischen 10.00 und 10.30 Uhr und während der Geburt gewonnen. Die Daten sind als \pm SEM (n = 5) dargestellt.

4.1.3 Überprüfung der SM-CreER^{T2}-vermittelten Deletion in glatten Muskelzellen anderer Gewebe

Neben der bisher beschriebenen SM-CreERT²-vermittelten Deletion des geflochten Cx43-Gens im gastrointestinalen System und im Uterus wurde zusätzlich eine Expression des LacZ-Reportergens in glatten Muskelzellen der Aorta und der Blase gefunden (Abb. 4.1.11). Kleinere Gefäße wie Arterien oder Arteriolen, wie z.B. im Pankreas, wurden von der SM-CreERT²-vermittelten Deletion nicht erfasst (nicht gezeigt).

Genauere Analysen dieser Organe wurden aufgrund der geringen Deletionseffizienz nicht durchgeführt.

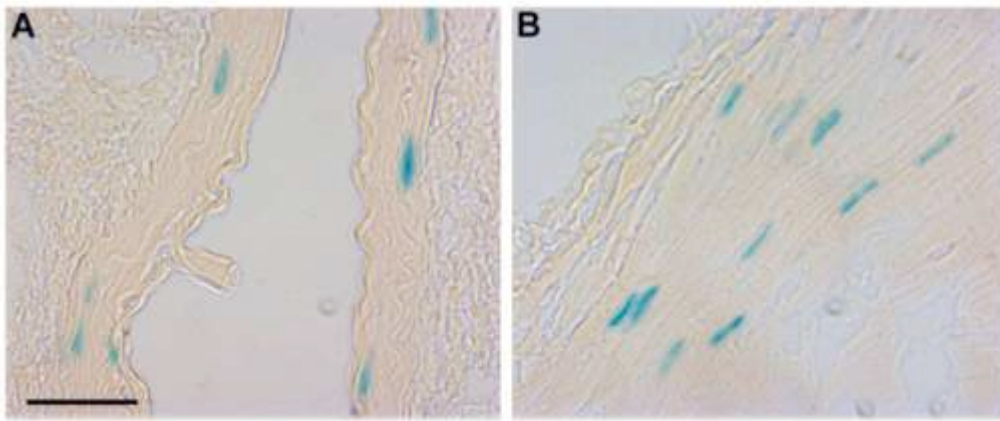


Abb. 4.1.11 Darstellung der SM-CreER^{T2}-vermittelten Deletion des Cx43-Gens in Aorta und Blase. Kryoschnitte von Aorta (A) und Blase (B) Tamoxifen-induzierter Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäuse wurden einer X-Gal-Färbung unterzogen und mit Eosin gegengefärbt. Größenbalken: 20 μ m.

4.2 Untersuchungen zur induzierbaren, Neuronen-spezifischen Expression von Connexin43 unter Verwendung des Tet-OFF-Systems

Während der Hirnentwicklung von Maus und Ratte unterliegt die Expression von Connexin43 einer zeitlichen Kontrolle. In mehreren Untersuchungen wurde gezeigt, dass juvenile, nicht jedoch ausdifferenzierte Neurone adulter Tiere Cx43 exprimieren (Bittman et al., 2002; Bittman et al., 1998; Connors et al., 1983; Theis et al., 2003). Mit der Erzeugung transgener Mausmutanten zur induzierbaren Expression von Cx43 in Neuronen sollte die funktionelle Bedeutung der entwicklungsspezifischen, neuronalen Regulation der Cx43-Expression untersucht werden.

4.2.1 Erzeugung von Mäusen zur induzierbaren, Neuronen-spezifischen Expression von Cx43

Transgene Cx43^{TetOeGFP}-Mäuse wurden über Injektion des Vektors pTetOCMVbi-Cx43-eGFP-Isolator (Döring, 2000) in den männlichen Vorkern befruchteter Eizellen des Mausstamms C57BL/6 x FVB/N hergestellt. Die Injektionen wurden von Mitarbeitern der Umeå Transgene Core Facility (Umeå, Schweden) durchgeführt. Von 33 erzeugten Tieren konnte in 13 das Cx43^{TetOeGFP}-Transgen nachgewiesen werden. Diese wurden als Begründer eigener Linien eingesetzt. Abb. 4.2.1 zeigt die durchgeführten Analysen zur Identifikation von Cx43^{TetOeGFP}-Mäusen. Anhand von Southern Blot-Untersuchungen PstI- (Nachweis des Cx43-Transgens) und XbaI-gespaltener Gehirn-DNA (Nachweis des eGFP-Transgens) sowie des transgenen HeLa-Klones K6 (Döring, 2000) konnte gezeigt werden, dass die erhaltenen Tiere unterschiedlich viele Kopien der pTetOCMVbi-Cx43-eGFP-Isolator-Sequenz in ihr Genom integriert hatten (Abb. 4.2.1 B). So zeigen die Tiere der Linien L11, L20 und L26 ein Vielfaches der Bandenintensität des Transgens im Vergleich zu den Tieren der Linien L25 und L29. Die Bandenintensität des Wildtyp-Cx43-Gens war im Gegensatz dazu jedoch nur wenig verschieden.

Über PCR-Analyse genomischer Schwanzspitzen-DNA konnte das Cx43^{TetOeGFP}-Transgen gezielt nachgewiesen werden. Aufgrund der Primerwahl wurde dabei der Kernbereich des Transgens mit den Sequenzen der Cx43-kodierenden Region, des bidirektionalen TetO-Promotors und des eGFP-Gens von insgesamt 1,7 kb amplifiziert (Abb. 4.2.1 A, C links).

Um eine spezifische, induzierbare Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens in Neuronen zu erreichen, wurden die Tiere der verschiedenen Linien mit CaMKII α -tTA-Mäusen (Mayford et al., 1996) gekreuzt. Nur die Nachkommen, die für beide Transgene positiv waren (Cx43^{TetOeGFP}: CaMKII α -tTA bzw. +/+), zeigten bereits pränatal eine Expression des transgenen Cx43-Gens

und des eGFP-Reportergens (vgl. Abb. 1.6). Durch Doxyzyklin-Gabe im Trinkwasser konnte innerhalb von zwei Wochen die Expression beider Transgene in $Cx43^{TetOeGFP};CaMKII\alpha-tTA$ -Tieren unterdrückt werden. Dies wurde durch Northern Blot-Untersuchungen an Gehirn-RNA gezeigt, wobei in Doxyzyklin-induzierten, doppelt-transgenen Tieren (+/+, D; Abb. 4.2.1 D) weder das transgene Cx43- noch das eGFP-Transkript nachgewiesen werden konnte.

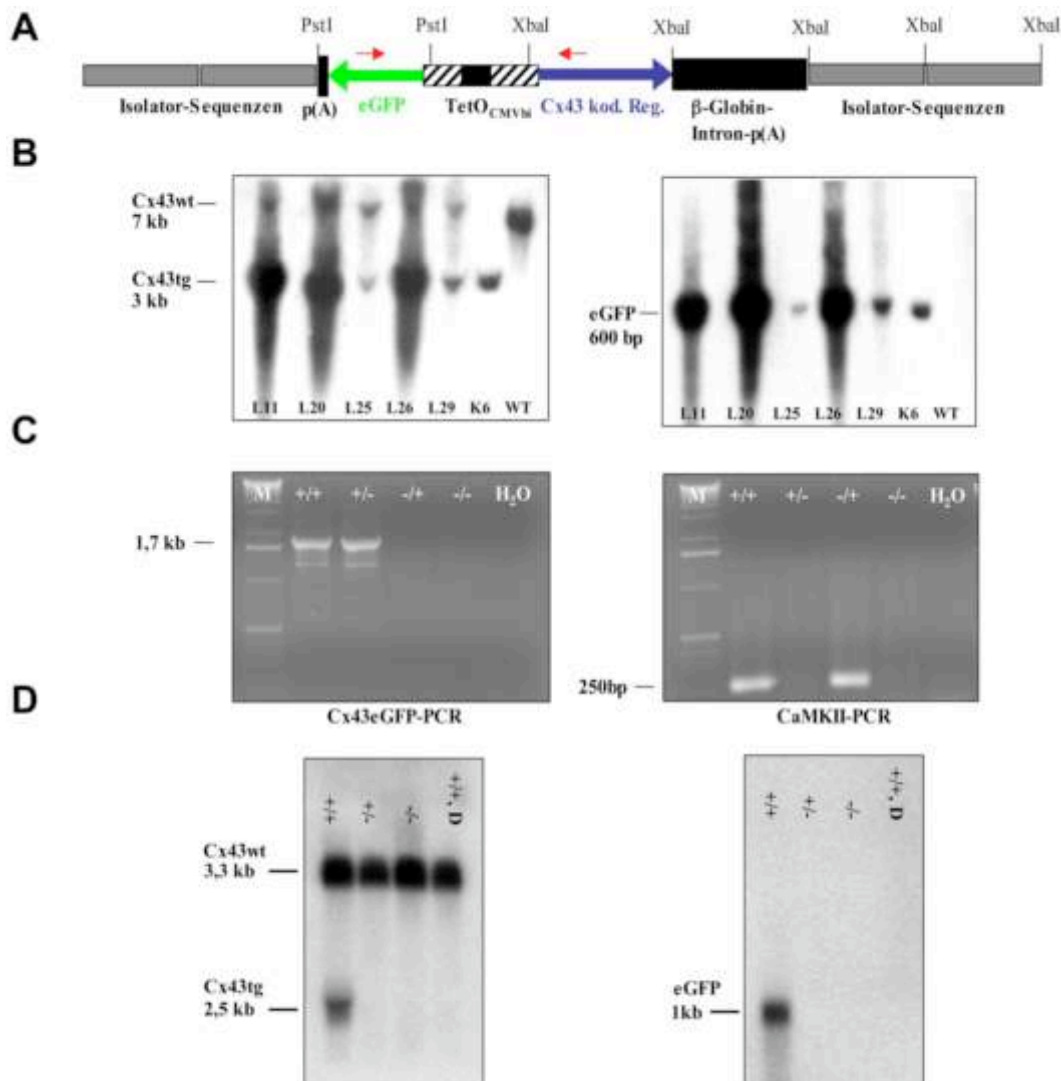


Abb. 4.2.1 Analysen zur Identifikation und Überprüfung transgener $Cx43^{TetOeGFP}$ -Tiere.

A Schematische Darstellung des $Cx43^{TetOeGFP}$ -Transgens. Der zentrale Bereich aus der Cx43-kodierenden Region (Cx43 kod. Reg.), dem bidirektionalen Tetrazyklin-abhängigen CMV-Promotor ($TetO_{CMVbi}$) und dem eGFP-Reportergen wird von Isolator-Sequenzen des Hühnchen- β -Globin-Locus begrenzt. Die Lage der spezifischen Cx43eGFP-PCR-Primer (rote Pfeile) ist angegeben. **B** Southern Blot Analyse von PstI- (links) sowie XbaI-gespaltener (rechts) Gehirn-DNA verschiedener transgener Linien und DNA des transgenen HeLa-Zellklons K6. Die Hybridisierungssignale PstI-gespaltener genomischer DNA mit einer internen Cx43-spezifischen Sonde lagen bei 7 kb für den Wildtyp-Cx43-Locus und bei 3 kb für das Cx43-Transgen. Die Inkubation XbaI-gespaltener DNA mit einer eGFP-spezifischen Sonde zeigte Signale bei 600 bp. **C** Genomische DNA transgener Tiere konnte mittels verschiedener PCR-Programme auf die Anwesenheit des $Cx43^{TetOeGFP}$ - (links) bzw. CaMKII α -tTA-Transgens (rechts) überprüft werden. In der Cx43eGFP-PCR wurde ein 1,7 kb großes Amplikon in Tieren erzeugt, die doppelt-transgen waren (+/+) oder nur das $Cx43^{TetOeGFP}$ -Transgen besaßen (+/-). In der CaMKII-PCR entstand ein Amplikon von 250 bp Größe sowohl in doppelt-transgenen Tieren als auch in solchen, die nur das CaMKII α -tTA-Transgen trugen (-/+). In Wildtyp-tieren (-/-) wurde in beiden PCR-Analysen kein Fragment amplifiziert.

D Northern Blot-Analyse an adultem Hirn-Gewebe unterschiedlicher, nicht mit Doxyzyklin behandelter Genotypen sowie Doxyzyklin-induzierter doppelt-transgener Mäuse (+/+, D). Die Hybridisierung der auf eine Nylonmembran übertragenen Gesamt-RNA mit einer gegen die Cx43-kodierende Region (links) bzw. das eGFP-Gen gerichteten ^{32}P -markierten Sonde (rechts) führte zum Nachweis der 3,3 kb Cx43-Wildtyp-, 2,5 kb Cx43-Transgen- und der 1 kb eGFP-mRNA.

4.2.2 Untersuchung der neuronalen Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens an Primärzellen und Hirnschnitten

Im Gehirn wird Cx43 neben Blutgefäßen und Ependymzellen vor allem in Gliazellen exprimiert, die 10- bis 50-mal häufiger vorkommen als Neurone. Durch die daraus resultierende enorme Expression des endogenen Cx43-Proteins kann eine zusätzliche Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens in Neuronen mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse an Gehirnschnitten nicht aufgelöst werden.

4.2.2.1 Die Cx43-Expression ist mit der eGFP-Fluoreszenz transgener Neurone kolokalisiert

Primäre Zellkulturen von Gehirnen neonataler Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere wurden angelegt, die durch das eher eindimensionale Wachstum kultivierter Astrozyten und Neurone eine bessere Auflösung der Cx43-Expression erlaubten. Durch Cx43-spezifische Antikörper konnte an 14 Tage alten Kulturen die Expression des Cx43-Proteins mit der eGFP-Fluoreszenz in Neuronen kolokalisiert werden. Gleichzeitig wurde durch den Einsatz Astrozyten-spezifischer GFAP-Antikörper nachgewiesen, dass die grünfluoreszierenden Neurone von einer großen Anzahl Cx43-positiver Astrozyten umgeben waren (Abb. 4.2.2). Daher kann im Folgenden die Fluoreszenz des eGFP- mit der Expression des transgenen Cx43-Proteins gleichgesetzt werden.

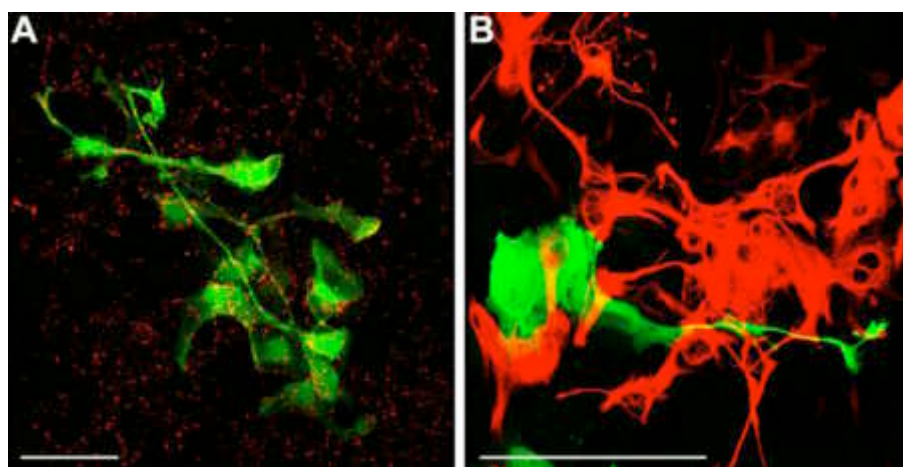


Abb. 4.2.2 Immunfluoreszenz-Analysen an Primärzellkulturen neonataler Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere.

A Cx43-spezifische Antikörpersignale (rot) sind mit der grünen Fluoreszenz eGFP-exprimierender, transgener Neurone kolokalisiert. **B** Die Analyse 14 Tage alter Primärzellkulturen mit Astrozyten-

spezifischen GFAP-Antikörpern (rot) zeigte, dass transgene Neurone (grün) von einer Vielzahl Astrozyten umgeben waren. Da Gliazellen das Cx43-Protein stark exprimieren, resultieren die Signale in A, die nicht mit Neuronen zu kolokalisieren sind, von dieser Zellpopulation her. Größenbalken je 50 μm .

4.2.2.2 Adulte Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII-tTA-Tiere zeigen eine Neuronen-spezifische Expression des Transgens in vielen Hirnarealen

Im adulten Gehirn wurde die Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens in vielen Regionen nachgewiesen (Abb. 4.2.4). Eine besonders starke Expression wurde an koronalen Dickschnitten im Striatum, Hippocampus und der Amygdala nachgewiesen. Auch verschiedene Cortex-Bereiche, besonders der motorische, somatosensorische, visuelle und piriforme Cortex zeigten eine intensive Cx43^{TetOeGFP}-Expression. Im Bulbus olfactorius (Abb. 4.2.3) und im Septum wurden eine geringere Anzahl eGFP-positiver Zellen gefunden. Keine Fluoreszenz konnte im Cerebellum, Rückenmark oder der Retina sowie in Doxyzyklin-behandelten Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tieren nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auffällig war das Muster der transgenen Expression: Besonders im Hippocampus und Cortex zeigten entgegen dem für CamKII α beschriebenen ubiquitären neuronalen Expressionsmuster (Burgin et al., 1990) nur ein Teil der Neurone eine eGFP-Fluoreszenz.

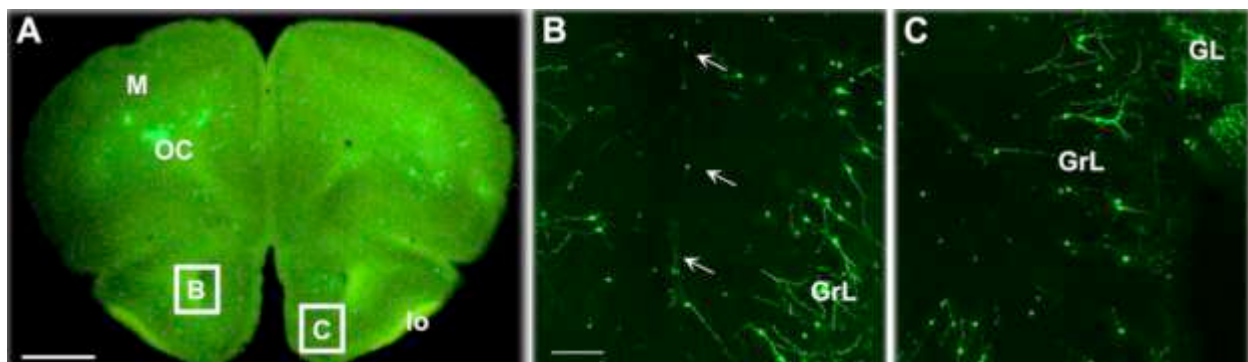


Abb. 4.2.3 Analysen der Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens an horizontalen Dickschnitten des Bulbus olfactorius.

Die Fluoreszenz des eGFP-Reporterproteins wurde in Neuronen der granulären (GrL) sowie der glomerulären Schicht (GL) nachgewiesen. Ebenfalls wurden grünfluoreszierende Neurone im Bereich des rostralen migratorischen Stroms (Pfeile) gefunden. B und C stellen vergrößerte Ausschnitte aus A dar. M: Motorischer Cortex, OC: Orbitaler Cortex, lo: lateraler olfaktorischer Trakt. Größenbalken in A: 100 μm , in B: 20 μm .

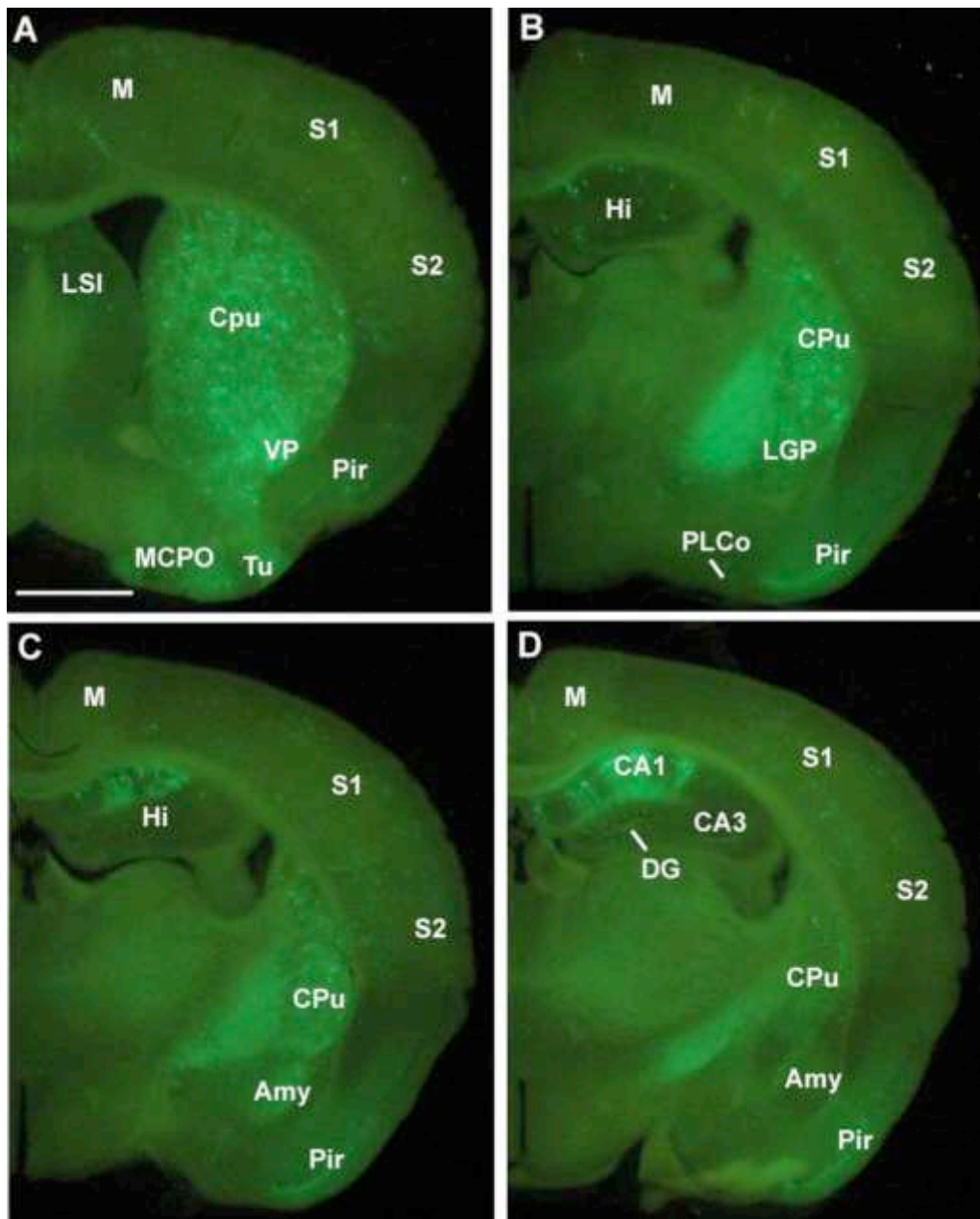


Abb. 4.2.4 Analysen der Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens an koronalen Gehirnschnitten (1).

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der eGFP-Fluoreszenz an 400µm dicken koronalen Hirnschnitten einer Cx43^{TetOeGFP}:CaMKIIα-tTA-Maus. **A-D** zeigen Schnitte der Ebenen Bregma 0,5 mm bis Bregma -1,70 mm, **E-H** Schnitte der Ebenen Bregma -2,18 mm bis Bregma -3,52 mm. Au: auditorischer Cortex, Amy: Amygdala, CA1-3: Ammonshornfeld 1-3, cp: cerebraler Faserstrang, CPu: Nucleus caudatus/Putamen (Striatum), DG: Gyrus dentatus, Hi: Hippocampus, LGP: lateraler Globus pallidus, LSN: lateraler septaler Nucleus, M: Motorcortex, MCPO: magnozellularer präoptischer Nucleus, Pir: piriformer Cortex, PLCo: posterolateraler cortikaler amygdoidaler Nucleus, RS: retrosplenialer Cortex, S1: primärer somatosensorischer Cortex, S2: sekundärer somatosensorischer Cortex, Tu: olfaktorisches Tuberkel, V1: primärer visueller Cortex, S2: sekundärer visueller Cortex. Größenbalken in A: 1 mm.

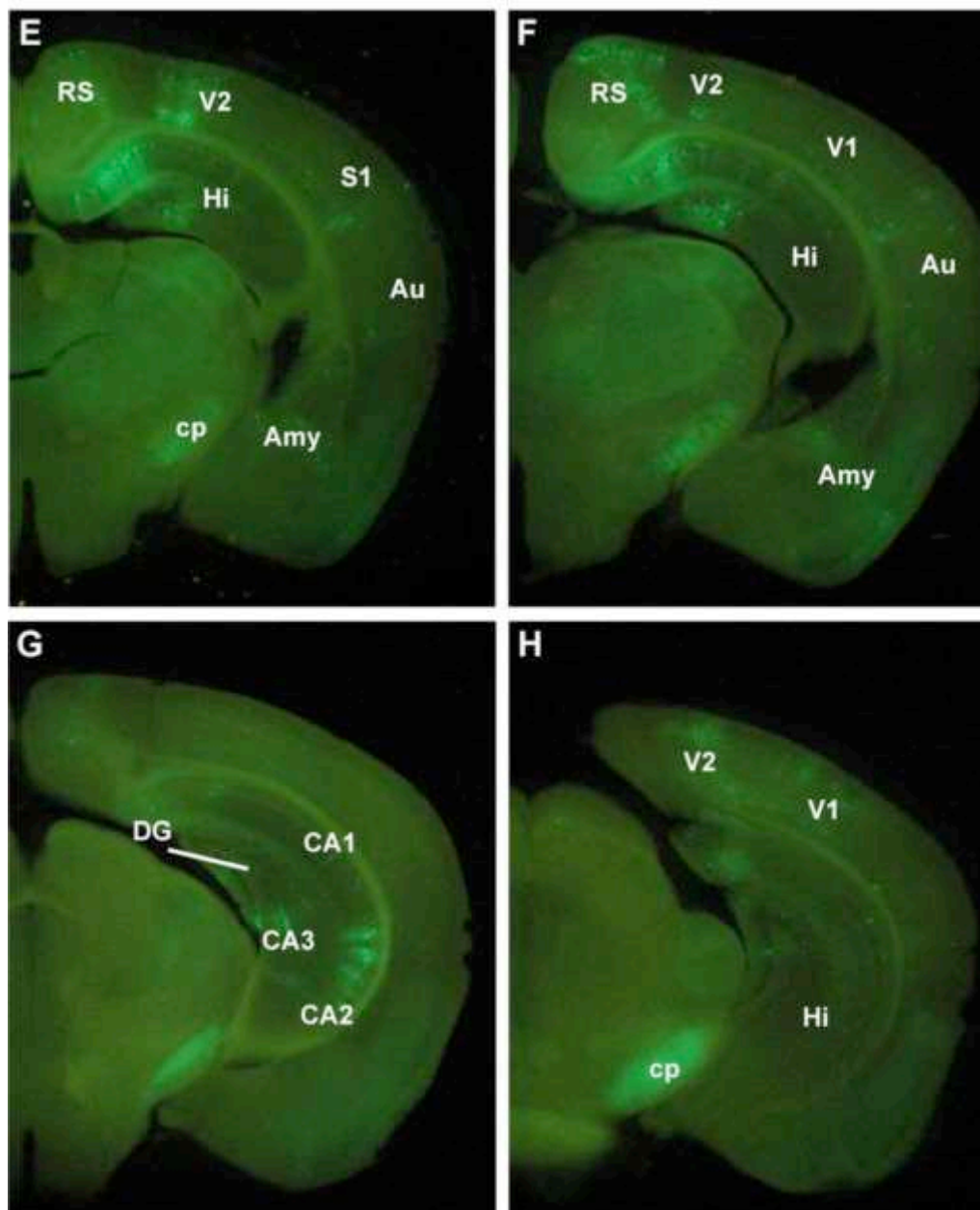


Abb. 4.2.4 Analysen der Expression des $Cx43^{TetOeGFP}$ -Transgens an koronalen Gehirndickschnitten. (2) Legende siehe vorherige Seite.

Um zu überprüfen, ob dieses Ergebnis auf das $Cx43^{TetOeGFP}$ - oder das $CaMKII\alpha$ -tTA-Transgen zurückzuführen war, wurden $CaMKII\alpha$ -tTA-Tiere mit TetO-LacZ-Reportermäusen (Mayford et al., 1996) verpaart. An X-Gal-gefärbten Kryoschnitten dieser Tiere wurde ein ähnliches Muster LacZ-positiver Zellen festgestellt, wie in Abb. 4.2.4 für eGFP gezeigt. Dabei ist in Abb. 4.2.5 A und B dieselbe Schnittebene wie in Abb. 4.2.4 B und C dargestellt. Auch hier wurde nicht in allen Neuronen des Hippocampus oder Cortex das Reportergen in Abhängigkeit des $CaMKII\alpha$ -tTA-Proteins exprimiert. Besonders am Hippocampus von TetO-lacZ: $CaMKII\alpha$ -tTA-Tieren zeigte sich die Abhängigkeit der Färbung und damit der Expression des $CaMKII\alpha$ -tTA-Transgens von der Schnittebene, und damit unter Umständen vom angeschnittenen Zelltyp (Abb.

4.2.5). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression des CaMKII α -tTA-Transgens nur in einer Teilpopulation der Vorderhirnneurone stattfindet.

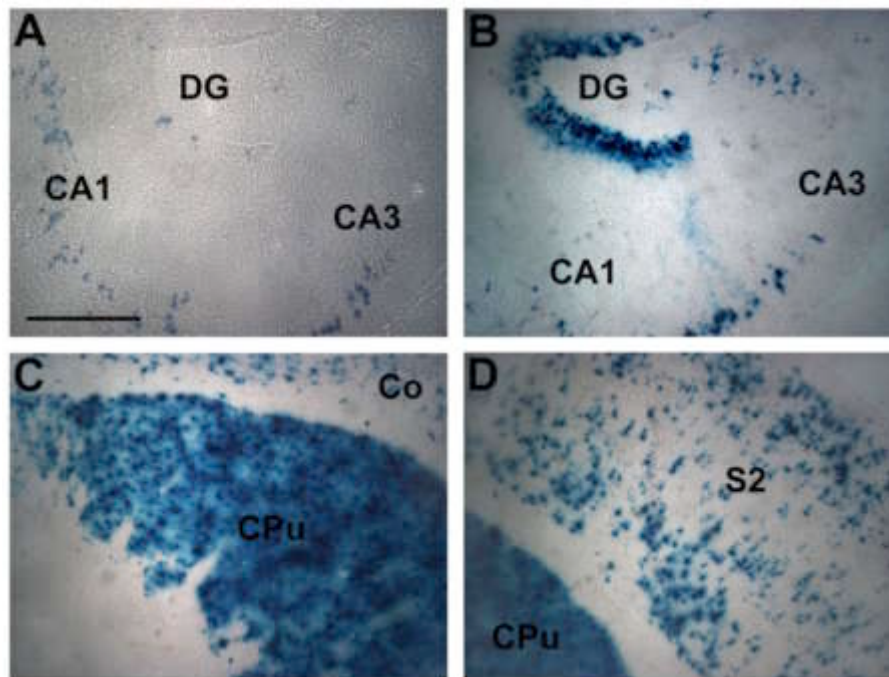


Abb. 4.2.5 Untersuchung der LacZ-Expression an Gehirn-Kryoschnitten von TetO-lacZ: CaMKII α -tTA-Tieren.

Die gezeigten Schnitte stammen aus verschiedenen Ebenen des Gehirns eines TetO-lacZ:CaMKII α -tTA-Tieres. **A** zeigt den Hippocampus der Ebene Bregma -1,22 mm. Im Gyrus dentatus sind kaum X-Gal-gefärbte Zellen (blau) zu erkennen. Auch die Anfärbung der CA-Regionen ist moderat. **B** Der Kryoschnitt der Ebene Bregma -1,46 mm zeigt eine nahezu vollständige Anfärbung der Körnerzellen des Gyrus dentatus. Auch die lacZ-Expression der CA-Regionen ist hier stärker als in A. Größenskalen: 250 μ m.

Um die neuronale Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens nicht nur in Kultur sondern auch *in situ* nachzuweisen und eine Expression in Astrozyten auszuschließen, wurden Immunfluoreszenz-Analysen an transversalen Dickschnitten des Gehirns durchgeführt. Abb. 4.2.6 zeigt beispielhaft die Kolokalisation des neuronalen Markers NeuN mit der eGFP-Fluoreszenz von Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Mäusen. In Tieren der Linien L11, L26 und L29 wurde die stärkste und gleichmäßigste Fluoreszenz des Reporterproteins in 60 bis 80% der CA1-Prinzipalzellen des Hippocampus (A) und Körnerzellen des Gyrus dentatus (B), in 30 bis 60% der neuronalen Cortex-Zellen (C) und in mehr als 70% der striatalen Neurone (D) nachgewiesen. Die genannten Variationen in der Expressionsstärke ergaben sich aus Unterschieden zwischen einzelnen Tieren derselben Linie.

Eine Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens in Astrozyten konnte durch die fehlende Kolokalisation von GFAP-Antikörpersignalen mit eGFP-positiven Zellen in allen untersuchten Gehirnnregionen ausgeschlossen werden (Abb. 4.2.7). Diese Ergebnisse zeigen, dass die CaMKII α -tTA-gesteuerte Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens tatsächlich auf Neurone beschränkt ist.

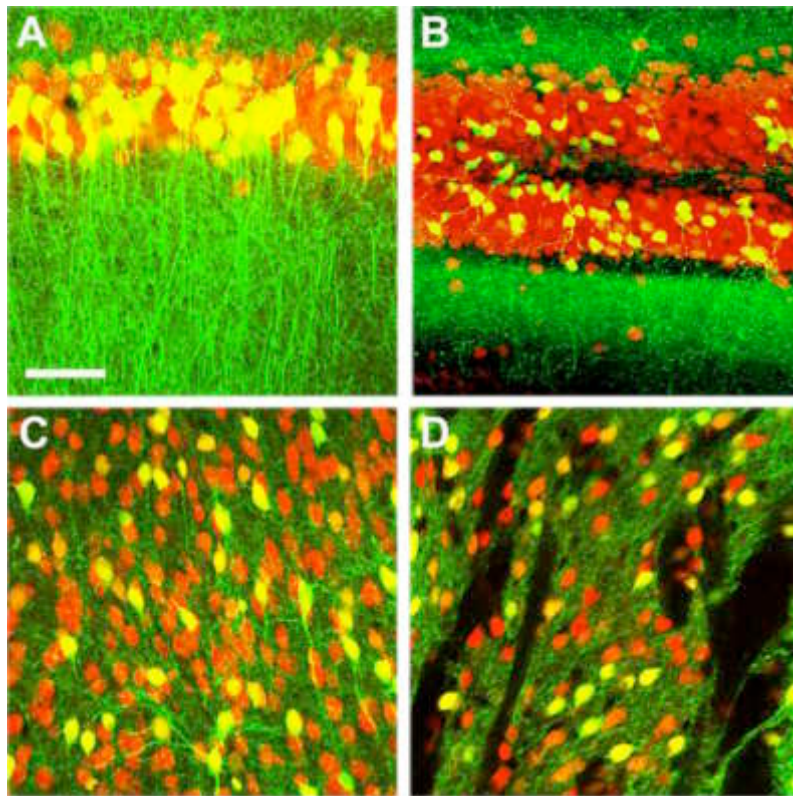


Abb. 4.2.6 Immunfluoreszenz-Untersuchungen der eGFP- (grün) und NeuN-Expression (rot) an Gehirndickschnitten von $Cx43^{TetOeGFP};CaMKII\alpha-tTA$ -Tieren.

A CA1-Region des Hippocampus. **B** Gyrus dentatus. **C** S1-Region des Cortex. **D** Striatum. Koexpression: gelb. Größenbalken: 50 μ m.

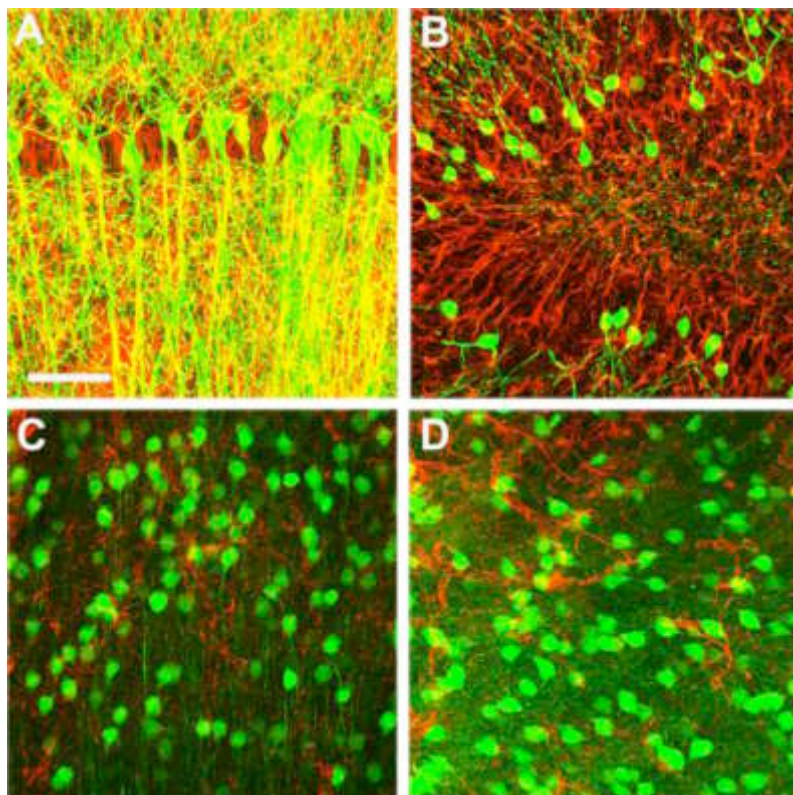


Abb. 4.2.7 Analyse der eGFP- (grün) und GFAP-Expression (rot) an Gehirndickschnitten von $Cx43^{TetOeGFP};CaMKII\alpha-tTA$ -Tieren.

A CA1-Region des Hippocampus. **B** Gyrus dentatus. **C** S1-Region des Cortex. **D** Striatum. Besonders im Hippocampus (A, B) war eine hohe Astrozytenzahl vorhanden, die eng mit Neuronen assoziiert war (gelb). Größenbalken: 50 μ m.

4.2.3 Funktionelle Analysen des Kopplungsverhaltens transgener Neurone *in vitro* und *in situ*.

Nachdem die neuronale, membranständige Expression des transgenen Cx43 gezeigt wurde, wurde untersucht, ob diese Cx43-Proteine auch funktionelle Transmembrankanäle bilden können.

4.2.3.1 Primärzellkulturen neonataler Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere zeigen eine neuronale, Connexin43-vermittelte Farbstoffkopplung

Die Cx43-vermittelte interzelluläre Kopplung wurde an 14 Tage alten Primärzellkulturen des Gehirns neonataler Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Mäuse durch Farbstoffinjektion untersucht. Um auszuschließen, dass eine mögliche Cx45-vermittelte interzelluläre Kopplung (Maxeiner et al., 2003) den Farbstofftransfer durch Cx43-Kanäle überdecken könnte, wurde der hochmolekulare Farbstoff Cascade Blue (548 Da) gewählt und zunächst der Transfer in Cx43- und Cx45-exprimierenden HeLa-Zellen untersucht. Konfluente Cx43Hela-Zellen zeigten eine Kopplung bis in die fünfte Ordnung, wohingegen Cx45-Transfektanten keinen Farbstofftransfer von der injizierten Zelle in umgebende Nachbarzellen erlaubten (Abb. 4.2.8). Ein Cx45-vermittelter Transfer von Cascade Blue war somit nicht vorhanden.

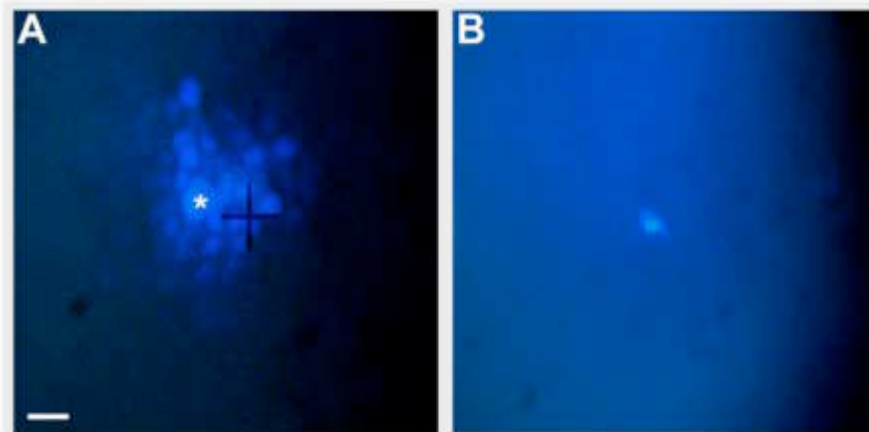


Abb. 4.2.8 Mikroinjektion des Farbstoffes Cascade Blue in HeLa-Transfektanten.

A Untersuchung des Kopplungsverhaltens Cx43-transfizierter HeLa-Zellen. Die injizierte Zelle ist mit einem * markiert. Ein Transfer des injizierten Cascade Blue bis in die fünfte Ordnung wurde beobachtet. **B** In injizierten HeLaCx45-Transfektanten wurde keine Kopplung nachgewiesen. Größenbalken: 20 μ m.

Cascade Blue-Injektionen in doppelt-transgene neuronale Primärzellkulturen zeigten eine Kopplung der injizierten Zelle mit mehreren Nachbarzellen zweiter Ordnung. Dabei wurde ein Farbstofftransfer sowohl von in Gruppen vorliegenden transgenen Neuronen in intensiv grün gefärbte Nachbarzellen als auch aus einzeln liegenden Neuronen in kaum oder gar nicht eGFP-exprimierende angrenzende Zellen beobachtet. Von 40 durchgeführten Injektionen in

Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Primärzellkulturen zeigten 82% eine Kopplung, wobei 47% der injizierten Zellen mit grün-fluoreszierenden und 35% mit nicht-grünen Nachbarzellen koppelten. 18% der transgenen Neurone zeigten keinen Farbstofftransfer. Neurone gleichaltriger Primärzellkulturen von Kontroll-Geschwistertieren zeigten in 80% der Fälle (8 von 10) keine Kopplung. In zwei von zehn injizierten Kontroll-Neuronen wurde ein Farbstofftransfer in maximal drei Nachbarzellen erster Ordnung beobachtet (Abb. 4.2.9).

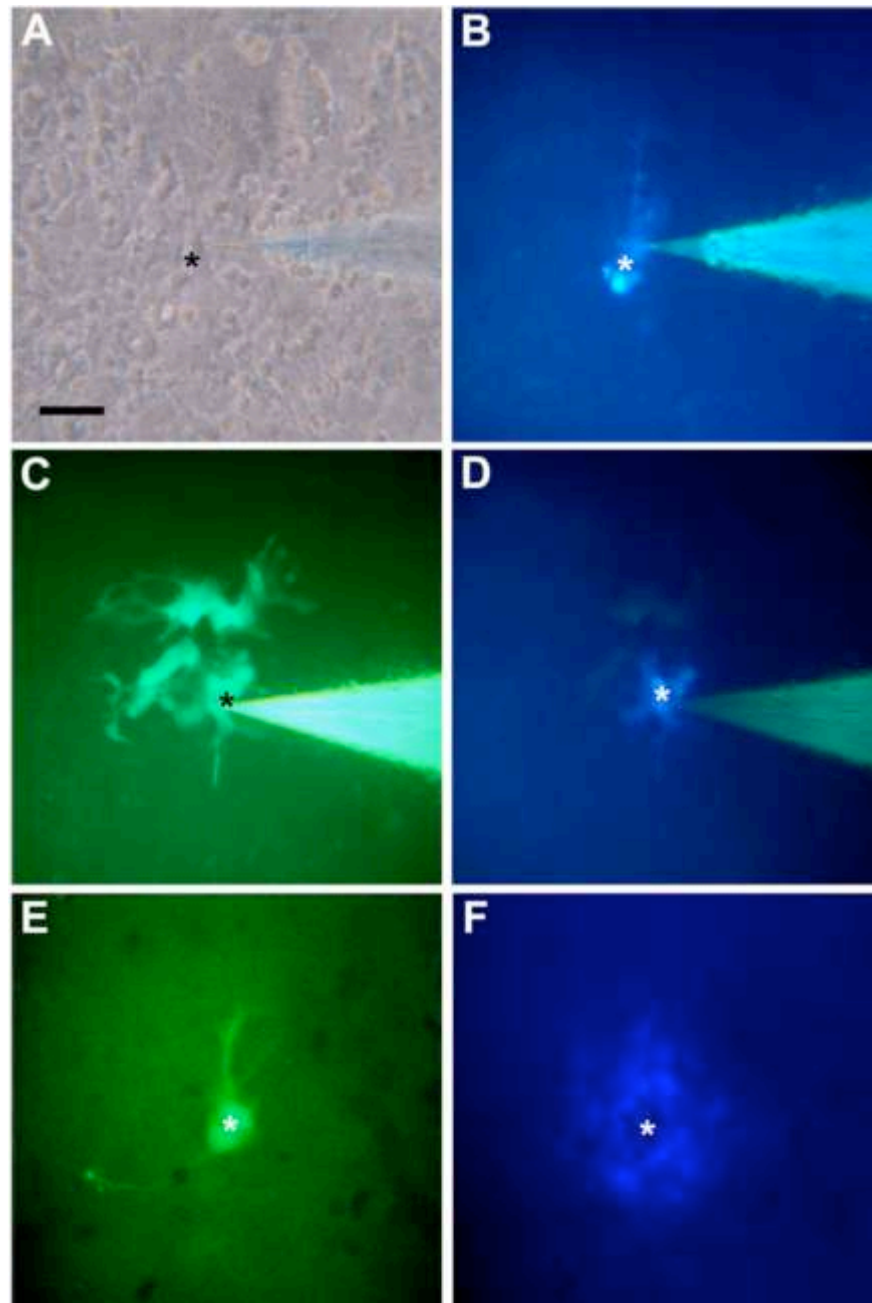


Abb. 4.2.9 Mikroinjektion des Farbstoffes Cascade Blue in 14 Tage alte neuronale Primärzellkulturen aus Gehirnen neonataler Mäuse.

A, B Untersuchung des Kopplungsverhaltens nicht-transgener Kontroll-Neurone. Die Phasenkontrastaufnahme (A) zeigt die Konfluenz der Kultur. Ein Transfer des injizierten Cascade Blue wurde in 80% der Fälle nicht beobachtet (B). **C-F** Doppelt-transgene Neurone zeigten eine Kopplung in mehrere sowohl eGFP-exprimierende (C, D) als auch nicht-fluoreszierende Nachbarzellen (E, F). C und E zeigen die eGFP-Fluoreszenz der injizierten Zellen, D und F die Farbstoffkopplung mit Hilfe eines Cascade Blue-spezifischen Filters. Die injizierte Zelle ist jeweils mit einem * markiert. Größenbalken: 50 μ m.

4.2.3.2 Die Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens führt zu einer Kopplung hippocampaler Pyramidenneurone, nicht aber zu einer Kopplung zwischen Neuronen und Astrozyten

Die unter Zellkulturbedingungen gefundene Cx43-vermittelte neuronale Kopplung wurde zusätzlich im Gewebedickschnitt adulter Gehirne untersucht. Die entsprechenden Farbstoffinjektionen und anschließenden Färbungen zum Nachweis des injizierten Biocytins (372 Da) wurden von Anke Wallraff (Klinik für Neurochirurgie, Abt. Experimentelle Neurobiologie, Universität Bonn) durchgeführt.

Es wurden zwei Gruppen doppelt-transgener sowie nicht-transgener Geschwistertiere der Linien L11, L26 und L29 untersucht: Die erste Gruppe wurde 22-28 Tage nach der Geburt präpariert, die zweite Gruppe hatte am Tag des Experiments ein Alter von 41-48 Tagen. In jüngeren Tieren zeigten vier von sechs (67%) erfolgreich injizierten Neuronen der hippocampalen CA1-Region einen Farbstofftransfer in 1-5 Nachbarzellen. Dabei fiel auf, dass vor allem eGFP-negative Zellen mit dem injizierten Neuron koppelten und auch ein Transfer des Biocytins von nicht-fluoreszierenden Zellen in umgebende Neurone beobachtet wurde. In nicht-transgenen jungen Kontroll-Tieren wurde in einer von sechs (17%) erfolgreichen Injektionen eine Kopplung gemessen (Abb. 4.2.10). 41-48 Tage alte Mäusen zeigten weder in transgenen (0 von 12) noch in Kontroll-Zellen (0 von 10) eine Kopplung.

Weiter wurde untersucht, ob eine Biocytin-Injektion in Neuronen zu einem Farbstofftransfer in das astrozytäre Synzytium führte. Bei keiner der durchgeführten Injektionen wurde eine solche Kopplung beobachtet. Auch Injektionen in Astrozyten ergaben einen interzellulären Biocytin-Transfer nur zwischen Gliazellen, nicht aber von Astrozyten zu Neuronen (Abb. 4.2.11).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass junge, transgene Neurone stärker über Gap Junctions gekoppelt waren als Neurone ihrer nicht-transgenen Geschwistertiere. Außerdem schien die Expression oder Funktion des transgenen Cx43-Proteins einer zeitlichen Kontrolle zu unterliegen. Eine Cx43-vermittelte Kopplung zwischen Neuronen und Astrozyten fand nicht statt.

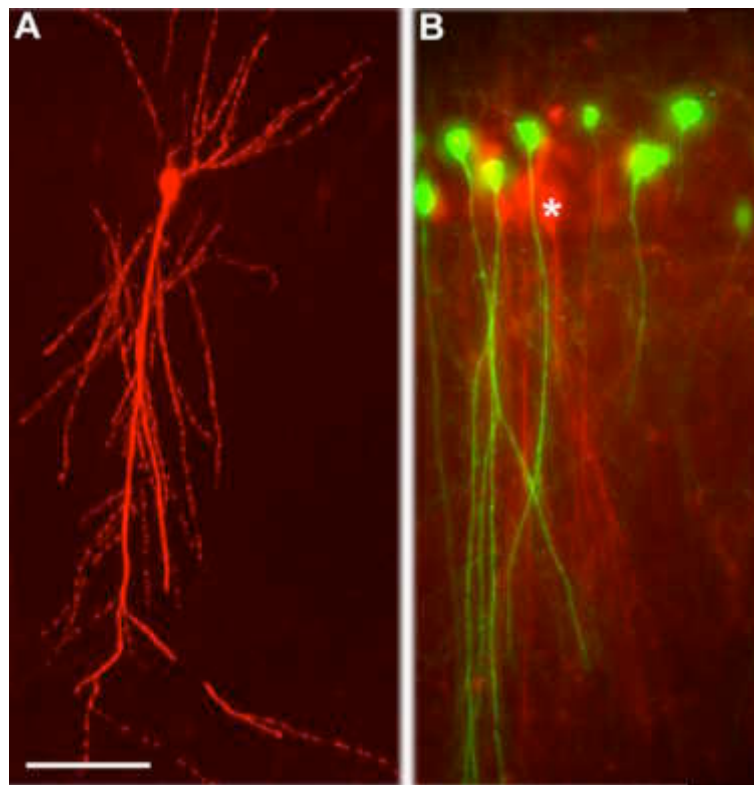


Abb. 4.2.10 Neuronale Biocytin-Mikroinjektion in Dickschnitte des Hippocampus 22-28 Tage alter Mäuse.

A Untersuchung des Kopplungsverhaltens nicht-transgener Biocytin-injizierter Kontroll-Neurone (rot). In 83% der Fälle wurde kein Farbstofftransfer beobachtet. **B** Farbstoffkopplung eines injizierten (*) $Cx43^{TetOeGFP}$:CaMKII α -tTA-Neurons. Die starke rote Fluoreszenz des Biocytins überdeckt die eGFP-Fluoreszenz der transgenen Zelle. Ein Farbstofftransfer in mehrere Nachbarzellen wurde beobachtet. Größenbalken: 50 μ m.

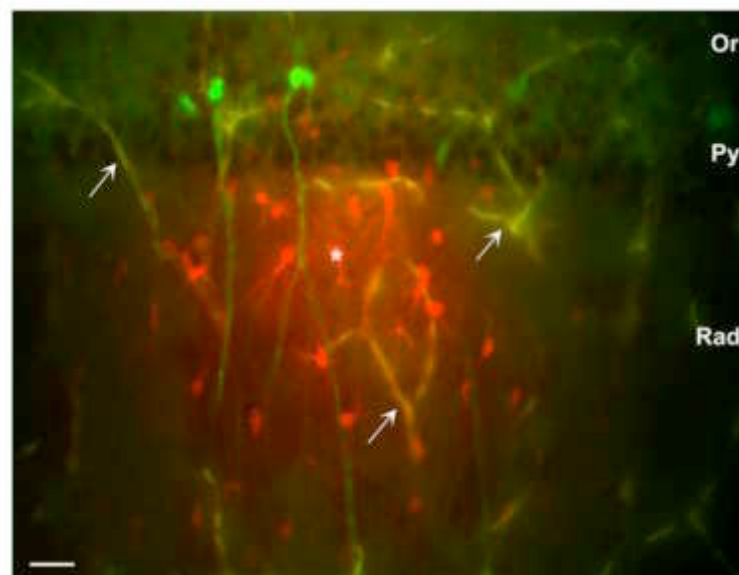


Abb. 4.2.11 Astrozytäre Biocytin-Mikroinjektion in Dickschnitte des Hippocampus von $Cx43^{TetOeGFP}$:CaMKII α -tTA-Mäusen.

Eine Farbstoffkopplung zwischen Biocytin-injizierten Astrozyten (rot) und Pyramidenneuronen (grün) wurde nicht beobachtet. Der injizierte Astrozyt ist mit einem * markiert und koppelt nur mit umgebenden Astrozyten. Blutgefäße erscheinen gelb und sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Or: Stratum Oriens, Py: Stratum Pyramidale; Rad: Stratum Radiatum. Größenbalken: 50 μ m.

4.2.3.3 Das transgene Cx43-Protein wird im Hippocampus doppelt-transgener Mäuse mit zunehmendem Alter phosphoryliert

Aufgrund der unter Punkt 4.2.3.2 genannten altersabhängigen interzellulären Kopplung des transgenen Cx43 wurde überprüft, ob die beschriebene Reduktion des Farbstofftransfers auf eine verringerte Expression des Cx43-Proteins oder auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen war. Anhand von Immunoblot-Analysen von Hippocampus-Lysaten drei bis sechs Wochen alter Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere und nicht-transgener Geschwister konnte gezeigt werden, dass die Cx43-Expression in Lysaten drei Wochen alter transgener Tiere sich nicht von denen der Kontroll-Tiere aller untersuchter Altersgruppen unterschieden. In Hippocampus-Lysaten vier bis sechs Wochen alter transgener Mäuse konnte eine weitere Phosphorylierungsbande des Cx43-Proteins nachgewiesen werden, die in drei Wochen alten Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Mäuse sowie in Kontroll-Geschwistertieren nicht vorhanden war (Abb. 4.2.12). Eine altersabhängig verminderte Expression des Cx43-Proteins konnte in transgenen Tieren im Vergleich zu den Kontrollen nicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das transgene, neuronale Cx43-Protein in Mäusen vier Wochen nach der Geburt stärker phosphoryliert wird als das vor allem in Astrozyten exprimierte endogene Cx43-Protein.

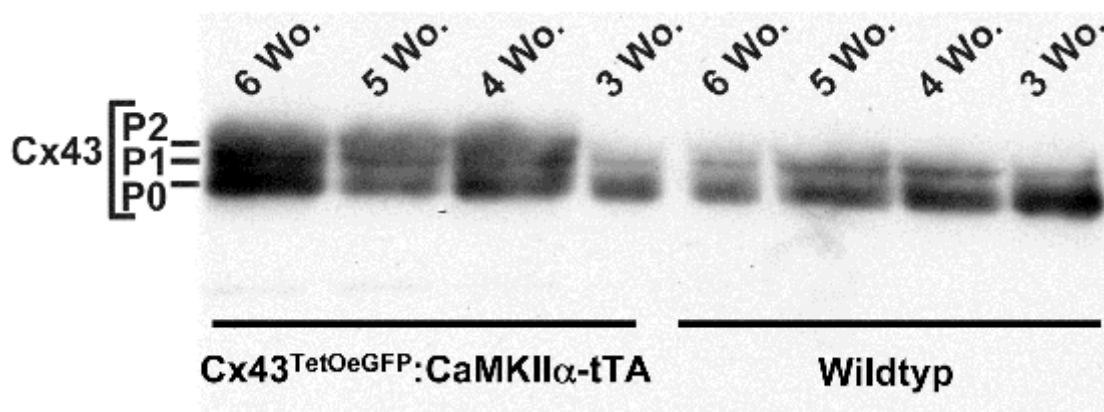


Abb. 4.2.12 Immunoblot-Analysen von Hippocampus-Lysaten drei bis sechs Wochen alter Mäuse.

Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von 100 μ g Hippocampus-Lysat von drei bis sechs Wochen alten (3-6 Wo.) Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Mäusen und Kontroll-Geschwistertieren. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und mit polyklonalen Cx43-Antikörpern aus Kaninchen inkubiert. Nach Inkubation mit gegen Kaninchen gerichteten, Meerrettichperoxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern aus Ziege wurden immunreaktive Signale auf der Membran mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Alle Lysate zeigten die erwarteten Signale von unphosphoryliertem Cx43 in der Höhe von 41 kD (P0) sowie die Signale des einfach phosphorylierten und somit höhermolekularen 44 kD Cx43-Proteins (P1). Lysate von vier bis sechs Wochen alten transgenen Tieren zeigten zusätzlich das Signal des mehrfach phosphorylierten Cx43-Proteins (P2) bei 46 kD.

4.2.4 Untersuchung verhaltensspezifischer und neurochemischer Konsequenzen der Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens

Um die Auswirkungen der transgenen Cx43-Expression in Neuronen zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Ekrem Dere (Institut für Experimentelle Psychologie, Universität Düsseldorf) Verhaltensexperimente und neurochemische Analysen durchgeführt.

4.2.4.1 Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere zeigen Verhaltensauffälligkeiten

Im Offenfeldtest wurde untersucht, ob die Aktivität der doppelt-transgenen Tiere im Vergleich zu den Kontrollen verändert war. Dabei wurde eine signifikante Abnahme sowohl in der Lokomotion (Transgene: $p = 0,0001$; Kontrollen: $p = 0,001$) als auch in der Häufigkeit des Aufrichtens („Männchen machen“) (Transgene: $p = 0,0009$; Kontrollen: $p = 0,001$) zwischen dem ersten und zweiten Tag der Messreihe für beide Gruppen beobachtet. Es wurde kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp und der Lokomotions- oder Aufricht-Aktivität beobachtet (Lokomotion: $p = 0,986$; Aufrichten: $0,716$). Weiter zeigten beide Gruppen eine ähnliche Laufgeschwindigkeit sowie ähnliche Aufenthaltszeiten in den Ecken oder dem Zentrum des Offenfelds ($p > 0,1$ für alle Untersuchungen). Diese Daten weisen darauf hin, dass das Explorationsverhalten, die emotionale Reaktivität auf neue Umgebungen und die räumliche Habituation nicht von der Neuronen-spezifischen Cx43-Expression beeinflusst wird.

Im Objekt-Erkennungs-Test, mit dem das Objektgedächtnis untersucht werden kann, zeigten beide Gruppen eine signifikant höhere Explorationszeit des neuen gegenüber dem schon bekannten Objekt (Transgene: $p = 0,001$; Kontrollen: $p = 0,017$). Der Prozentsatz der Explorationsdauer der neuen gegenüber den bekannten Objekten unterschied sich, bezogen auf den Genotyp, jedoch nicht ($p = 0,589$). Daher scheint die Expression von Cx43 in Pyramidenneuronen des Hippocampus adulter Mäuse keinen Einfluss auf das Objektgedächtnis zu haben.

Der gestaffelte Ängstlichkeitstest untersucht das angstgesteuerte Verhalten von Nagern. Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere zeigten eine erhöhte Aversion gegenüber bestimmten Kompartimenten der Versuchsaapparatur, was auf eine erhöhte Ängstlichkeit hinwies (Abb. 4.2.13). Verglichen mit Kontrolltieren wurden bei doppelt-transgenen Mäusen erhöhte Eintritte in den hinteren Teil des am wenigsten aversiven Kompartiments (mit opaque-grauen Wänden und schwarzem Boden, $p = 0,033$), aber reduzierte prozentuale Eintritte in den Teil der Apparatur mit transparenten Wänden und weißem Boden (WTW, $p < 0,001$) gemessen. Relativ zu den Kontrollen zeigten die Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere eine signifikant kürzere Verweildauer im hinteren Teil des WTW-Abschnittes ($p = 0,002$). Die Prozentzahl der Eintritte

in die hinteren Teile der offenen Arme der Versuchsanordnung, ebenso wie die prozentuale Verweildauer in diesen Kompartimenten, war zwischen beiden Gruppen identisch ($p > 0,1$). Da der Helligkeitskontrast zwischen mit Wänden versehenen Armen stärker ist als in offenen Armen (Dere et al., 2002), weist das oben dargestellte Verhaltensmuster auf eine verstärkte Angst vor stark beleuchteten Bereichen hin, wohingegen die Angst vor Höhe, die von den offenen Armen der Apparatur ausgelöst wird, nicht beeinflusst war.

Die Motorkoordination von $Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII\alpha-tTA$ - und Kontrolltieren wurde mit Hilfe einer beschleunigenden Rotarod-Apparatur gemessen (Abb. 4.2.13). Beide Gruppen zeigten keine initialen Motorkoordinationsdefizite (Transgene: $83,5 \pm 16,5$ s; Kontrollen: $98,5 \pm 17,8$ s; $p = 0,556$). Da Mäuse normalerweise eine verbesserte Rotarod-Leistung mit steigender Versuchszahl zeigen, wurde untersucht, ob die motorische Lernfähigkeit in doppelt-transgenen Tieren verändert war. In drei weiteren Versuchen verbesserten beide Gruppen ihre Leistungen, wobei die Zeiten, die $Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII\alpha-tTA$ -Tiere auf dem Rotarod verblieben, signifikant kürzer waren als die der Kontrolltiere (1. Versuch: $p = 0,064$; 2. Versuch: $p = 0,025$; 3. Versuch: $p = 0,033$). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression von $Cx43$ in Neuronen adulter Mäuse das motorische Lernen beeinflusst.

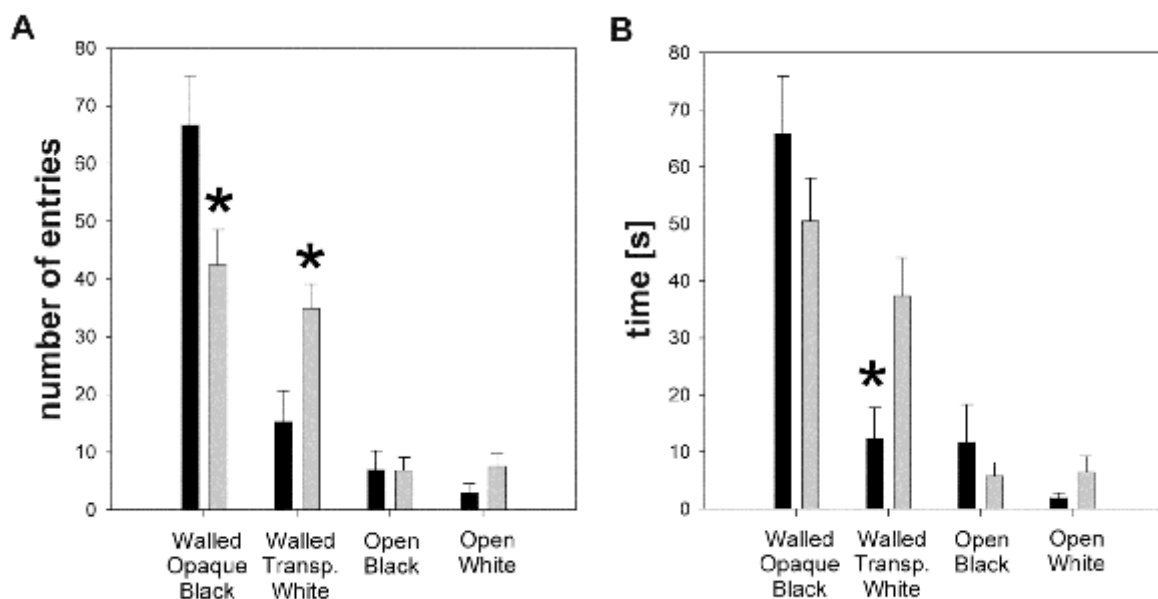


Abb. 4.2.13 Ergebnisse des gestaffelten Änglichkeitstests an adulten Mäusen.

A Untersuchung der Eintritte in den hinteren Teil der einzelnen Abschnitte der Versuchsanordnung. **B** Untersuchung der Aufenthaltsdauer in den hinteren Teilen der einzelnen Apparatur-Kompartimente. $Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII\alpha-tTA$ -Tiere werden durch schwarze Balken, Kontroll-Geschwistertiere durch graue Balken repräsentiert. Die Daten sind als Mittelwerte (\pm SEM) dargestellt. *: $p < 0,05$. Walled Opaque Black: Versuchskompartiment mit opaque-grauen Wänden und schwarzem Boden, Walled Transp. White: Versuchskompartiment mit transparenten Wänden und weißem Boden, Open Black: Kompartiment ohne Wände und mit schwarzem Boden, Open White: Kompartiment ohne Wände und mit weißem Boden.

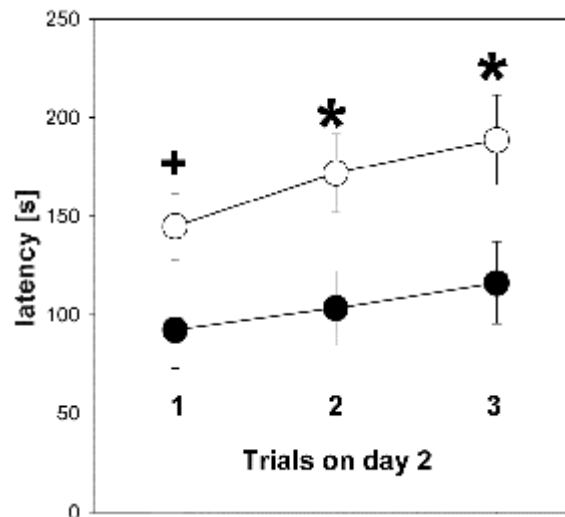


Abb. 4.2.14 Untersuchung der Motorkoordination adulter Mäuse.

Im Rotarod-Test wurde die Koordinations- sowie Balance-Fähigkeit von Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA- (schwarz) und Kontroll-Geschwistertieren (weiß) in drei Durchläufen des zweiten Versuchstages (Trials on day 2) untersucht. Die Datenpunkte markieren die mittlere Zeit (\pm SEM), die die Tiere auf der sich drehenden Versuchapparatur verblieben. *: $p < 0,05$.

4.2.4.2 Der Gehalt an Neurotransmittern und deren Metaboliten ist in doppelt-transgenen Mäusen verändert

In den untersuchten Gehirnstrukturen wurden die stärksten neurochemischen Effekte im frontalen Cortex, dem ventralen Striatum und der Amygdala gefunden. Der Gehalt von Neurotransmittern und deren Metaboliten des Hippocampus und des Cerebellums war zwischen den untersuchten Gruppen vergleichbar. Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere zeigten signifikant höhere Konzentrationen für Acetylcholin (Transgene: $7,3 \pm 0,5$ pmol/mg; Kontrollen: $5,6 \pm 0,5$ pmol/mg; $p = 0,04$), Serotonin (Transgene: $214 \pm 26,1$ pmol/mg, Kontrollen: $148,4 \pm 14,3$ pmol/mg, $p = 0,044$) und den Serotonin-Metaboliten 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) (Transgene: $96,4 \pm 12,8$ pmol/mg; Kontrollen: $58,5 \pm 5,9$ pmol/mg; $p = 0,02$) im frontalen Cortex.

Im ventralen Striatum doppelt transgener Tiere war die Konzentration der Dopamin-Metabolite Homovanillinmandelsäure (HVA) (Transgene: $830,5 \pm 68,8$ pmol/mg; Kontrollen: 604 ± 38 pmol/mg, $p = 0,013$) und 3-Methoxytyramin (3-MT) (Transgene: $593,9 \pm 58,4$ pmol/mg; Kontrollen: $418,6 \pm 38,8$ pmol/mg; $p = 0,026$) erhöht.

Im Gegensatz dazu zeigten Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere reduzierte Dopamin- (Transgene: $480,4 \pm 31,6$ pmol/mg; Kontrollen: $586,6 \pm 38,6$ pmol/mg; $p = 0,054$), Dihydroxyphenyl-essigsäure- (DOPAC) (Transgene: $111,2 \pm 6,5$ pmol/mg; Kontrollen: $135,8 \pm 10,5$ pmol/mg; $p = 0,069$) und HVA-Konzentrationen (Transgene: $161,3 \pm 15,6$ pmol/mg; Kontrollen: $214,4 \pm 20,4$ pmol/mg; $p = 0,061$) in der Amygdala, die jedoch nicht über der Signifikanzgrenze lagen. Diese

Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression von Cx43 in adulten Neuronen des frontalen Cortex, des ventralen Striatums und der Amygdala den normalen Gehalt an Neurotransmittern und Metaboliten verändert.

4.2.5 Untersuchung der Epilepsie-Anfälligkeit transgener Tiere

In der Vergangenheit wurde der Einfluss von Connexin-Proteinen auf einen epileptischen Phänotyp diskutiert (Carlen et al., 2000; Naus et al., 1991). Um zu überprüfen, ob die transgene Expression des Cx43-Proteins in adulten Neuronen eine synchrone elektrische Reizweiterleitung und damit Epilepsie begünstigt, wurden sechs bis acht Wochen alte, männliche Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA- sowie gleichaltige Kontrollgeschwistertiere mit dem Parasympathikomimetikum Pilocarpin behandelt und so epileptische Anfälle ausgelöst. Die Stärke und Anzahl der Anfälle wurde quantifiziert und histologische Veränderungen am Hippocampus untersucht.

4.2.5.1 Adulte Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere zeigen eine erhöhte Epilepsie-Anfälligkeit

Während der 140-minütigen Beobachtungszeit im Anschluss an die Pilocarpin-Injektion wurde die Anzahl und Stärke der epileptischen Anfälle in 10-Minuten-Intervallen untersucht (Abb. 4.2.15). Beide Gruppen zeigten im gesamten Beobachtungszeitraum eine ähnliche Anzahl der Epilepsiestadien 1-5, wobei Anfälle des Stadiums 4,5 am häufigsten auftraten (Transgene: $6,3 \pm 1,3$ Anfälle, $n = 12$; Kontrollen: $5,3 \pm 1,3$ Anfälle, $n = 18$; $p = 0,3$). In Bezug auf die Häufigkeit der stärksten Anfälle (Stadium 6) wurde bei doppelt-transgenen Tieren im Vergleich zu Kontroll-Geschwistertieren eine signifikant erhöhte Anzahl dieser Reaktionen gemessen (Transgene: $3,1 \pm 0,9$ Anfälle; Kontrollen: $0,9 \pm 0,4$ Anfälle, $p = 0,02$). Die Auftragung der mittleren Anfallsstärke gegen die Zeit nach Pilocarpin-Injektion ergab, dass Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere stärkere epileptische Anfälle erlitten als ihre Geschwistertiere. Die Analyse zeigte, dass beide Gruppen die maximale mittlere Anfallsschwere nach 30 bis 40 Minuten erreichten, wobei doppelt-transgene Mäuse 40 ($p = 0,044$), 50 ($p = 0,009$), 70 ($p = 0,017$), 80 ($p = 0,003$) und 120 Minuten ($p = 0,003$) nach Pilocarpin-Behandlung signifikant stärkere epileptische Anfälle aufwiesen.

Ebenfalls wurde eine erhöhte Mortalität der Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA- im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt: Nach der Injektion von 250 mg/kg Pilocarpin verstarben 3 von 12 doppelt transgenen Tieren (25%) innerhalb der ersten 60 Minuten nach Beginn des Experiments, jedoch keines von 18 Kontrolltieren.

Diese Ergebnisse zeigen somit, dass die Expression von Cx43 in Neuronen adulter Mäuse zu verstärkter Pilocarpin-abhängiger, epileptiformer Aktivität führen kann.

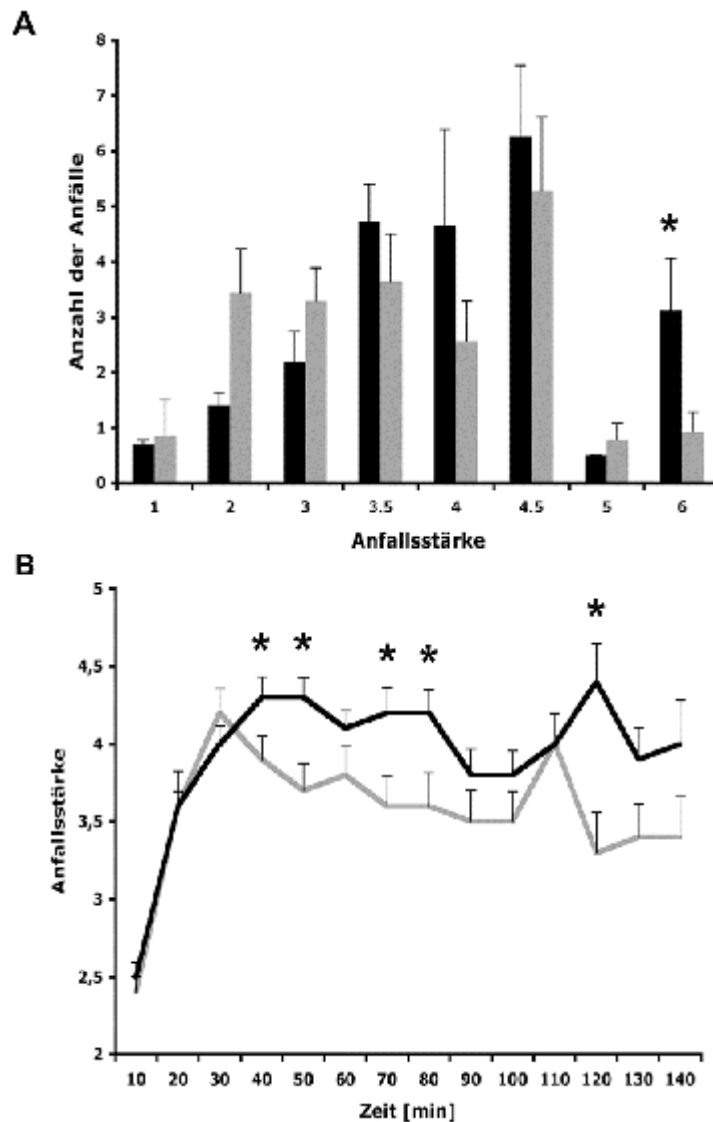


Abb. 4.2.15 Untersuchung der Epilepsie-Neigung.

A Nach der Injektion von 250 mg/kg Pilocarpin wurde die Häufigkeit epileptischer Anfälle der Stadien 1 bis 6 an doppelt-transgenen Mäusen (schwarz) und Kontrolltieren (grau) untersucht. **B** Die zeitliche Entwicklung der Anfallsschwere von Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA- und Kontrolltieren wurde in 10-Minuten-Intervallen bestimmt. *: $p > 0,05$.

4.2.5.2 Die Histologie des Hippocampus epileptischer, doppelt-transgener Tiere ist verändert

Vier Wochen nach der Injektion des Pilocarpins wurden die Tiere beider Gruppen präpariert, um auch histologisch Aussagen über die Anfallsstärke treffen zu können. Dazu wurde eine qualitative Abschätzung des Moosfaser-Wachstums, der Körnerzell-Dispersion und des neuronalen Zellverlusts im Hippocampus durchgeführt.

In acht von 10 untersuchten $Cx43^{TetOeGFP}:$ CaMKII α -tTA- und 4 von 13 untersuchten Kontrolltieren wurde mit Hilfe der Timm-Färbung eine verstärkte Moosfaser-Sprossung im Gyrus dentatus des Hippocampus festgestellt. Dabei fiel die Färbung in doppelt-transgenen Tieren intensiver aus, als in den Kontrollen (Abb. 4.2.16). Im Gegensatz dazu wurden keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen in Bezug auf weitere beschriebene Epilepsie-assoziierte, histologische Veränderungen wie Körnerzell-Dispersion oder neuronalen Zellverlust gefunden. Neun von 10 Transgenen bzw. 10 von 13 Kontrollen zeigten eine Verbreiterung der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, nur jeweils zwei Tiere jeder Gruppe wiesen einen Verlust von Neuronen in der CA3-Region des Hippocampus auf (Abb. 4.2.16 A, B), der in unbehandelten Tieren nicht beobachtet wurde (nicht gezeigt).

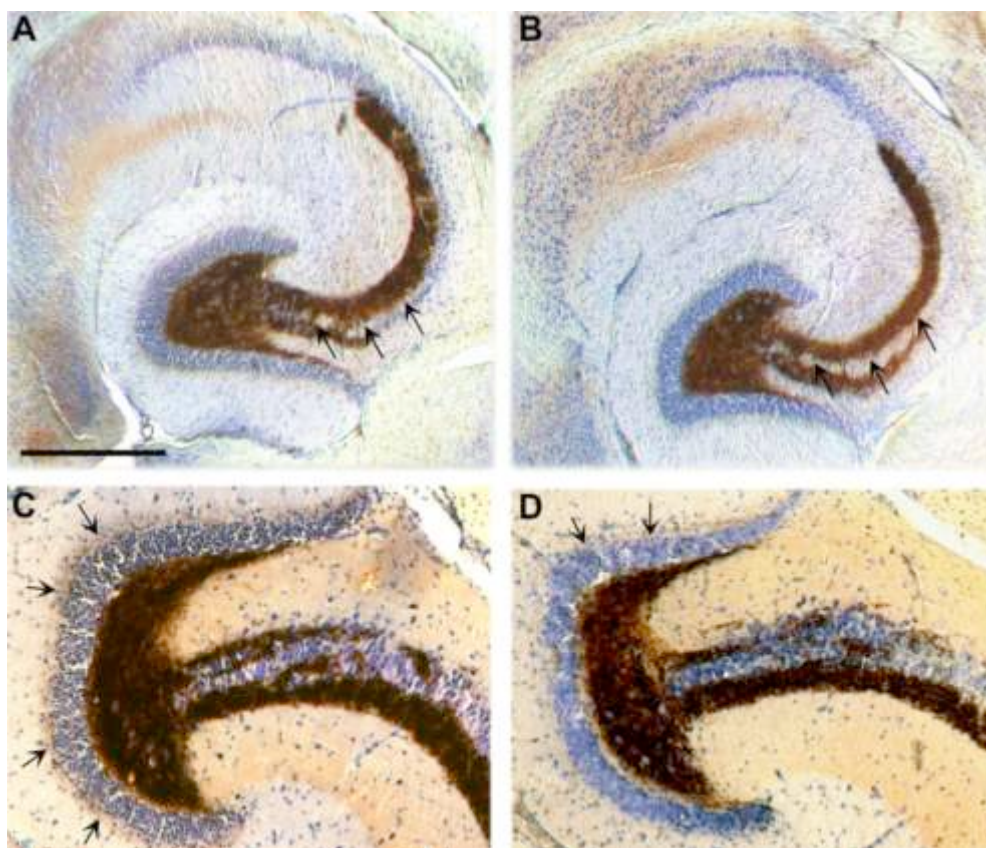


Abb. 4.2.16 Histologische Untersuchung des Hippocampus epileptischer Mäuse.

Vier Wochen nach Pilocarpin-Behandlung wurden $Cx43^{TetOeGFP}:$ CaMKII α -tTA- (A, C) und Kontrolltiere (B, D) präpariert, horizontale Schnitte des Gehirns angefertigt und Moosfasern bzw. Zellkerne durch Timm- bzw. Toluidin-Blau-Färbung dargestellt. Pfeile in A und B weisen auf den neuronalen Zellverlust in der CA3-Region des Hippocampus, Pfeile in C und D auf die unterschiedliche Intensität der Moosfaser-Sprossung am Gyrus dentatus. Größenbalken für A, B: 250 μ m; für C, D: 50 μ m.

Genauere Analysen zeigten weiterhin, dass sowohl in unbehandelten als auch Pilocarpin-induzierten $Cx43^{TetOeGFP}:$ CaMKII α -tTA-Tieren histologische Veränderungen der CA2-Region des Hippocampus auftraten. In Kontrolltieren waren die Neurone dieser Region als dicht gepacktes Band zu erkennen. $Cx43^{TetOeGFP}:$ CaMKII α -tTA-Tiere wiesen jedoch in 70% der Fälle

einen lockeren Zellverband mit größeren interzellulären Abständen sowie einzelne, oberhalb des Stratum pyramidale liegende Neurone auf (Abb. 4.2.17).

Die neuronale Expression von Cx43 von der Geburt bis zum Adultstadium scheint somit nicht nur die Epilepsie-Anfälligkeit zu erhöhen, sondern auch die zelluläre Organisation des Hippocampus zu beeinflussen.

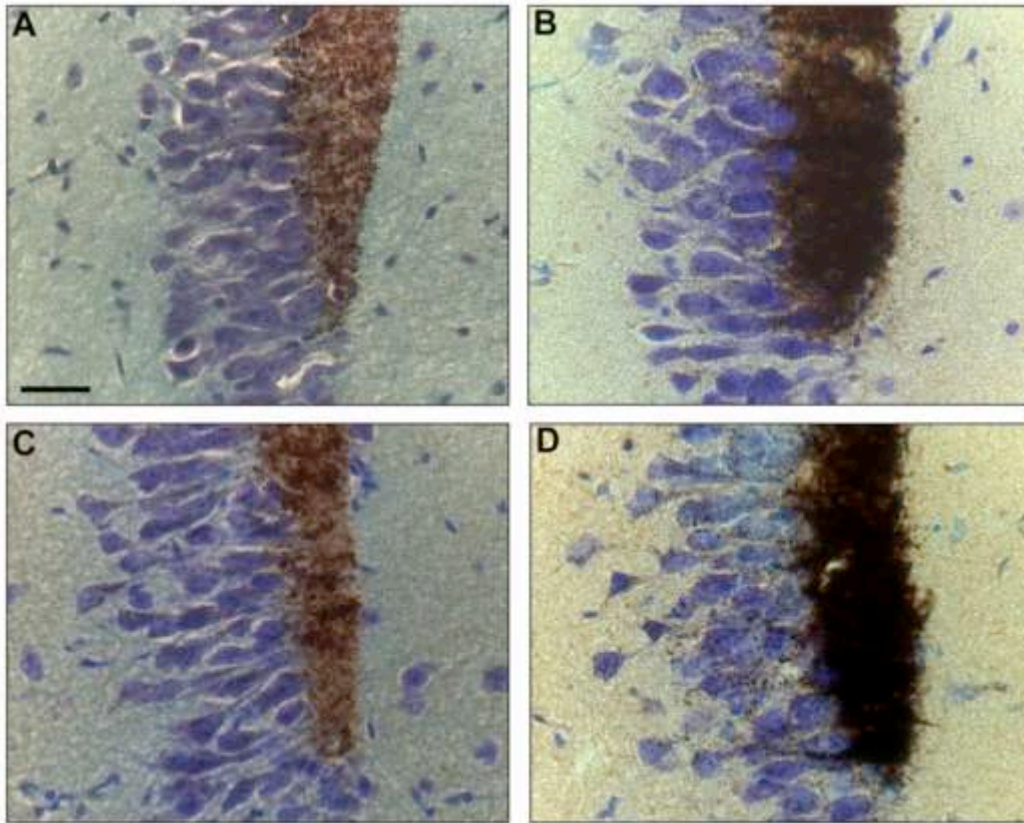


Abb. 4.2.17 Untersuchung der CA2-Region epileptischer und nicht mit Pilocarpin behandelter Mäuse.

Kryoschnitte unbehandelter, nicht-epileptischer Kontroll- (A) und Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere (C) sowie Pilocarpin-induzierter Kontrollen (B) und doppelt-transgener Mäuse (D) wurden Timm- und Toluidin-Blau gefärbt. Sowohl unbehandelte als auch behandelte Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere (C, D) zeigten einen im Vergleich zu den Kontrollen (A, B) aufgelockerteren neuronalen Zellverband. Größenbalken: 20 μ m.

4.3 Herstellung und Analyse von Mausmutanten mit zelltypspezifischem Ersatz von Cx45 durch die kodierende Region von Cx36

4.3.1 Klonierung des konditionalen „Knock-in“ Vektors pCx45KICx36-IRES lacZ

Zur Untersuchungen der funktionellen Bedeutung des Austausches von Connexin45 (Cx45) durch Connexin36 (Cx36) Gap Junction-Kanäle in unterschiedlichen Zelltypen wurde ein Plasmid konstruiert, dass einen durch die Cre-Rekombinase vermittelten „Knock-in“ der Cx36 kodierenden Region in den Cx45-Locus ermöglichte. Der Austauschvektor pCx45KI36-IRES-lacZ wurde in insgesamt 12 Einzelschritten aus verschiedenen Ausgangsvektoren kloniert. Eine Karte des Vektors befindet sich im Anhang (A.1).

Schritt 1 (pCx36kurz): Um die Größe des Zielvektors pCx45KI36-IRES-lacZ zu reduzieren, wurde zunächst die kodierende Region des Cx36-Gens von der Intronsequenz befreit. Dazu wurde der Vektor pmCx36 (Söhl, 1999) mit den Enzymen PmlI und SalI gespalten und auf diese Weise die 5'UTR, Exon1 und das Intron entfernt. Die überhängenden DNA-Enden wurden aufgefüllt und der Vektor religiert.

Schritt 2 (pCx36cDNA): Um eine spätere, optimale Transkription des Cx36-Gens unter der Kontrolle des Cx45-Promotors zu erlauben, wurde ein 260 bp großes Fragment mit der Cx45-spezifischen kodierenden Sequenz des Spleißakzeptors und der Kozak-Konsensussequenz sowie Cx36Exon1 mit Hilfe des Startermoleküle NheIEcoRVforw. und Cx36Exon1rev. aus dem Vektor pCodE3 (Brune, 2000) amplifiziert. Der verkürzte Vektor pCx36kurz wurde über die Enzyme NheI und PmlI geöffnet und mit dem PCR-Fragment, das mit denselben Enzymen geschnitten wurde, ligiert.

Schritt 3 (pHWlox1-Cx36): Der Vektor pHWlox1 (Magin et al., 1992), der eine von zwei loxP-Sequenzen flankierte HPRT-Selektionskassette enthielt, wurde über eine EcoRI-Spaltung von der HPRT-Sequenz befreit und religiert. Der verkürzte Vektor wurde mit Hilfe des Enzyms SmaI geöffnet und ein EcoRV/SmaI-Fragment aus pCx36cDNA, das die Sequenz des Cx45-Spleißakzeptors, der Kozak-Konsensussequenz und des Cx36Exon1 enthielt, ligiert. Der Übergang der Leseraster der Cx45-Sequenzen auf das Cx36-Leseraster wurde zur Kontrolle sequenziert (Agowa).

Schritt 4 (pBlueskript-5'HR): Der 4,3 kb 5'-Homologiebereich von Cx45 wurde durch eine XbaI/ClaI-Spaltung und Auffüllen der DNA-Enden aus dem Vektor pX5000 (Kirchhoff, 1999) gewonnen und in den über XbaI geöffneten und aufgefüllten Vektor pBlueskript (Stratagene) kloniert.

Schritt 5 (pBlueskript-5'HR-3'HR): Der Vektor pCodE3 (Brune, 2000) wurde durch EagI gespalten, der 1,5 kb große 3'-Homologiebereich von Cx45 eluiert und die überstehenden DNA-Enden aufgefüllt. Dieses Fragment wurde im Anschluss in die aufgefüllte XhoI-Schnittstelle des Vektors pBlueskript-5'HR kloniert.

Schritt 6 (pCx45HR-IRES-lacZ): Aus dem Plasmid pTetOCMV-Cx43-IRES-lacZ-Isolator (Döring, 2000) wurde ein 4,7 kb IRES-lacZ-Fragment durch eine XbaI sowie eine partielle EcoRI-Spaltung ausgeschnitten. Die überhängenden Enden dieser Sequenz wurden aufgefüllt und das Fragment in die EcoRV-Schnittstelle des Vektors pBlueskript-5'HR-3'HR kloniert.

Schritt 7 (pSV40-6pA): Um einen Vektor mit sechsfachem SV40-poly(A)-Signal zu erzeugen, der eine Durchleseaktivität der Polymerase im Zielvektor pCx45KI36-IRES-lacZ verhindern sollte, wurde das Plasmid pSV40p(A) (D. Eckardt, 1999) über das Enzym Sall geöffnet und die Vektorenden aufgefüllt und dephosphoryliert. Im zweiten Schritt wurden die beiden poly(A)-Sequenzen des Vektors pSV40p(A) durch eine EcoRI/HincII-Spaltung ausgeschnitten und die DNA-Enden aufgefüllt. Dieses Fragment wurde in die geöffnete Sall-Schnittstelle von pSV40p(A) kloniert. Der auf diese Weise entstandene Vektor enthielt vier SV40poly(A)-Sequenzen. Durch Wiederholung der oben genannten Schritte wurde der Vektor pSV40-6p(A) erzeugt.

Schritt 8 (pE3-SV40-6pA): Zunächst wurde der Vektor pSV40-6p(A) durch das Enzym SmaI geöffnet und dephosphoryliert. In diese Schnittstelle wurde anschließend ein 2,1 kb BanI/EagI-Fragment des Cx45Exon3 aus dem Plasmid pCodE3 (Brune, 2000) kloniert.

Schritt 9 (pE3-SV40-6p(A)-PGKneo): Für eine spätere Selektion der mit dem Zielvektor pCx45KI36-IRES-lacZ transfizierten embryonalen Stammzellen wurde eine von f_{rt}-Stellen umgebene, PGK-Promotor-gesteuerte Neomycin-Resistenz-Kassette (PGKneo) durch eine Sall-Spaltung aus dem Plasmid pM30 (Meyers et al., 1998) isoliert. Dieses Fragment wurde in den über Sall geöffneten Vektor pE3-SV40-6p(A) kloniert. Dabei wurde die Selektionskassette entgegen der Leserichtung hinter den poly(A)-Sequenzen eingebracht.

Schritt 10 (pE3flox-PGKneofrt-Cx36): Aus dem Vektor pE3-SV40-6p(A)-PGKneo wurde über eine NotI/HincII-Spaltung ein 4,5 kb Fragment gewonnen, das die Sequenzen des Cx45Exon3, der sechsfachen poly(A)-Stelle und der geflirteten PGKneo-Selektionskassette enthielt. Dieses Fragment wurde in die aufgefüllte EcoRI-Schnittstelle zwischen die loxP-Stellen des Vektors pHWlox1-Cx36 kloniert.

Schritt 11 (pE3(+)flox-PGKneofrt-Cx36): Aus dem Vektor pX5000 (Kirchhoff, 1999) wurde ein weiteres, bisher nicht kloniertes 674 bp großes Fragment des 5'-Homologiebereiches durch eine ClaI/BmrI-Spaltung isoliert. Dieses Fragment wurde anschließend in die aufgefüllte NotI-Schnittstelle des Vektors pE3flox-PGKneofrt-Cx36 kloniert.

Schritt 12 (pCx45KI36-IRES-lacZ): Im letzten Schritt wurde ein 6,52 kb Ecl136II/Acc65I-Fragment des Vektors pE3(+)flox-PGKneofrt-Cx36 isoliert und in das über SmaI geöffnete Plasmid pCx45HR-IRES-lacZ kloniert. Abschließende Kontrollspaltungen mit verschiedenen Restriktionsenzymen, die Überprüfung der Funktionalität der frt- und loxP-Sequenzen durch Transfektion des Vektors in Cre- bzw. FLP-exprimierende *E. coli*-Bakterien sowie weitere Sequenzierungen bestätigten die Richtigkeit des klonierten Austauschvektors.

4.3.2 Klonierung des HeLa-Testvektors pCMVCx36-IRES-lacZ

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der bicistronischen mRNA aus der Cx36-kodierenden Region und dem lacZ-Reportergen wurde der Testvektor pCMVCx36-IRES-lacZ zur transienten Transfektion von HeLa-Zellen konstruiert (siehe Anhang A.2). Hierfür wurde zunächst der Vektor pMJ-Green (Degen, 2004) über eine NheI/NotI-Spaltung geöffnet und anschließend dephosphoryliert. Anschließend wurde ein 1,3 kb NheI/NotI-Fragment aus pCx36cDNA in den geöffneten Vektor pMJ-Green kloniert (pCMVCx36). In einem weiteren Schritt wurde der Vektor pIRES (Clontech) über eine SmaI-Spaltung geöffnet und mit einem 4,3 kb großen HindIII/XhoI-lacZ-Fragment aus dem Vektor placZ (B. Teubner, unveröffentlicht) ligiert (pIRES-lacZ). Durch die Ligation des NheI/NotI-Fragments aus pIRES-lacZ mit dem über NotI geöffneten Vektor pCMVCx36 entstand der HeLa-Testvektor pCMVCx36-IRES-lacZ.

Der Expressionsvektor pMJ-Green enthält einen „Human Cytomegalovirus (CMV) Immediate Early“ Promotor vor dem eGFP-Gen, der in diesem Fall für die Expression des Cx36-IRES-lacZ-Konstrukts in HeLa-Zellen benutzt wurde. HeLa Wildtyp-Zellen wurden wie in Abschnitt 3.6.2.3 beschrieben mit dem Vektor pCMVCx36-IRES-lacZ transient transfiziert. Als Positivkontrolle diente die Transfektion mit dem Vektor pSV- β -Galaktosidase, als Negativkontrolle eine Transfektion mit dem Vektor pBlueskriptSKII(+). Zwei Tage nach der Transfektion wurden die HeLa-Zellen einer X-Gal-Färbung unterzogen und unter einem Mikroskop bei Expression der β -Galaktosidase untersucht. Sowohl bei HeLa-Zellen, transfiziert mit dem Testvektor pCMVCx36-IRES-lacZ bzw. mit dem Kontrollvektor pSV- β -Galaktosidase, wurden lacZ-positive Zellkerne gefunden (Abb. 4.3.1). Dies belegte die Expression des lacZ-Reportergens in beiden Konstrukten. In Zellkulturen, die mit dem Vektor pBlueskriptSKII(+) transfiziert wurden, konnten keine blauen Zellkerne nachgewiesen werden.

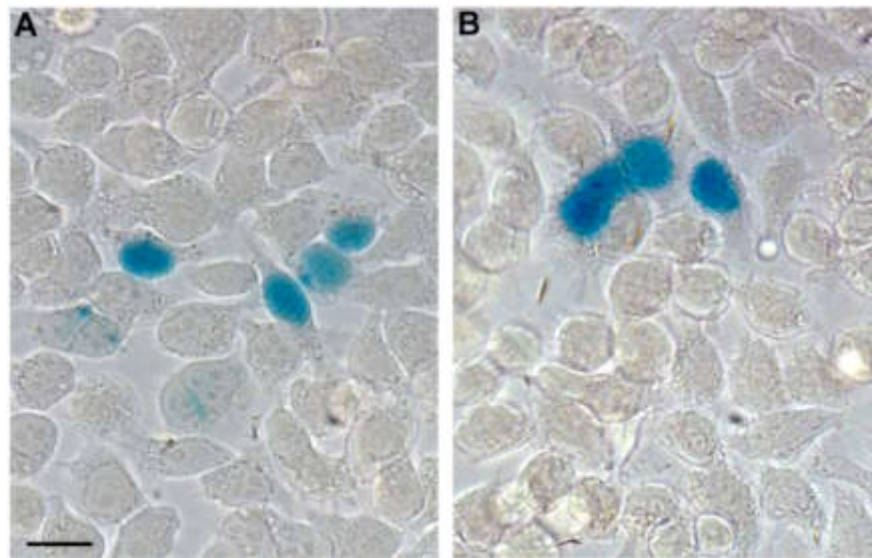


Abb. 4.3.1 Überprüfung der Transkription des lacZ-Reportergens in transfizierten HeLa-Zellen.

Sowohl HeLa-Zellen, die transient mit dem Testvektor pCMVCx36-IRES-lacZ (A) transfiziert wurden, als auch Transfektanten, die das Kontrollplasmid pSV-β-Galaktosidase enthielten, zeigten nach X-Gal-Färbung eine kernständige Expression des lacZ-Reportergens. Größenbalken: 10 µm.

4.3.3 Erzeugung und Analyse homolog rekombinierter Maus ES-Zellen

Nach Elektroporation von Maus Sv129P2/OlaHsd HM1-ES-Zellen (siehe 3.6.1.4) mit dem durch NotI linearisierten Austauschvektor pCx45KICx36-IRES-lacZ wurden die Zellen in G418-haltigem Medium selektioniert. Es konnten 448 Klone transfizierter embryonaler Stammzellen isoliert werden, von denen 375 mittels PCR und Southern Blot Analyse auf die homologe Rekombination des mutierten Cx45-Allels untersucht wurden (Abb. 4.3.2). Bei 7 Zellklonen wurde durch das Auftreten des 600 bp großen Amplikons und durch Southern Blot Hybridisierungen mit externen und internen Sonden eine homologe Rekombination nachgewiesen. Die Rekombination des 5'-Homologiebereichs wurde unter Verwendung einer 5' vom Austauschvektor gelegenen Sonde (900 bp ApaI/EcoRI-Fragment aus pX5000) bestätigt (Abb. 4.12). Dabei zeigten alle 7 Zellklone - bei Verwendung von XbaI-gespaltener genomischer DNA - eine 5,9 kb (Wildtyp) und eine 5,0 kb (mutiertes Allel) Bande. Eine korrekte 3'-Homologie wurde durch eine Sonde nachgewiesen, die 3' vom Austauschvektor an XbaI-gespaltene genomische DNA hybridisierte (1,4 kb EagI/Asp718-Fragment aus pCodE3) und in einer Wildtypbande von 1,6 kb und einer knock-in-Bande von 10,6 kb resultierte. Um Mehrfachintegrationen des Vektors außerhalb des Cx45-Lokus ausschließen zu können, wurde die XbaI-gespaltene genomische DNA der ES-Zellklone zusätzlich einer Southern-Blot Analyse mit einer internen Cx36-spezifischen Sonde (400 bp XbaI/BbrPI-Fragment aus pmCx36) unterzogen. Keiner der 7 Klone zeigte zusätzliche Banden, die auf eine weitere Insertion des Vektors an einer anderen Stelle des Genoms hinweisen würden (Daten nicht gezeigt).

4.3.4 Erzeugung und Analyse von transgenen Cx45KI36-Mäusen

Nach Überprüfung der ES-Zellklone hinsichtlich homologer Rekombination wurden aus den Klonen 92, 253 und 357, die die beste Morphologie in Form der Erhaltung des undifferenzierten Erscheinungsbildes aufwiesen, mittels Blastozysteninjektion zunächst chimäre Mäuse erzeugt, aus denen schließlich die transgene Mauslinie Cx45KI36 etabliert und resultierende Tiere für Versuchszwecke eingesetzt wurden.

4.3.4.1 Erzeugung von chimären Tieren mittels Blastozysteninjektion homolog rekombinierter ES-Zellen

Im Zeitraum der vorliegenden Arbeit wurden von Ina Fibich drei Reihen von Blastozysteninjektionen mit den genannten homolog rekombinierten HM1 Zellklonen 92, 253 und 357 durchgeführt. Dazu wurde jeder Zellklon je drei Tage pro Woche injiziert. Aus der ersten Reihe (Klon 92) kam es zu drei überlebenden Chimären (zwei Männchen, ein Weibchen), aus der zweiten Reihe (Klon 357) zu keinen überlebenden Nachkommen und aus der dritten Injektionswoche zur Geburt von 17 Chimären (12 Männchen, fünf Weibchen). Die 20 überlebenden chimären Nachkommen aus Sv129P2/OlaHsd HM1-ES-Zellen und C57BL/6 Blastozysten zeigten einen Fellfarben-Chimärismus zwischen 50 und 100%. Nach Erreichen der Geschlechtsreife wurden die Tiere mit C57BL/6 Mäusen verpaart. Fünf Männchen (eins aus Klon 92, vier aus Klon 253) waren fertil und zeigten eine Keimbahntransmission des Cx45KI36-Allels in 50% ihrer Nachkommen. Keimbahntransmission lag dann vor, wenn Nachkommen einer Chimäre ein agouti-farbenes Fell besaßen.

4.3.4.2 Überprüfung transgener Mäuse durch PCR-, Southern Blot-, RT-PCR- und Immunpräzipitations-Analytik

Heterozygote Cx45KI36-Tiere wurden zunächst bis zur dritten Rückkreuzungsebene mit C57BL/6-Tieren verpaart, um einen genomischen C57BL/6-Stammhintergrund von mindestens 93,7% zu erreichen. Durch Verpaarung heterozygoter Tiere, die die von *frt*-Stellen umgebene Neomycin-Selektionskassette innerhalb des mutierten Cx45-Allels enthielten (Cx45KI36^{fl, neo/+}), mit deleter-Flp-Mäusen (Rodríguez et al., 2000), wurde die Deletion des Selektionsmarkers aus dem Genom der Tiere erreicht. Die entstandenen heterozygoten Tiere wurden als Cx45KI36^{fl/+} bezeichnet. Die Kreuzung von Cx45KI36^{fl, neo/+}- und Cx45KI36^{fl/+}-Tieren mit PGK-Cre-Mäusen (Lallemand et al., 1998) erlaubte die ubiquitäre Deletion des von loxP-Stellen begrenzten Sequenzbereiches (Cx45Exon3 und PGKneo-Kassette bzw. nur Cx45Exon3) und damit den

Austausch der Cx45-kodierenden Region gegen Cx36 und das lacZ-Reportergen. Diese heterozygoten Tiere wurden als Cx45KI36^{ki/+} bezeichnet (Abb. 4.3.2 A).

Die unterschiedlichen allelen Formen des Cx45-Locus wurden mittels PCR- (Abb. 4.3.2 B, C) und Southern Bot-Analytik unterschieden (Abb. 4.3.2 D), wobei als Positivkontrollen Vektor- und HM1-DNA eingesetzt wurden. In der Cx45flox-PCR (Abb. 4.3.2 B) entstanden bei heterozygoten Tieren ein Cx45flox-Amplikon von 600 bp und ein Wildtyp-Amplikon (500 bp). In heterozygoten Cx45KI36^{ki/+}-Tieren wurde neben dem Wildtyp-Fragment ein Fragment von 650 bp amplifiziert. Der Verlust der Neomycin-Selektionskassette wurde durch die delta-Neo-PCR (Abb. 4.3.2 C) überprüft. Für diese PCR-Reaktion wurden drei Startermoleküle eingesetzt, die bei Existenz der Selektionskassette ein Fragment von 550 bp und nach erfolgreicher FLP-Rekombinase-vermittelter Deletion ein 850 bp großes Fragment amplifizierten. In Cx45KI36^{ki/+}- und Wildtyp-Tieren entstand kein Signal.

Mit Hilfe der Southern Blot-Analyse wurden die verschiedenen Allele des Cx45-Locus der Cx45KI36-Tiere überprüft (Abb. 4.3.2 D). KpnI-gespaltene genomische DNA wurde mit einer Sonde gegen einen 5' von Cx45Exon1 gelegenen Bereich hybridisiert. Dabei wurde für das Wildtyp-Allel eine Bande von 6,2 kb nachgewiesen. In Cx45KI36^{ki/+}-Tieren wurde neben der Wildtyp- auch eine 4,7 kb Knock-in-Bande nachgewiesen. Transgene Mäuse, die das Cx45KI36^{fl, neo}-Allel trugen, zeigten ein Signal bei 9,5 kb, nach Deletion der Neomycin-Kassette (Cx45KI36^{fl}-Allel) verkürzte sich dieses Fragment auf 8,1 kb.

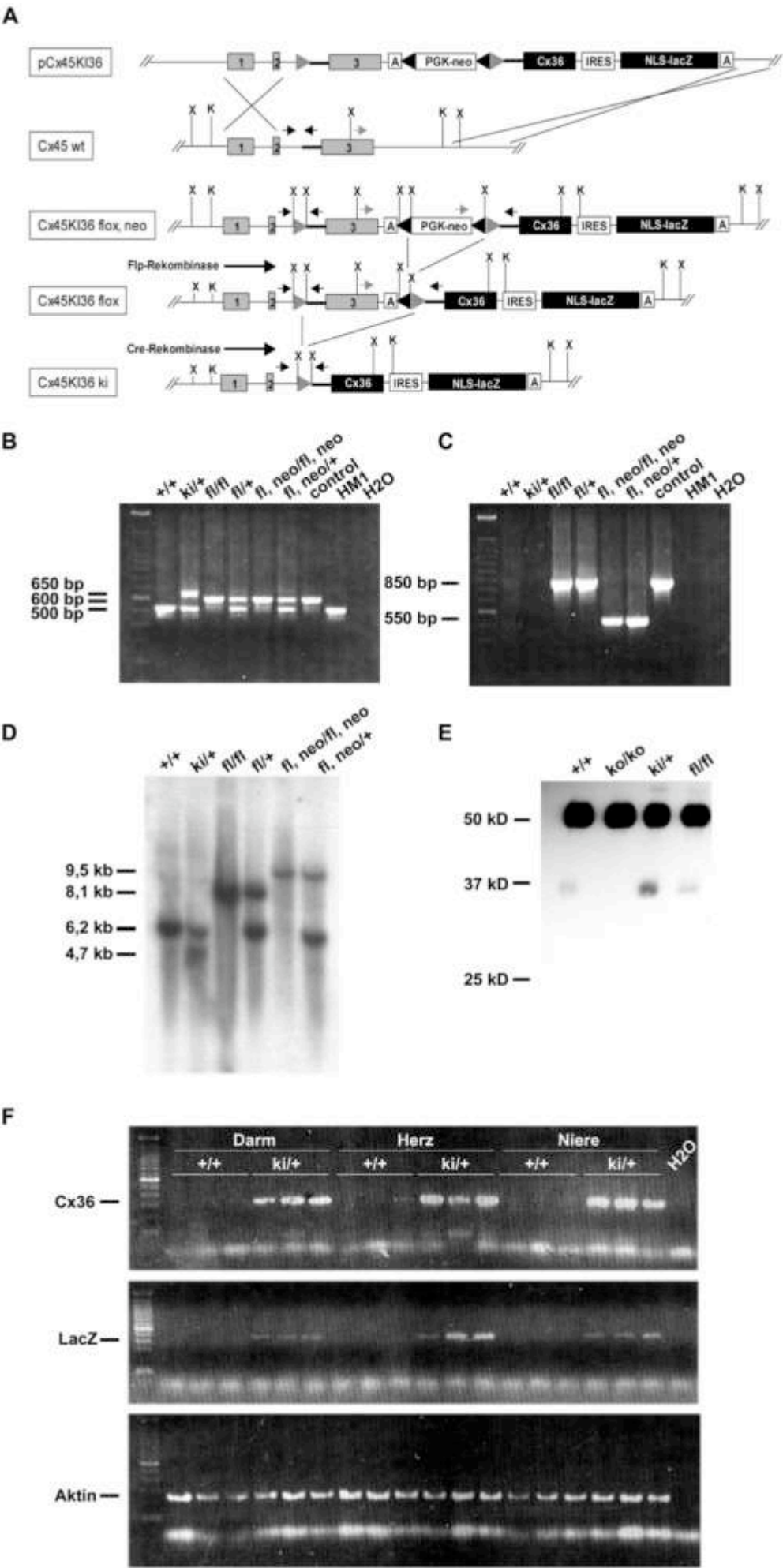
Um zu überprüfen, ob durch eine Cre-vermittelte Rekombination tatsächlich das Cx36 Gen unter der Kontrolle des Cx45-spezifischen Promotors exprimiert wird, wurden RT-PCR- und Immunpräzipitations-Analysen durchgeführt. Aus Wildtyp- und Cx45KI36^{ki/+}-Tieren wurden dazu die Organe Darm, Herz und Niere präpariert, in denen in adulten Mäusen keine Cx36-Expression nachgewiesen werden konnte (Degen, 2004). Die aus diesen Geweben isolierte mRNA wurde anschließend in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe spezifischer Startermoleküle die Translation von Cx36 und dem LacZ-Reportergen überprüft. Alle cDNA-Proben wurden durch eine β -Aktin-PCR auf die Effizienz der reversen Transkription und die mögliche Kontamination mit genomischer DNA untersucht. Abb. 4.3.2 F zeigt die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen. In allen untersuchten Geweben konnte die Expression von Cx36 und lacZ nur in Cx45KI36^{ki/+}-Tieren, nicht aber im Wildtyp oder der Wasserkontrolle nachgewiesen werden. Die Transkription der in Cx45KI36^{ki/+}-Mäusen eingebrachten Cx36-Sequenz wurde von Dr. Stephanie Urschel (Institut für Genetik, Universität Bonn) anhand von Retina-Lysaten überprüft. Das Ergebnis der Immunpräzipitations-Analyse zeigt Abb. 4.3.2 E. Im Vergleich zu Wildtyp-Retina-Lysaten wiesen Retinae von Cx45KI36^{ki/+}-Mäusen eine Intensivierung des Cx36-spezifischen Signals und damit eine verstärkte Expression des Cx36-Proteins auf. Homozygot

gefloxt Cx45KI36^{fl/fl}-Retina-Lysate zeigten eine ähnlich starke Cx36-Bande wie Lysate aus Wildtyp-Retinen. Im Gegensatz dazu konnte in Lysaten aus homozygoten Cx36KO-Tieren (Güldenagel et al., 2001) kein Cx36-Protein nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigen die korrekte Insertion, Transkription und Translation der Cx36- anstelle der Cx45-kodierenden Region in transgenen Cx45KI36-Mäusen.

Abb. 4.3.2 Überprüfung der korrekten Insertion, Transkription und Translation des Cx45KI36-Allels in transgenen Mäusen.

A Schema der homologen Rekombination des Austauschvektors pCx45KI36-IRES-lacZ mit dem Cx45-Wildtyp-Locus von HM1 ES-Zellen. Die verschiedenen allelen Formen des Cx45KI36-Transgens nach Flp- bzw. Cre-vermittelter Rekombination sind ebenfalls angegeben. **B, C** PCR-Analytik transgener Mäuse. Mit Hilfe der Cx45flox-PCR (**B**) konnten durch Startermoleküle (schwarze Pfeile), die 3' des Cx45Exon2 und in der vor dem dritten Exon des Cx45-Gens liegenden Spleißakzeptor- und Kozak-Konsensus-Region lokalisiert waren, das Cx45KI36flox- (fl/+ und fl/fl, sowie fl,neo/fl,neo und fl,neo/+, 600 bp) vom Cx45wt-Allel (+/+, 500 bp) unterschieden werden. Da die Cx45-spezifische Spleißakzeptor- und Kozak-Konsensus-Region auch vor die Cx36-kodierende Sequenz kloniert wurde, war es durch die Cx45flox-PCR ebenfalls möglich, das 650 bp große Cx45KI36ki-Allel (ki/+) nachzuweisen. Um allele Formen mit und ohne Neomycin-Resistenzkassette voneinander unterscheiden zu können, wurde die delta-Neo-PCR (**C**) etabliert. Hierbei lieferte die Analyse mit drei Primermolekülen (graue Pfeile) die Amplifikation eines 550 bp Cx45KI36flox,neo- (fl,neo/fl,neo und fl,neo/+) und eines 850 bp Cx45KI36flox-Fragments (fl/fl und fl/+). **D** Southern Blot-Analyse der verschiedenen Allele transgener Cx45KI36-Mäuse. KpnI-gespaltene genomische DNA wurde mit einer Sonde gegen einen 5' von Cx45Exon1 gelegenen Bereich hybridisiert. Das Wildtyp-Allel (+/+) lieferte eine Bande von 6,2 kb, das Cx45KI36ki-Allel (ki/+) eine Bande von 4,7 kb. Ein Signal von 9,5 kb wurde für das Cx45KI36flox,neo- (fl,neo/fl,neo und fl,neo/+) und eine Bande bei 8,1 kb für das Cx45KI36flox-Allel (fl/fl und fl/+) nachgewiesen. **E** Western Blot-Analyse des immunpräzipitierten Cx36-Proteins aus Retinen verschiedener Maus-Genotypen. Cx36-spezifische Signale wurden bei 36 kD detektiert und konnten nur in Wildtyp- (+/+), Cx45KI36^{ki/+}- (ki/+) und homozygot geflochten Cx45KI36^{fl/fl} (fl/fl)-Tieren gezeigt werden. Kein Signal wurde in Cx36KO-Gewebe (ko/ko) nachgewiesen. **F** RT-PCR-Analyse der cDNA von Darm, Herz und Niere aus jeweils drei unabhängigen Wildtyp- (+/+) und Cx45KI36^{ki/+}-Tieren (ki/+). Durch Verwendung Cx36-spezifischer, Intron-überspannender Startermoleküle wurde ein 448 bp Fragment amplifiziert. Dieses Amplikon trat nur in ki/+-Proben auf. Das schwache Signal in der dritten Wildtyp-Herz-Probe ist auf einen Übertritt der ki/+-Probe in die benachbarte Geltasche zu erklären. Die Amplifikation von LacZ-spezifischen Fragmenten wurde ebenfalls nur in cDNA-Proben von Cx45KI36^{ki/+}-Tieren nachgewiesen. Hier entstand ein Amplikon von 430 bp Größe. Mit Hilfe β -Aktin-spezifischer Primer konnte gezeigt werden, dass bei keiner der gewonnenen cDNAs eine Verunreinigung mit genomischer DNA vorlag, die zu einem zusätzlichen 330 bp Fragment neben dem erwarteten 243 bp Amplikon geführt hätte. 1,2,3: Exone 1 bis 3 des Cx45-Gens, A: Poly(A)-Sequenz, PGK-neo: Neomycin-Resistenzkassette unter Kontrolle des PGK-Promotors, Cx36: kodierende Region des Cx36-Gens, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, NLS-lacZ: LacZ-Reportergen mit Kernlokalisierungssignal, X: XbaI-Schnittstelle, K: KpnI-Schnittstelle, graue Dreiecke: loxP-Stellen, schwarze Dreiecke: frt-Stellen, Pfeile: Bindestellen der PCR-Startermoleküle.



4.3.5 Charakterisierung der Cx36- und LacZ-Expression in verschiedenen Geweben

Durch Verpaarung homozygot gefloxter Cx45KI36^{fl/fl}-Tiere mit Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle verschiedener zelltypspezifischer Promotoren exprimierten, wurde das Expressionsmuster von Cx36 und β -Galaktosidase im Gewebe überprüft und gleichzeitig Tiere zur physiologischen Untersuchung der möglichen zelltypspezifischen Ersetzbarkeit von Cx45 durch Cx36 erzeugt.

4.3.5.1 Expression in Gehirn und Retina

Im Gehirn adulter Cx45KI36^{ki/+}- (nicht gezeigt, jedoch vergleichbar mit Abb. 4.3.3 A) und Cx45KI36^{fl/fl}-Mäuse (Abb. 4.3.3 A), die mit neuronalen Vorläuferzellen-spezifischen Nestin-Cre-Tieren (Tronche et al., 1999) verpaart wurden, wurde ein ähnliches Expressionsmuster des Cx36-Gens nachgewiesen, wie bereits von Maxeiner et al. (2003) für Cx45lacZ-Mäuse beschrieben. Eine starke LacZ-Färbung konnte in Neuronen der Cortexschichten II, IV und VI, und im Thalamus beobachtet werden. Weiterhin wurde eine deutliche LacZ-Expression in Blutgefäßen von Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Cre-Tieren nachgewiesen. Im Gehirn von Cx45KI36^{fl/fl}-Mäusen, die kein Cre-Transgen exprimierten, trat bis auf einige Neurone der Cortexschicht IV keine Blaufärbung auf (Abb. 4.3.3 B). Diese Hintergrundexpression des LacZ-Reportergens wurde in allen untersuchten Cx45KI36^{fl/fl}-Tieren in variabler Stärke gefunden und hing möglicherweise mit einer postulierten Promotoraktivität der verwendeten IRES-Sequenz zusammen, die die Expression des Reportergens steuerte.

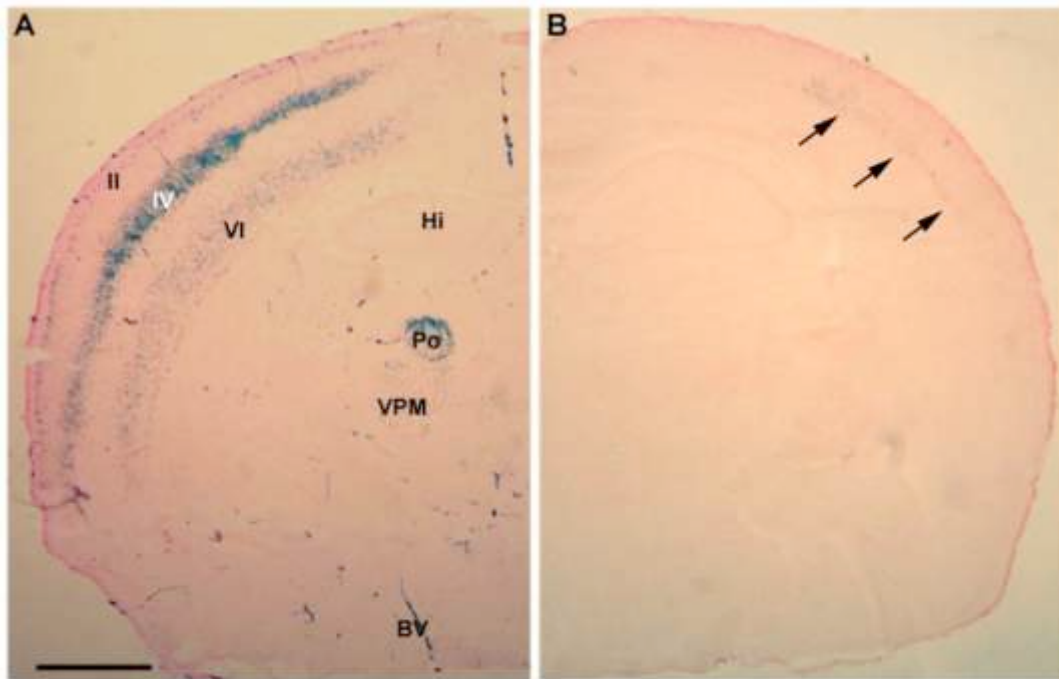


Abb. 4.3.3 Expressionsmuster des LacZ-Reportergens im Gehirn adulter Mäuse.

Die LacZ-Expression wurde an Eosin-gegentefärbten Kryoschnitte von Cx45KI36^{fl/fl};Nestin-Cre- (A) und Cx45KI36^{fl/fl}-Tieren (B) untersucht. Im Gegensatz zu der Anfärbung in Cx45KI36^{fl/fl};Nestin-Cre-Tieren zeigte das Gehirn der Cx45KI36^{fl/fl}-Kontrolltiere eine schwache Hintergrundfärbung der Schicht IV-Neurone (Pfeile). II, IV, VI: Schichten des Cortex, BV: Blutgefäße, Hi: Hippocampus, Po: posteriorer thalamischer Nucleus, VPM: ventrolateraler posteromedialer thalamischer Nucleus. Größenbalken: 1 mm.

Auch in der Retina von Cx45KI36^{ki/+}- und Cx45KI36^{fl/fl};Nestin-Cre-Mäusen wurde ein LacZ-Expressionsmuster nachgewiesen, wie es aus Cx45lacZ-Tieren bekannt war. Ähnlich der oben beschriebenen Resultate für das Gehirn konnten auch in Cx45KI36^{fl/fl}-Retinapräparaten vereinzelte LacZ-positive Zellen gezeigt werden, obwohl durch das Fehlen des Cre-Transgens keine Cre-vermittelte Rekombination stattgefunden haben konnte (Abb. 4.3.4 E-G). Immunfluoreszenz-Analysen mit Cx36-spezifischen Antikörpern wiesen die bekannte Expression des Cx36-Proteins (Söhl et al., 2005) in den Zapfen des inneren Segments (IS/OS), den Dendriten der OFF-Zapfen-Bipolarzellen der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und zwischen AII Amakrinzellen und α -Ganglienzellen der inneren plexiformen Schicht (IPL) nach (Abb. 4.3.4 A-C). Eine Verstärkung des Cx36-Antikörpersignals in Tieren mit generellem (Cx45KI36^{ki/+}) oder Nestin-Cre-vermitteltem Ersatz (Cx45KI36^{fl/fl}; Nestin-Cre) der Cx45- durch die Cx36-kodierende Region konnte nicht gezeigt werden. Da sich die Expressionsorte von Cx36 und Cx45 in der Retina überlappen (vgl. Cx45-Antikörperrnachweis in Abb. 4.3.4 D), und die endogene Expression von Cx36 relativ stark ist, wäre eine Überdeckung des zusätzlichen Cx36-Signals bei der gewählten Vergrößerung denkbar.

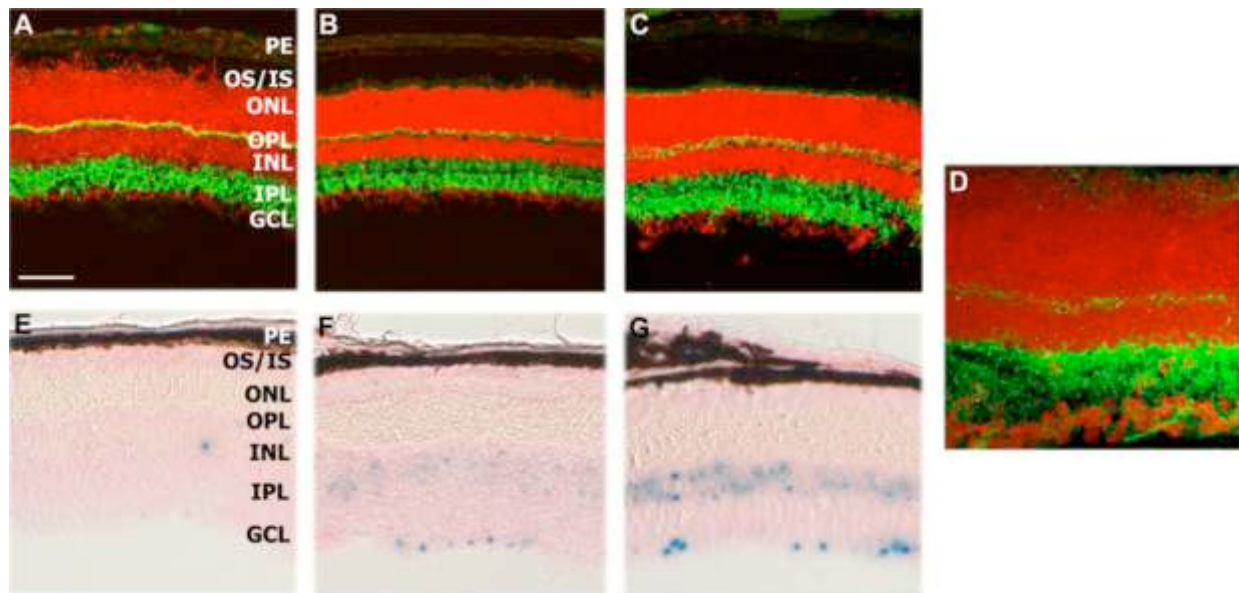


Abb. 4.3.4 Expressionsmuster des Cx36- und des LacZ-Reportergens in der Retina adulter Mäuse. A-C Immunfluoreszenz-Analyse mit Cx36-spezifischen polyklonalen Antikörpern (grün) an Propidium-Jodid-gefärbten (rot) Retina-Kryoschnitten aus Cx45KI36^{fl/fl} (A), Cx45KI36^{ki/+} (B) und Cx45KI36^{fl/fl}; Nestin-Cre-Tieren (C). D Cx45-spezifische Antikörper-Färbung (grün) einer Cx45KI36^{fl/fl}-Retina. Die Zellkerne wurden durch Propidium-Jodid angefärbt (rot). E-G Die LacZ-Expression wurde an Eosin-gegegengefärbten Retina-Kryoschnitten von Cx45KI36^{fl/fl} (E), Cx45KI36^{ki/+} (F) und Cx45KI36^{fl/fl}; Nestin-Cre-Tieren (G) überprüft. GCL: Ganglienzellschicht, INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht, IS: inneres Segment, ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, OS: äußeres Segment, PE: Pigmentepitel. Größenbalken: 100 µm.

4.3.5.2 Expression im Herz

Wie von van Veen et al. (2001) beschrieben, wird Cx45 im Reizleitenden System, d.h. im Sinusknoten, Atrioventrikularknoten und in den Hisbündeln des Herzens exprimiert und ist dort für die Weiterleitung der Aktionspotentiale zuständig. Während der Herzentwicklung spielt die Cx45-vermittelte interzelluläre Kopplung eine entscheidende Rolle; Cx45-deletierte, homozygote Cx45lacZ-Tiere sterben zwischen Tag 9,5 und 10,5 der Embryonalentwicklung (Krüger et al., 2000). Zur Untersuchung der möglichen Ersetzbarkeit von Cx45 durch Cx36 Gap Junction-Kanäle während der Herzmorphogenese und für die Impulsweiterleitung im Mausherz wurden homozygot gefloxt Cx45KI36^{fl/fl}-Tiere mit hemizygoten α MyHC-Cre-Mäusen (Agah et al., 1997) verpaart. Diese Tiere exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des alpha myosin heavy chain (α MyHC) Promotors, der eine spezifische Aktivität in Kardiomyozyten des sich entwickelnden und postnatalen Myokards aufweist (Lyons et al., 1990).

Abb. 4.3.5 zeigt die Expression des Cx36- und β -Galaktosidase-Proteins im Atrioventrikularknoten des Herzens transgener Mäuse verschiedener Genotypen. Obwohl alle untersuchten Genotypen eine LacZ-Expression zeigten, die spezifisch für das Acetylcholinesterase-positive, reizleitende System war (vgl. Abb. 4.3.5 D-G), konnte das Cx36-Protein nur in Cx45KI36^{ki/+}-

und Cx45KI36^{fl/+}: α MyHC-Cre-Mäusen nachgewiesen werden. Das Reizleitende System von Cx45KI36^{fl/fl}-Tieren hingegen zeigte keine Cx36-spezifische Antikörperreaktion. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die schon für andere Gewebe beschriebene Hintergrundexpression der β -Galaktosidase (vgl. 4.3.5.1) nicht für die Expression des Cx36-Proteins gilt, sondern nur das Reportergen betrifft.

Durch Färbungen von Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Cre-Herzen konnte nachgewiesen werden, dass auch hier ein Austausch der Cx45- gegen die Cx36-kodierende Region und das lacZ-Reportergen erfolgte (nicht gezeigt). Die Aktivität des Nestin-Promotors wurde bereits für Blutgefäße (Mokry et al., 2004) und Narbengewebe des Herzens beschrieben (Drapeau et al., 2005), nicht aber für das Reizleitende System.

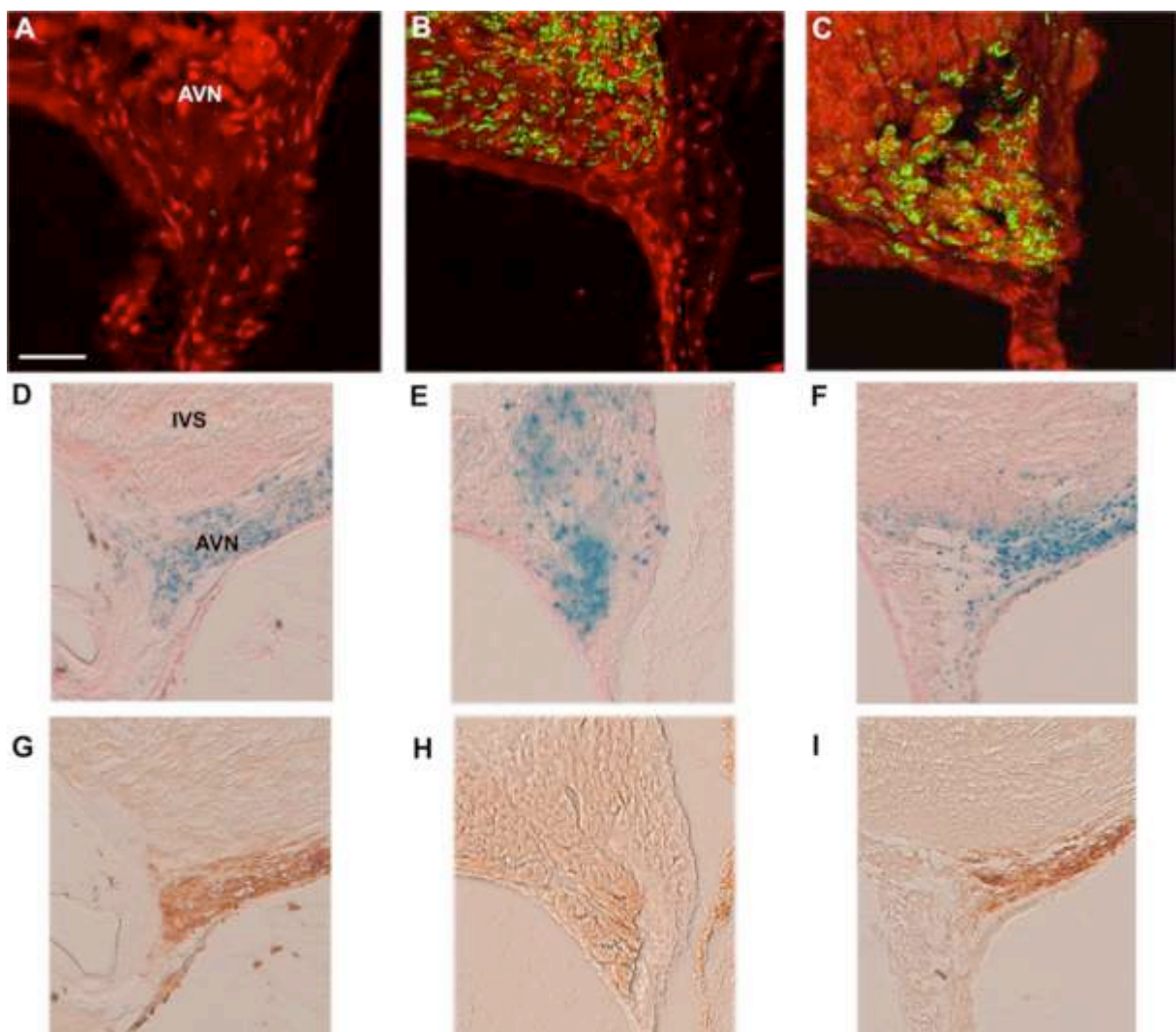


Abb. 4.3.5 Expressionsmuster des Cx36- und des LacZ-Reportergens im Atrioventrikularknoten adulter Mäuse.

A-C Immunfluoreszenz-Analyse mit Cx36-spezifischen polyklonalen Antikörpern (grün) an Propidium-Jodid-gefärbten (rot) Herz-Kryoschnitten aus Cx45KI36^{fl/fl}- (A), Cx45KI36^{ki/+}- (B) und Cx45KI36^{fl/+}: α MyHC-Cre-Mäusen (C). **D-F** Untersuchung der LacZ-Expression an Eosin-gegentefärbten Herz-Kryoschnitten derselben Cx45KI36^{fl/fl}- (D), Cx45KI36^{ki/+}- (E) und Cx45KI36^{fl/+}: α MyHC-Cre-Tiere (F). **G-I** Acetylcholin-Esterase-Färbung zur Darstellung des Reizleitenden Systems an konsekutiven Schnitten

des Herzens von Cx45KI36^{fl/fl}- (G), Cx45KI36^{ki/+}- (H) und Cx45KI36^{fl/+}: α MyHC-Cre-Tieren (I). AVN: Atrioventrikularknoten, IVS: interventrikuläres Septum. Größenbalken: 50 μ m in A-C, 100 μ m in D-I.

4.3.5.3 Expression in Niere und Darm

Um die über RT-PCR nachgewiesene Transkription des Cx36- und LacZ-Reportergens in Niere und Darm (vgl. 4.3.4) auch auf Protein-Ebene zu zeigen, wurden Kryoschnitte beider Organe angefertigt und mit Hilfe Cx36-spezifischer Antikörper und X-Gal-Färbung untersucht.

In der Niere wurde - exemplarisch für alle weiteren Organe - eine Blutgefäß-assoziierte Expression des Cx36- und β -Galaktosidase-Proteins gezeigt, die vor allem in den Glomeruli, Arteriolen und größeren Gefäßen von Cx45KI36^{ki/+}- und Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Cre-Mäusen nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.3.6). Dieses Expressionsmuster entsprach dem aus Cx45lacZ-Mäusen bekannten Cx45-Ausprägungsmuster (Krüger et al., 2000). In Cx45KI36^{fl/fl}-Tieren wurde auch in diesem Gewebe eine Hintergrundfärbung durch das LacZ-Reportergen beobachtet.

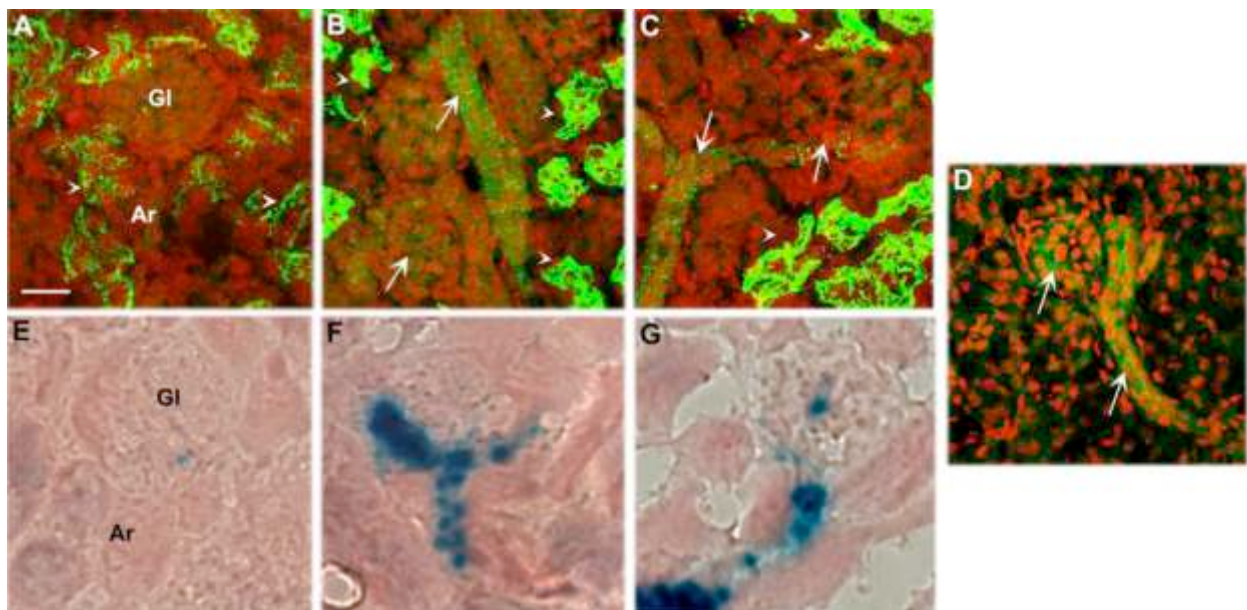


Abb. 4.3.6 Expressionsmuster des Cx36- und des LacZ-Reportergens in der Niere adulter Mäuse.

A-C Immunfluoreszenz-Analyse mit Cx36-spezifischen polyklonalen Antikörpern (grün) an Propidium-Jodid-gefärbten (rot) Nieren-Kryoschnitten von Cx45KI36^{fl/fl}- (A), Cx45KI36^{ki/+}- (B) und Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Cre-Mäusen (C). In allen untersuchten Genotypen erkannten Cx36-Antikörper unspezifische Epitope im Nierengewebe außerhalb der Glomeruli (weiße Pfeilspitzen). Spezifische Signale in den Blutgefäßen der Glomeruli und Arteriolen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet. **D** Cx45-spezifische Antikörper-Färbung (grün) eines Cx45KI36^{fl/fl}-Nierenschnittes. Die Zellkerne wurden durch Propidium-Jodid gegengefärbt (rot). Weiße Pfeile weisen auf die Expression des Cx45-Proteins im Glomerulus und der zuführenden Arteriole. Eine unspezifische Hintergrundfärbung wurde nicht beobachtet. **E-G** Untersuchung der LacZ-Expression an Eosin-gegengefärbten Nieren-Kryoschnitten derselben Cx45KI36^{fl/fl}- (E), Cx45KI36^{ki/+}- (F) und Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Tiere (G). Ar: Arteriole, Gl: Glomerulus. Größenbalken: 50 μ m.

Wie schon in Kapitel 4.1 gezeigt wurde, konnte in glatten Muskelzellen des gastrointestinalen Trakts von Mäusen nur die Expression der Connexine 43 und 45 nachgewiesen werden. Zur Untersuchungen der möglichen Ersetzbarkeit von Cx45 durch Cx36 Gap Junction-Kanäle in glatten Muskelzellen und bei der koordinierten Kontraktion im Darm wurden homozygot gefloxt Cx45KI36^{fl/fl}-Tiere mit hemizygoten SMMHC-Cre-Mäusen (Regan et al., 2000) verpaart. Diese Tiere exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) Promotors, der eine spezifische Aktivität in Glattmuskelzellen während der Entwicklung und im Adultstadium aufweist (Madsen et al., 1998). Zusätzlich wurde eine schwache Expression des SMMHC-Cre-Transgens in Kardiomyozyten des Mausherzens beschrieben (Regan et al., 2000).

Im Darm von Cx45KI36^{ki/+}- und Cx45KI36^{fl/+}:SMMHC-Cre-Mäusen konnte mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen und LacZ-Färbungen das erwartete Expressionsmuster des Cx36- und LacZ-Reportergens in glatten Muskelzellen der longitudinalen und zirkulären Muskulatur gezeigt werden (Abb. 4.3.7). Ein Nestin-Cre-vermittelter Ersatz der Cx45- durch die Cx36-kodierende Region führte zu einer Expression des Cx36-Proteins im Auerbach- und Meissner-Plexus sowie in Blutgefäßen. In Cx45KI36^{fl/fl}-Tieren konnte keine Expression des β -Galaktosidase- oder des Cx36-Proteins nachgewiesen werden.

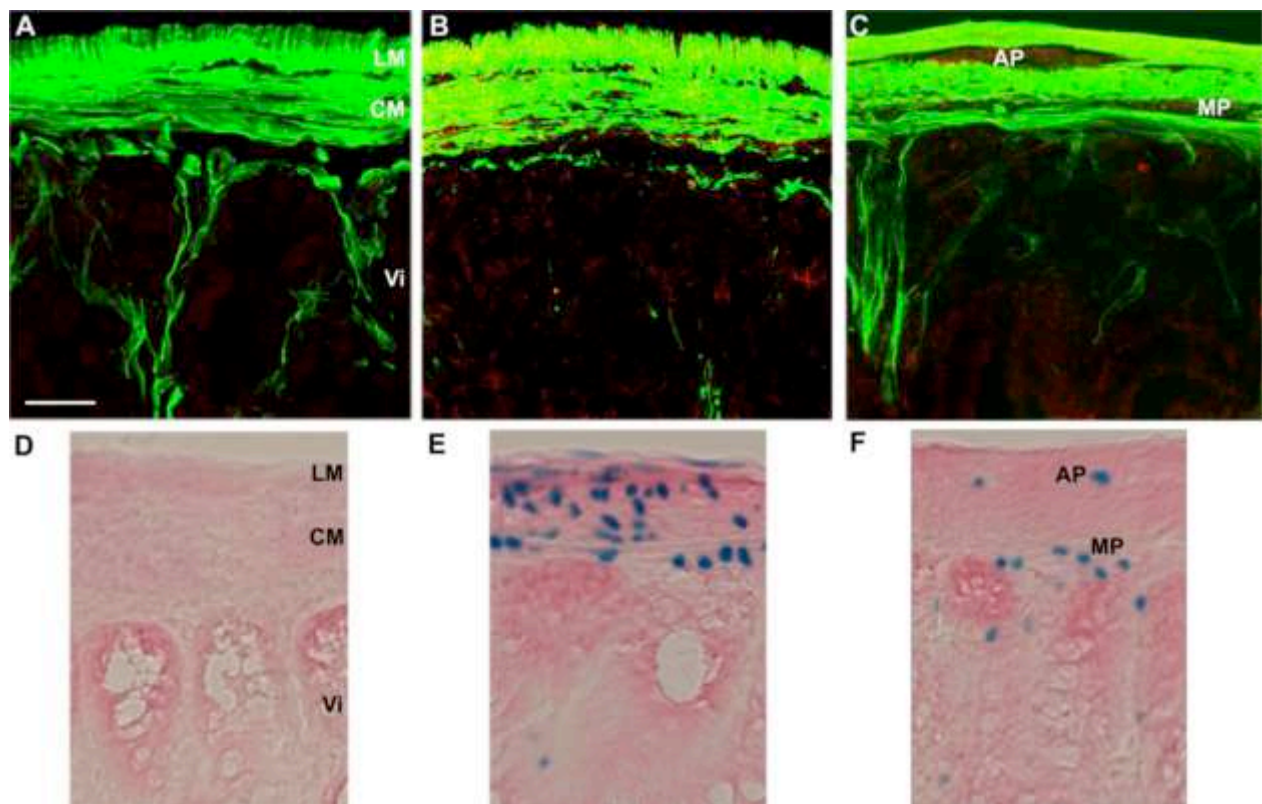


Abb. 4.3.7 Expressionsmuster des Cx36- und des LacZ-Reportergens im Darm adulter Mäuse.

A-C Immunfluoreszenz-Analyse mit Cx36-spezifischen polyklonalen Antikörpern (rot) an Darm-Kryoschnitten von Cx45KI36^{fl/fl}- (A), Cx45KI36^{fl/+}:SMMHC-Cre- (B) und Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Cre-Mäusen (C). Die glatte Muskulatur ist durch Verwendung monoklonaler SM-Aktin-Antikörper dargestellt

(grün). Die Kolo-kalisation von Cx36- und SM-Aktin-Antikörper-Signalen erscheint gelb. **D-F** X-Gal-Färbungen konsekutiver Darmschnitte von Cx45KI36^{fl/fl}- (D), Cx45KI36^{fl/+}:SMMHC-Cre- (E) und Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Cre-Tieren (F). AP: Auerbach-Plexus, CM: zirkuläre Muskulatur, LM: longitudinale Muskulatur, MP: Meissner-Plexus, Vi: Villi. Größenbalken: 100 µm für A-C, 50 µm für D-E.

4.3.6 Erste Untersuchungen zum funktionellen Ersatz von Cx45 durch Cx36

4.3.6.1 Homozygote Cx45KI36^{ki/ki}-Tiere versterben *in utero*

Durch Verpaarung heterozygoter Cx45KI36^{ki/+}-Tiere und Untersuchung des Mendelschen Verhältnisses der Genotypen der Nachkommen wurde überprüft, ob ein Ersatz von Cx45 durch Cx36 im gesamten Körper generell möglich war. Von 176 Nachkommen waren 112 (63,6%) heterozygot für das Cx45KI36-Allel und 64 (36,4%) Wildtyp. Homozygote Cx45KI36^{ki/ki}-Tiere wurden nicht geboren. In Untersuchungen von Embryonen an Tag 8,5 nach der Zeugung wurden jedoch Tiere dieses Genotyps gefunden. Von 18 präparierten Embryonen waren 5 homozygot (27,8%), 6 Wildtyp (33,3%) und 7 heterozygot (38,9%).

In weiterführenden Analysen von Stefan Maschke (2005) wurde gezeigt, dass homozygote Cx45KI36^{ki/ki}-Tiere zwischen Tag 10,5 und 11,5 der Embryonalentwicklung sterben. Damit überleben Tiere, in denen Cx45 gegen die Cx36-kodierende Region ausgetauscht wurde, einen Tag länger als Cx45-defiziente Embryonen (Krüger et al., 2000; Kumai et al., 2000). Als mögliche Ursache wird ein Herzdefekt vermutet, da in homozygoten Embryonen eine Vergrößerung des Herzens beobachtet wurde. Genauere histologische Analysen stehen jedoch noch aus.

4.3.6.2 Nestin-Cre- nicht aber SMMHC-Cre-vermittelter Ersatz von Cx45 durch Cx36 führt zu morphologischen Veränderungen des enterischen Nervensystems

Zur Erzeugung von Nachkommen mit homozygotem Austausch des Cx45-Gens gegen das Cx36-Gen in Neuronen oder Glattmuskelzellen wurden Verpaarungen von Cx45KI36^{fl/+} mit Cx45KI36^{fl/+}:Nestin-Cre- bzw. Cx45KI36^{fl/+}:SMMHC-Cre-Mäusen angesetzt.

Auswertungen der Genotypisierungen von Nachkommen aus dem angegebenen Verpaarungsschema ergaben, dass Tiere, die homozygot, heterozygot oder Wildtyp für den spezifischen Ersatz des Cx45 durch Cx36 waren, im erwarteten Mendelschen Verhältnis geboren wurden. Histologische Untersuchungen des enterischen Nervensystems von Cx45KI36^{fl/fl}- und Cx45KI36^{fl/+}:SMMHC-Cre-Mäusen durch NADPH-Diaphorase-Färbung der intestinalen Neurone zeigten keine Veränderungen in Morphologie und Verteilung (Abb. 4.3.8 A, B). Im Gegensatz dazu wurde in ersten Untersuchungen von Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Cre-Därmen eine Vergrößerung der Neurone im Auerbach- und Meissner-Plexus gefunden, deren Zahl im

Vergleich zu den anderen untersuchten Genotypen reduziert zu sein schien. Gleichzeitig wirkten enterische Neurone, deren Cx45 gegen die Cx36-kodierende Region ausgetauscht war, verästelter (Abb. 4.3.8 C). Detailliertere Analysen mit größeren Tierzahlen stehen jedoch noch aus.

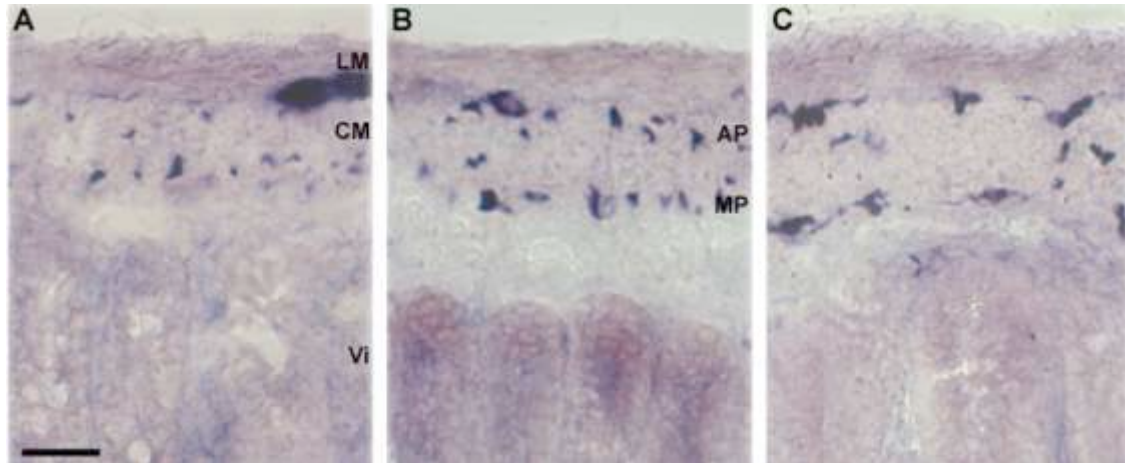


Abb. 4.3.8 Histologische Analyse der Morphologie enterischer Neurone adulter Mäuse.

Die spezifische Anfärbung enterischer Neurone (lila) wurde durch eine NADPH-Diaphorase-Reaktion an Darm-Kryoschnitten erreicht. Keine morphologischen Unterschiede wurden zwischen Neuronen des Auerbach- und Meissner-Plexus von Cx45KI36^{fl/fl} (A) und Cx45KI36^{fl/+}:SMMHC-Cre-Mäusen (B) beobachtet. Enterische Neurone von Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Cre-Tieren (C) schienen jedoch eine Reduktion der Zellzahl sowie eine Vergrößerung des Zellvolumens zu zeigen. AP: Auerbach Plexus, CM: zirkuläre Muskulatur, LM: longitudinale Muskulatur, MP: Meissner-Plexus, Vi: Villi. Größenbalken: 50 µm.

4.3.6.3 Cx36 kann möglicherweise die Cx45-vermittelte interzelluläre Kopplung in der retinalen Reizweiterleitung ersetzen

Erste ERG-Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. R. Weiler (Oldenburg) an zwei Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Cre-Mäusen zeigten, im Gegensatz zur Nestin-Cre-vermittelten Deletion von Cx45 (Maxeiner et al., 2005), keine Veränderungen der a- oder b-Welle des Elektretinogramms. Möglicherweise kann Cx36 also die Funktion von Cx45 in der Retina übernehmen. Weitere Untersuchungen zur Prüfung dieser Hypothese werden zur Zeit durchgeführt.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die zelltypspezifische Deletion bzw. Expression von Connexin43 in viszerale Glattmuskelzellen bzw. Neuronen sowie der Austausch von Connexin45 gegen Connexin36 in verschiedenen Organen untersucht.

5.1 Zelltypspezifische Inaktivierung von Connexin43 in viszerale Glattmuskelzellen des Darms

Bisher wurde die funktionelle Aufgabe von Gap Junctions in glatten Muskelzellen des gastrointestinalen Systems nur im Hinblick auf die interzelluläre Kopplung und die Weiterleitung langsamer Kontraktionswellen an Darmexplantaten untersucht. Dabei wurde durch Farbstoffinjektionen in einzelne Zellen gezeigt, dass sowohl Glattmuskelzellen der zirkulären als auch der longitudinalen Muskelschicht funktional gekoppelt sind (Kito und Suzuki, 2003; Farraway et al., 1995; Zamir und Hanani, 1990). Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Zugabe von Gap Junction-Blockern wie Octanol (Daniel et al., 1998; Farraway et al., 1995), Heptanol (Serio et al., 1991) oder Glycyrrhetinsäure (Takeda et al., 2005) sowohl die Farbstoffkopplung als auch die Amplitude und Frequenz spontaner Kontraktionen verminderte. Dabei wurde jedoch auch nachgewiesen, dass die verwendeten Kopplungshemmer verschiedene nicht-spezifische Nebenwirkungen auf Kalzium- und Kalium-Ströme zeigen und auf diese Weise die verringerte mechanische Aktivität der Darmmuskulatur auslösen können (Takeda et al., 2005; Serio et al., 1991; Daniel et al., 1998). Eine klare Unterscheidung zwischen Gap Junction- und Ionen-Kanal-vermittelter Hemmung der Kontraktion war somit nicht möglich.

Eine Charakterisierung der Auswirkung Gap Junction-abhängiger Kopplung auf umfassendere physiologische Prozesse wie die Darmperistaltik bzw. den gastrointestinalen Nahrungstransport wurde bisher nicht beschrieben.

5.1.1 SM-CreER^{T2} vermittelt eine vollständige Deletion der Cx43-kodierenden Region in Darm-Glattmuskelzellen

In dieser Arbeit wurden erstmals die Effekte einer Glattmuskel-spezifischen Deletion des Cx43-Gens im Darm der Maus untersucht. Zur spezifischen Ausschaltung von Cx43 in glatten Muskelzellen wurden die von Kühbandner et al. (2000) beschriebene Tamoxifen-regulierbare SM-CreER^{T2}-Mauslinie sowie Cx43^{fl/fl}- (Theis et al., 2001) bzw. Cx43^{2lox/2lox}-Mäuse (Eckardt et al., 2004 a) verwendet.

Durch LacZ-Färbungen, Immunfluoreszenz- und Immunoblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass nach Tamoxifen-Behandlung eine Deletion der Cx43-kodierenden Region in nahezu allen Zellen der glatten zirkulären Muskelschicht des Darmes erfolgte (vgl. Abb. 4.1.1). Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Wang und Daniel (2001) an Gefrierschnitten des Hundedarms, konnte in der Maus keine Expression von Cx40 in intestinalen Glattmuskelzellen nachgewiesen werden. Die einzigen Cx40-spezifischen Antikörpersignale resultierten aus Gefäß-assoziierten glatten Muskelzellen (vgl. Abb. 4.1.2). Entsprechende Ergebnisse wurden von Nakamura et al. (1998) für die Ratte erhalten.

Die Expression des Cx45-Proteins konnte in der Vergangenheit nur in zirkulären glatten Muskelzellen des ösophagialen Sphinkters sowie in Cajal-Zellen nachgewiesen werden (Wang und Daniel, 2001; Nakamura et al., 1998). Für den Dünndarm der Maus konnte in dieser Arbeit jedoch auch eine Cx45-Expression in Zellen der zirkulären und longitudinalen Muskulatur nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.1.2). Resultate von Krüger et al. (2000) bestätigen diese Ergebnisse durch den Austausch der Cx45-kodierenden Region durch ein LacZ-Reportergen. Auf diese Weise wurde die transkriptionelle Aktivität des Cx45-Promotors in der gesamten Glattmuskelschicht veranschaulicht. Daher kann davon ausgegangen werden, dass von den untersuchten Connexin-Genen nur Cx43 und Cx45 in viszerale Glattmuskelzellen des Mausdarms exprimiert werden.

5.1.2 Die Darmwand Tamoxifen-behandelter Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tiere weist histologische Veränderungen und Zeichen einer Entzündung auf

Die bei Tieren mit Glattmuskel-spezifischer Deletion des Cx43-Gens festgestellte Verdickung der Tunica muscularis war auf eine Kombination aus Hypertrophie und Hyperplasie zurück zu führen (vgl. Abschnitt 4.1.1.3). Ein Zusammenhang zwischen hypertrophem Muskelgewebe und dem Verlust Connexin-vermittelter Kopplung wurde auch für das Herz beschrieben (Kirchhoff et al., 2000; Ya et al., 1998). Die hieraus resultierenden physiologischen Veränderungen betrafen die artrielle und ventrikuläre Reizweiterleitung sowie den Blutfluss durch den subpulmonaren Ausflusstrakt.

Weitere histologische Veränderungen des Glattmuskel-spezifisch Cx43-defizienten Darms wurden für die Morphologie der Cajal-Zellen, nicht jedoch der enterischen Neurone festgestellt (vgl. Abb.4.1.3). Cajal-Zellen sind mit den enterischen Neuronen des Auerbach- und Meissner-Plexus assoziiert und bilden das Schrittmacherzentrum des Darmes (Übersicht in: Camborová et al., 2003). In vielen Arbeiten wurde die Gap Junction-vermittelte Kopplung zwischen glatten Muskelzellen und Cajal-Zellen beschrieben (Übersicht in: Daniel, 2004), wobei die

Notwendigkeit der Gap Junction-Kanäle für die Weiterleitung elektischer Impulse zwischen Cajal-Zellen bzw. von Cajal- zu Glattmuskelzellen jedoch fraglich ist (Schultz et al., 2003).

Histologische Veränderungen der Darmwand, die v.a. auf eine Hypertrophie und Hyperplasie der Muskelzellen zurückgingen, wurden als Ergebnis einer Entzündungsreaktion im Gewebe beschrieben (Moreels et al., 2001 a, b; Moreels et al., 2004). Für Cajal-Zellen wurden Zellverluste bzw. pathologische Veränderungen in Morbus Crohn-Patienten und im Tiermodell zur induzierten intestinalen Entzündung nachgewiesen (Porcher et al., 2002; Lu et al., 1997; Der et al., 2000). In Patienten mit Reizdarmsyndrom wurden ebenfalls Hypertrophien der Cajal-Zellen des Auerbach- und Meissner-Plexus gezeigt (Törnblom et al., 2002).

Da in Tamoxifen-behandelten $Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}$ -Tieren eine verstärkte Infiltration mit neutrophilen Immunzellen vorlag (vgl. Abb. 4.1.4), ist es denkbar, dass diese Entzündung für die oben beschriebenen histologischen Veränderungen ausschlaggebend sein könnte. In glatten Muskelzellen der Luftwege wurde nachgewiesen, dass die entzündungsabhängige Stimulation der TGF- β 1-Ausschüttung zu einer Hypertrophie dieser Zellen führt (Black et al., 1996).

Warum allerdings die Stimulation des Immunsystems aufgrund des Verlustes der Cx43-vermittelten Zellkopplung einsetzt, bleibt ungeklärt. Möglicherweise führen Motilitätsstörungen, die ebenfalls für Tamoxifen-behandelte $Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}$ -Tiere nachgewiesen wurden (vgl. Abschnitt 5.1.3) zur Aktivierung des Immunsystems. Kalff et al. (2003) beschrieben eine Aktivierung der im gastrointestinalen Gewebe existierenden Makrophagen aufgrund von Berührungen des Darms z.B. während einer Operation im Bauchraum. Möglicherweise resultiert die leichte Dehnung der Darmwand dabei, ähnlich wie bei einer veränderten Kontraktilität, die die Dauer der Darmpassage und damit auch den Druck auf die Darmwände beeinflussen könnte, in einer immunologischen Reaktion.

Eine weitere Erklärung könnte in der verminderten Zelladhäsion liegen, die von Cx43-Gap Junctions unterstützt werden könnte. Lin et al. (2002) beschrieben einen signifikanten Abfall der Aggregation von Zellkulturzellen in Abhängigkeit von der Expression verschiedener Connexin-Isoformen, insbesondere von Cx43. Daher scheint die Funktion von Gap Junctions nicht nur auf die Vermittlung der interzellulären Kommunikation beschränkt, sondern auch für die Zelladhäsion notwendig zu sein. Ein Verlust der Cx43-vermittelten Adhäsion könnte daher eine Aufweitung des Extrazellularraumes und somit eine „Verschiebung“ der Cajal-Zellen zu den Zellzwischenräumen der zirkulären Glattmuskelzellen sowie die erleichterte Infiltration von Pathogenen ermöglichen. Erweiterte Zellzwischenräume wurden im Zusammenhang mit Entzündung und gestörter Motilität des Hunde-Colons beobachtet (Lu et al., 1997). Außerdem wurde beschrieben, dass inflammatorische Zytokine wie TNF- α die Connexin-vermittelte Kopplung durch Reduktion der Connexin-Expression und Veränderung des

Phosphorylierungsmusters vermindern (Hinkerohe et al., 2005; Temme et al., 1998; Fernandez-Cobo et al., 1999; Chanson et al., 2001). Aus diesen Gründen könnte die inflammatorische Herunterregulation der Connexin-Expression und die daraus folgende Reduktion der Zelladhäsion die Infiltration mit Pathogenen sogar in Wildtyp-Tieren beeinflussen.

5.1.3 Cx43-defiziente viszerale Glattmuskelzellen zeigen eine veränderte Kontraktilität

Physiologische Untersuchungen der kontraktilen Kraft wurden an Streifenpräparaten des zirkulären Muskels Tamoxifen-behandelter und unbehandelter Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tiere nach Stimulation mit Carbachol (CCh) und KCl durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.1.1.4). Beide eingesetzten Stoffe bewirken den Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellularraum, jedoch durch unterschiedliche Mechanismen: CCh als muskarinerner Agonist aktiviert nicht-selektive Kationen-Kanäle, die zu einer Depolarisation der Membran führen, was wiederum spannungsabhängige Kalzium-Kanäle aktiviert (Kuriyama et al., 1998). Hohe K⁺-Konzentrationen hingegen vermitteln den Kalzium-Einstrom durch die direkte Öffnung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle (Karaki et al., 1997). Die Dosis-Wirkungs-Kurven CCh- und KCl-stimulierter Muskelstreifen zeigten ähnliche Charakteristiken: Bei niedrigen Konzentrationen waren die Amplituden der Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Muskelstreifen im Vergleich zu nicht-behandelten Kontrollen geringer; bei höheren Konzentrationen vergrößerten sich die Amplituden der Muskelkontraktionen der Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Explantate verglichen mit den Kontrollen. Allerdings waren die Unterschiede nur für die KCl-stimulierten Kontraktionen signifikant, was an den unterschiedlichen Arten des Kalzium-Einstroms und möglichen Nebeneffekten der CCh-Behandlung, wie z.B. der Aktivierung des Rho-Kinase-Signalweges (Schneider et al., 2004), liegen könnte.

Die verminderte Reaktion Tamoxifen-behandelter Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tiere auf eine geringe KCl-Depolarisation könnte mit einem in diesen Tieren veränderten Membranpotential zusammenhängen. Obwohl die zeitweise Depolarisation der Membran normalerweise mit einer erhöhten Kontraktion assoziiert ist, zeigen Tamoxifen-behandelte Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäuse bei KCl-Konzentrationen < 30 mM eine verringerte Amplitude. Dies könnte mit einer Depolarisation erklärt werden, die auch im Ruhezustand erhalten bleibt. Mangel und Taylor (1992) vermuteten, dass ein stärkerer Anstieg der extrazellulären K⁺-Konzentration nötig ist, um Zellen mit einem bereits depolarisierten Ruhepotential zu erregen. Auch die gesteigerte

Kontraktion Cx43-defizienter Muskelstreifen bei höheren KCl-Konzentrationen ($> 30 \text{ mM}$) könnte auf ein verändertes Membranpotential zurückzuführen sein.

Die Vermutung, dass der Schwellenwert zu positiveren Potentialen verschoben sein könnte, könnte möglicherweise durch das Fehlen funktionaler Hemikanäle erklärt werden. Das Vorhandensein von Cx43-Halbkanälen wurde bisher in verschiedenen Zelltypen, einschließlich neuronalen Vorläuferzellen, Neuronen, Astrozyten und Herzmuskelzellen nachgewiesen (Übersicht in: Goodenough und Paul, 2003). Um zu überprüfen, ob die Membran tatsächlich und aufgrund des Fehlens von Cx43-Hemikanälen in Tamoxifen-behandelten $\text{Cx43}^{\text{fl/fl}}\text{:SM-CreER}^{\text{T2}}$ -Mäusen verändert ist, sind jedoch elektrophysiologische Untersuchungen notwendig.

5.1.4 Der gastrointestinale Transit in Tamoxifen-behandelten $\text{Cx43}^{\text{fl/fl}}\text{:SM-CreER}^{\text{T2}}$ -Mäusen ist verlangsamt

Die Untersuchung der Dauer des gastrointestinalen Transits ergab eine, im Vergleich zu den Kontrollen, 29-prozentige Verlangsamung in Tamoxifen-behandelten $\text{Cx43}^{\text{fl/fl}}\text{:SM-CreER}^{\text{T2}}$ -Tieren. Anzeichen einer Malabsorption, die sich in einer Reduktion des Körpergewichtes oder dem Entstehen von Ödemen äußern könnten, wurden nicht beobachtet (vgl. Abschnitt 4.1.1.5). Möglicherweise hebt die oben diskutierte Veränderung in der Kontraktilität die innere propulsive Aktivität des Darmes auf und führt so zu einer Dysfunktion der Peristaltik und des gastrointestinalen Transits, nicht aber zu einer veränderten Nährstoffaufnahme. Bezüglich der in Tamoxifen-behandelten $\text{Cx43}^{\text{fl/fl}}\text{:SM-CreER}^{\text{T2}}$ -Tieren gefundenen erhöhten Immunzell-Infiltration (vgl. Abb. 4.1.4) wurden auch in Tiermodellen des chronisch entzündeten Ileums ähnliche Änderungen in der Transitzeit beschrieben (Moreels et al., 2001 a, b). Daher könnte die gastrointestinale Passage nicht nur von der Cx43-vermittelten koordinierten Kontraktion der glatten Muskulatur sondern auch vom immunologischen Status des Gewebes abhängen, der ebenfalls durch Cx43 beeinflusst wird.

5.1.5 Tiere mit Glattmuskel-spezifischer Deletion des Cx43-Gens könnten als Modell für menschliche gastrointestinale Krankheiten dienen

In Untersuchungen der viszeralen sensorischen Funktion wurde gezeigt, dass Tamoxifen-behandelte $\text{Cx43}^{\text{fl/fl}}\text{:SM-CreER}^{\text{T2}}$ -Tiere eine verstärkte viszeromotorische Reaktion, also die Kontraktion der Abdominal-Muskulatur aufgrund colorektaler Distension, aufweisen (vgl. Abschnitt 4.1.1.5). Dies stimmt gut mit klinischen Untersuchungen einer Untergruppe von Reizdarm- und anderer Patienten mit gastrointestinalen Krankheiten überein, die ebenfalls einen erniedrigten Schwellenwert in der Schmerzwahrnehmung sowie Motilitätsstörungen zeigen

(Holtmann et al., 1996; Holtmann et al., 1997). Während viele Faktoren für die Entstehung viszeraler Hyperalgesie diskutiert werden, wurde die Rolle von Cx43 nie untersucht. Ähnlich den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen zeigten Gesamt-Biopsien des Jejunums von Reizdarm-Patienten Zeichen von Entzündung, muskulärer Hypertrophie und eine abnormale Morphologie der Cajal-Zellen (Törnblom et al., 2002). Auch andere Arbeitsgruppen wiesen ein verstärktes Vorhandensein von Mastzellen und Leukozyten im Darm dieser Patientengruppe nach (O'Sullivan et al., 2000; Chadwick et al., 2002). Leukozyten sezernieren kinetisch aktive Substanzen wie z.B. reaktive Sauerstoff-Zwischenstufen, Stickoxid und Prostaglandine, die die Kontraktilität glatter Muskelzellen inhibieren können (Stark et al., 1993; Nathan, 1987; Eberhart und Dubois, 1995). Mastzellen schütten Histamine aus, die zur Aktivierung enterischer Nervenfasern beitragen (Pearce et al., 1982; Bueno et al., 1997; Tamura and Wood, 1992). Dies könnte wiederum in Zusammenhang mit der gesteigerten viszeralen Schmerzempfindlichkeit von Reizdarm-Patienten stehen (Barbara et al., 2004). Die Kombination des verlangsamten Darm-Transits und viszeraler Hyperalgesie wird häufig in Patienten mit gastrointestinalen Symptomen beobachtet. Daher kann spekuliert werden, dass eine veränderte Funktion von Cx43-Gap Junctions zur Manifestation dieser Störungen beitragen könnte.

Zusammenfassend heißt dies, dass sowohl morphologische als auch funktionelle Veränderungen der Tunica muscularis durch den Verlust der Cx43-Expression zu gastrointestinalen Motor-Dysfunktionen und einer abnormalen viszeralen Schmerzempfindung führen. Da eine Connexin-vermittelte interzelluläre Kopplung zwischen glatten Muskelzellen des Darms nachgewiesen wurde (Kito und Suzuki, 2003; Farraway et al., 1995; Zamir und Hanani, 1990), weisen die Daten dieser Arbeit auf eine neue Rolle für funktional veränderte Cx43-Kanäle in der Ätiologie gastrointestinaler Erkrankungen hin. Möglicherweise repräsentieren Cx43-vermittelte physiologische Funktionen einen neuen Mechanismus zur Entstehung von Krankheitsbildern wie chronischer Pseudo-Obstruktion, Morbus Hirschsprung (Nemeth et al., 2000) oder einer Untergruppe von Reizdarm-Patienten.

5.2 Inaktivierung des Cx43-Gens in glatten Muskelzellen des Maus-Uterus

Die derzeitige Auffassung der Rolle von Gap Junctions im Geburtsprozess ist auf die Hypothese beschränkt, dass die durch diese Kanäle vermittelte interzelluläre Kopplung für die Koordination der synchronen myometrialen Kontraktion während der Geburt und Frühgeburt entscheidend sein könnte (Chow und Lye, 1994; Balducci et al., 1993). Diese Arbeit liefert die ersten

Ergebnisse zur Definition der *in vivo*-Aufgabe für Cx43-Gap Junctions im Myometrium schwangerer Mäuse und für den Zusammenhang zwischen der Cx43-Expression und dem Beginn der Geburt. Wie für die Untersuchungen am Darm wurden für diese Experimente die von Kühbandner et al. (2000) beschriebene Tamoxifen-regulierbare SM-CreER^{T2}-Mauslinie sowie Cx43^{fl/fl}- (Theis et al., 2001) bzw. Cx43^{2lox/2lox}-Mäuse (Eckardt et al., 2004 a) verwendet.

5.2.1 Die SM-CreER^{T2}-Rekombinase vermittelt die Deletion der Cx43-kodierenden Region in etwa der Hälfte der uterinen Glattmuskelzellen

Aufgrund von LacZ-Nachweisen und Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurde gezeigt, dass nach Tamoxifen-Behandlung 30-40% der glatten Muskelzellen im Uterus von Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tieren deletiert waren, d.h. statt des Cx43-Gens das LacZ-Reportergen exprimierten. Durch Immunoblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass dieser Deletionsumfang zu einem Verlust von 60% des Cx43-Proteins in glatten Muskelzellen Tamoxifen-behandelter Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Weibchen führte (vgl. Abschnitt 4.1.2.1, 4.1.2.2). Dieses im Vergleich zum Deletionsniveau in Glattmuskelzellen des Darmes niedrige Rekombinationsquote könnte darin begründet liegen, dass der Cx43-Genlocus in myometrialen glatten Muskelzellen weniger erreichbar ist als in anderen viszerale Organen. Möglicherweise hängt dies mit der engen hormonellen Regulation der Cx43-Expression im Uterus zusammen (Lye et al., 1993; Hendrix et al., 1995; Ou et al., 1997; Shynlova et al., 2004). Außerdem wurde eine Abhängigkeit der induzierbaren Cre-Aktivität von der Expressionsstärke des jeweiligen Cre-regulierenden Promotors nachgewiesen (Feil et al., 1996; Zhang et al., 1998; Eckardt et al., 2004 b) und ein Ausbleiben der Rekombination in Subgruppen Cre-exprimierender Zellen beschrieben (Schwenk et al., 1998; Zhang et al., 1998). Des Weiteren spielt *in vivo* auch die Zugänglichkeit des (im Falle von Tamoxifen *intra peritoneal* verabreichten) Induktors in unterschiedlichen Geweben eine entscheidende Rolle (Seibler et al., 2003; Guo et al., 2002).

5.2.2 Die Cx43-Defizienz wirkt sich nachteilig auf die Funktion myometrialer Glattmuskelzellen *in vitro* und *in vivo* aus

Der eingeschränkte Verlust der Cx43-Expression führte in kultivierten Glattmuskelzellen des Uterus Tamoxifen-behandelter Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Tiere zu einer Abnahme der interzellulären Farbstoffkopplung (vgl. Abschnitt 4.1.2.2). *In vivo* verursachte dieser Anteil Cx43-defizienter Muskelzellen eine Verlängerung der Schwangerschaft bzw. des Geburtsprozesses bei mehr als 80% der Glattmuskel-spezifisch deletierten Weibchen (vgl. Abschnitt 4.1.2.3). Auch andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die partielle Ausschaltung bzw. der „Knockdown“ von

Connexin-Proteinen ausreicht, um Veränderungen physiologischer Funktionen wie Reizleitungsgeschwindigkeit und Rhythmogenese, Insulinsekretion oder Wundheilung zu verursachen (van Rijen et al., 2004; Le Gurun et al., 2003; Qiu et al., 2003). In weniger als 20% der schwangeren Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Weibchen wurde ein normaler Geburtsablauf beobachtet. Möglicherweise war in diesen Tieren die Rekombinationseffizienz zu niedrig, um phänotypische Veränderungen hervorzurufen. Dafür spricht, dass Cx43^{del/+}-Tiere, in denen nur etwa 50% der ursprünglichen Cx43-Proteinmenge vorhanden ist, keine Geburtsdefekte aufwiesen. Wie auch von van Rijen et al. (2004) beschrieben wurde, führt nur ein Connexin-Proteinniveau unterhalb des heterozygoten Zustandes zum Auftreten funktionaler physiologischer Veränderungen.

Oxytozin und Prostaglandin sind uterotonisch wirkende Stoffe. Während der späten Schwangerschaft wird die Transkription der Oxytozin- und Prostaglandin F-Rezeptor-Gene im Myometrium vieler Säuger stark induziert (Challis und Lye, 1994; Zingg et al., 1995; Imamura et al., 2000; Al-Matubsi et al., 2001; Arosh et al., 2004). Die Expression des c-fos-Gens wird während der Geburt, nicht jedoch während der Schwangerschaft verstärkt (Piersanti und Lye, 1995; Mitchell und Lye, 2002). Für das Steroidhormon Progesteron, das für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft praktisch aller Spezies verantwortlich ist (Übersicht in: Graham und Clarke, 1997), wurde ein Abfall in der Hormonkonzentration am Tag der Geburt beschrieben (Pepe und Rothchild, 1974; Lye et al., 1993; Hendrix et al., 1995).

Die Ergebnisse dieser Arbeit wiesen auf keine signifikanten Änderungen in der Genexpression von Oxytozin- und Prostaglandin F-Rezeptor sowie des c-fos-Proteins hin. Auch der Gehalt an Plasma-Progesteron war zwischen unbehandelten und Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäusen unverändert (vgl. Abschnitt 4.1.2.4). Daher kann der oben diskutierte Phänotyp nicht durch hormonelle Veränderungen begründet werden, die möglicherweise durch den Östrogen-Agonisten Tamoxifen (Goldstein et al., 2000) ausgelöst wurden, sondern ist wahrscheinlich nur auf die Reduktion der Cx43-Expression zurückzuführen.

5.2.3 Tamoxifen-behandelte Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Weibchen könnten als neues Modell für das Verständnis von Geburtsvorgängen dienen

Die phänotypische Auswirkung der reduzierten Cx43-Expression in myometrialen Glattmuskelzellen betreffen die Verzögerung, nicht aber das komplette Aussetzen des Geburtsvorgangs. Daher ist es wahrscheinlich, dass andere Connexin-Isoformen die Funktion der Cx43-Gap Junctions kompensieren können. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde die Expression von Cx26, Cx40 und Cx45 neben der Ausprägung von Cx43 nachgewiesen (Orsino

et al., 1996; Kilarski et al., 1998; Kilarski et al., 2001; Albrecht et al., 1996). Weiter zeigten Kilarski et al. (2001) durch Immunfluoreszenz-Analysen, dass im humanen Myometrium Cx40, -43 und -45 zusammen in einem Gap Junction-Plaques lokalisiert sind. Da die Expression von Cx26 und Cx45 kurz vor der Geburt sinkt und auch die Einzelkanal-Leitfähigkeit sowie die Spannungsabhängigkeit von Cx45-Kanälen (30 pS, \pm 13.4 mV; Barrio et al., 1997) stark vom elektrophysiologischen Profil der Cx43-Kanäle (100 pS, \pm 66 mV; Valiunas et al., 2000) abweicht, ist es unwahrscheinlich, dass diese Isoformen die Funktion von Cx43-Gap Junctions übernehmen können. Auch wenn das Regulationsmuster für Cx40-Kanäle während der Schwangerschaft bisher ungeklärt ist (Kilarski et al., 2001), ähneln die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Kanäle (198 pS, \pm 45 mV; Bukauskas et al., 1995) denen der Cx43-Gap Junctions. Daher könnte eine Cx40-vermittelte interzelluläre Kopplung partiell die Funktionen von Cx43 während der Geburt übernehmen. Die Einzelkanal-Leitfähigkeit von 140 pS, sowie die Spannungsabhängigkeit von \pm 85 mV der Cx26-Kanäle (Bukauskas et al., 1995) gleichen ebenfalls den für Cx43 beschriebenen elektrophysiologischen Eigenschaften. Obwohl die Expression von Cx26 im Ratten-Myometrium vor der Geburt stark abnimmt (Orsino et al., 1996), wäre es möglich, dass aufgrund der elektrophysiologischen Ähnlichkeiten auch die zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Cx26-Kanäle die Funktionen der Cx43-vermittelten Kopplung mit übernehmen könnten.

Cx43 wird während frühgeburtlicher Kontraktionen, die als Hauptgrund für die ansteigende Häufigkeit neonataler Mortalität angesehen werden (Bibby und Stewart, 2004; Barros et al., 2005), verstärkt exprimiert (Balducci et al., 1993; Cook et al., 2000). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass Cx43 ein mögliches Ziel zur therapeutischen Kontrolle der myometrialen Kontraktilität darstellen und zur Vermeidung von Frühgeburten beitragen könnte (Balducci et al., 1993; Cook et al., 2000).

Zusammenfassend deuten die oben diskutierten Ergebnisse darauf hin, dass die Glattmuskelspezifische Ausschaltung von Cx43 im Maus-Uterus den Geburtsprozess signifikant verlängert, aber nicht vollständig inhibiert. Tamoxifen-behandelte Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäuse könnten daher ein neues Tiermodell zur Vermeidung frühgeburtlicher Kontraktionen des Myometriums darstellen, wenn es gelänge die Cx43-vermittelte myometriale Kopplung durch lokale Applikation von Gap Junction-Blockern zu inhibieren. Auch wenn zu Kopplungshemmer wie z.B. dem häufig eingesetzten Carbenoxolon bzw. dessen Derivat Glycyrhetinsäure Nebenwirkungen bekannt sind (Takeda et al., 2004; Rouach et al., 2003), könnten diese unerwünschten Effekte durch die lokal begrenzte Anwendung (z.B. Injektion in den Uterusmuskel) für den Gesamtorganismus eingeschränkt werden.

5.3 Untersuchungen zur induzierbaren, Neuronen-spezifischen Expression von Connexin43 unter Verwendung des Tet-OFF-Systems

Bisherige Expressionsanalysen des Cx43-Gens im Gehirn verschiedener Säuger haben gezeigt, dass die Ausprägung dieses Connexin-Proteins in Neuronen einer zeitlichen Kontrolle unterliegt (Bittmann et al., 1998; Bittmann et al., 2002; Connors et al., 1983; Theis et al., 2003). Die hypothetische Funktion der Reduktion der Cx43-vermittelten Kopplung juveniler Neurone wird in einem Reifungssignal gesehen, dass, durch die Verminderung elektrischer Synapsen, die neuronale Differenzierung bzw. Reifung chemischer Synapsen vermittelt (Fischbach, 1972; Rozental et al., 1995). *In vivo* wurde diese Vermutung bisher jedoch nicht überprüft. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit transgene Mäuse erzeugt, die eine Expression des Cx43-Proteins in adulten Neuronen und damit die Untersuchung der Auswirkung einer anhaltenden neuronalen Kopplung ermöglichen. Da Cx43 im Gehirn stark vom sehr häufigen Zelltyp der Astrozyten exprimiert wird und eine zusätzliche, Neuronen-spezifische Ausprägung des Cx43-Proteins somit kaum festgestellt werden kann, wurde ein bidirektionaler Expressionsvektor genutzt, der die gleichzeitige Transkription von Cx43 und dem eGFP-Reportergen ermöglichte (Döring, 2000). Daher erlaubte die grüne eGFP-Fluoreszenz eine direkte Darstellung der Zelltypen, in denen das Cx43-Transgen exprimiert wurde.

5.3.1 Die Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens ist induzierbar und Neuronen-spezifisch

Da bei der anfänglichen Planung der Cx43^{TetOeGFP}-Linie die Möglichkeit eines letalen Phänotyps aufgrund der Überexpression des Cx43-Proteins nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde das Tet-OFF-System zur induzierbaren Expression des Transgens gewählt. Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere, die ab der Geburt (Krestel et al., 2001; Bayer et al., 1999) das Cx43-Transgen exprimierten, waren lebensfähig und fertil. Zur Überprüfung des Systems *per se* wurden einige Tiere mit Doxyzyklin induziert und die Expression des Transgens untersucht. Da - im Gegensatz zu nicht-induzierten Tieren - weder die mRNA des Cx43- bzw. eGFP-Transgens (vgl. Abschnitt 4.2.1) noch eine eGFP-Fluoreszenz in Gehirnen Doxyzyklin-behandelter Tiere nachgewiesen werden konnte, wurde die Funktionalität des Tet-OFF-Systems bestätigt.

Durch Immunfluoreszenzanalysen konnte die Neuronen-spezifische Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens anhand der eGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dabei wurde deutlich, dass nicht alle Neurone bestimmter Gehirnregionen, wie z.B. des Cortex oder Striatums, grün fluoreszierten. Ähnliche Resultate wurden in Mäusen des Genotyps TetO-

lacZ:CaMKII α -tTA erzielt, die unter der Kontrolle des CaMKII α -tTA-Transgens das LacZ-Reportergen Neuronen-spezifisch exprimierten (vgl. Abb. 4.2.5). Obwohl von Burgin et al. (1990) eine starke Aktivität des CaMKII α -Promotors in „neuronalen Zellen“ des Vorderhirns nachgewiesen wurde, zeigten neuere Untersuchungen, dass die Kinase nur in exzitatorischen, nicht-GABAergen Neuronen (Ochiishi et al., 1998; Benson et al., 1991), jedoch nicht in inhibitorischen Neuronen oder Astrozyten (Vallano et al., 2000) exprimiert wird. Weiter scheint die Expression der CaMKII α -Kinase auf postmitotischen Neurone beschränkt zu sein (Bayer et al., 1999). Daher ist das unterbrochene Expressionsmuster des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens im Cortex oder Striatum erwartungsgemäß. Im Hippocampus ist diese von der Schnitttiefe - und damit nur unter Umständen vom angeschnittenen Zelltyp - abhängige Ausprägung jedoch überraschend. Möglicherweise hängt dies mit dem verwendeten Promotor-Fragment des CaMKII α -tTA-Transgens zusammen (Mayford et al., 1996), da gezeigt wurde, dass die zelltypspezifische Expression des Transgens von weiteren regulatorischen Elementen außerhalb des gewählten Promotor-Fragments abhängen kann (Li et al., 1996). Aufgrund dessen kann es zu einer heterogenen, episodischen Expression innerhalb eines Gewebes kommen (Regan et al., 2000; Kühbandner et al., 2000). Dies gilt sowohl für das CaMKII α -tTA- als auch für das Cx43^{TetOeGFP}-Transgen.

Einen weiteren Erklärungsansatz liefert das bidirektionale Tet-Operator-Konstrukt, das für die Expression des Cx43- und eGFP-Gens eingesetzt wurde. Die CMV-Minimalpromotoren, die beidseitig der Tet-Operatorsequenz angeordnet sind, zeichnen sich durch unterschiedliche Sequenzen und Längen aus (Baron et al., 1995). Das längere CMV-Minimalpromotor-Fragment steuert im Fall des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens die Expression von Cx43, das kürzere Fragment die Transkription des eGFP-Reportergens (Döring, 2000). Es wäre also möglich, dass nur die Expression des eGFP-Proteins in einigen Zellen zu schwach ist, um nachgewiesen zu werden, das Expressionsniveau des Cx43-Transgens jedoch höher liegt.

5.3.2 Die Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens führt zu einer altersabhängigen interzellulären Kopplung von Neuronen

In Kopplungsanalysen an kultivierten Neuronen und hippocampalen Dickschnitten wurde gezeigt, dass ein Farbstofftransfer, vermittelt durch transgene Cx43-Kanäle, stattfinden kann. Dabei wurde in hippocampalen Dickschnitten beobachtet, dass diese Kopplung altersabhängig reguliert zu werden scheint: Nur in Neuronen 22-28 Tage alter Tiere, nicht aber 41-48 Tage nach der Geburt, wurde ein Farbstofftransfer beobachtet. Dieser fand in jungen Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tieren in 67% der erfolgreich injizierten Neurone, in Kontrolltieren

in 17% der injizierten Zellen statt (vgl. Abschnitt 4.2.3.2). Mehrere Arbeitsgruppen zeigten in Kopplungsexperimenten am Rattencortex, dass Neurone während der ersten 7-14 Tagen der postnatalen Entwicklung eine starke Kopplung aufweisen (58-44%), die jedoch vom achtzehnten Tag nach der Geburt bis zum Adultstadium abnimmt (20-25%) (Connors et al., 1983; Peinado et al., 1993 a, b; Rörig et al., 1996; Bittmann et al., 2002). Dabei konnte in 50% der koppelnden Pyramidenneurone von P7-Tieren eine Cx43-Immunreaktivität nachgewiesen werden (Bittmann et al., 2002). Der in den Untersuchungen dieser Arbeit gezeigte Umfang der neuronalen Kopplung von P22-28 Wildtyp-Tieren stimmt somit mit den Ergebnissen anderer Analysen überein. Allerdings wurde in der Ratte kein vollständiger Verlust des interzellulären Farbstofftransfers beschrieben, so wie er in dieser Arbeit für Kontroll-Mäuse gezeigt wurde. Da auch für adulte Meerschweinchen ein anderer neuronaler Kopplungsgrad von 44% beschrieben wurde (Gutnick und Prince, 1981), könnte dies mit Spezies-spezifischen Unterschieden zusammenhängen. Warum allerdings in älteren transgenen Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tieren die Kopplung zurückgeht, ist damit nicht zu begründen.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der posttranslationalen Modifikation des transgenen Cx43-Proteins liegen. Durch Immunoblot-Analysen wurde gezeigt, dass nach der dritten postnatalen Woche eine verstärkte Phosphorylierung des hippocampalen Cx43-Proteins von Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tieren, nicht aber von gleichaltrigen Kontroll-Geschwistertieren auftritt (vgl. Abb. 4.2.12). In früheren Untersuchungen wurde gefunden, dass die carboxyterminale Domäne des Cx43-Proteins zahlreiche Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen aufweist (Musil et al., 1990). Neben dem Verschluss der Kanalpore (Kim et al., 1999; Lampe et al., 2000) wird über Phosphorylierungen auch die Halbwertszeit des Cx43-Proteins beeinflusst (Musil et al., 2000; Übersicht in: Moreno, 2005). Daher ist es möglich, dass die für das Neuron „anormale“, durch eine zelluläre Transkriptionskontrolle nicht zu regulierende Cx43-Transgen-vermittelte Kopplung, durch Phosphorylierungen beeinflusst wird. Auf diese Weise könnte der gleiche, nämlich entkoppelte Zustand, ermöglicht werden, der im adulten Wildtyp-Tier vorliegt. Die Verzögerung im Phosphorylierungsbeginn könnte eventuell mit regulativen Faktoren zusammenhängen, die mit der Reifung der Zelle exprimiert werden und erst dann zur Aktivierung verschiedener Kinasen führen könnten.

Andererseits wurde gezeigt, dass Farbstofftransfer und elektrische Kopplung nicht unbedingt korrelieren müssen: Hammer und Sheridan (1978) wiesen an Acinar-Zellen der Speicheldrüse der Ratte nach, dass das gleichzeitige Vorhandensein elektrischer Kopplung und des interzellulären Transfers von Farbstoffmolekülen nicht auf alle Zellen zutraf, elektrische Kopplung allein jedoch in den meisten Zellen zu finden war. Daher könnten auch die Neurone

von Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tieren die interzelluläre Weiterleitung elektrischer Potentiale, nicht jedoch von Farbstoffen, erlauben.

Neben der oben diskutierten neuronalen Kopplung wurde auch die Möglichkeit des interzellulären Farbstofftransfers zwischen Astrozyten und Neuronen und *vice versa* überprüft. Weder in der einen noch in der anderen Richtung konnte eine Kopplung in hippocampalen Dickschnitten gezeigt werden (vgl. Abb. 4.2.11). Da in Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tieren das Cx43-Protein sowohl von Astrozyten als auch von Neuronen exprimiert wird, wäre ein Farbstofftransfer zwischen beiden Netzwerken möglich. Das Ausbleiben dieser Kopplung könnte neben der oben diskutierten Phosphorylierungskontrolle auch mit dem folgenden Mechanismus zusammenhängen: Die Integration neu gebildeter Connexone erfolgt bevorzugt abseits von Zellverbindungen. Erst anschließend diffundieren die Halbkanäle lateral in der Plasmamembran und fügen sich in die Außenränder bestehender Gap Junction Plaques ein (Lauf et al., 2002; Gaietta et al., 2002). Die Ausbildung neuer Gap Junction Plaques ist vermutlich ein kooperativer Prozess, wobei der zeitbestimmende Schritt die Kopplung der ersten Connexone aus benachbarten, aber noch nicht angenäherten Membranen ist (Valiunas et al., 1997). Eine Erleichterung des Prozesses über Wechselwirkungen mit Proteinen der Zelladhäsionskontakte wie E- oder N-Cadherin (Fujimoto et al., 1997; Wei et al., 2005) wird diskutiert. Möglicherweise werden solche Zelladhäsionskontakte zwischen Astrozyten und Neuronen nicht ausgebildet und verhindern somit das Docken der Cx43-Halbkanäle der verschiedenen Zelltypen.

5.3.3 Veränderungen des Verhaltens und der neurochemischen Parameter von Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tieren

Zur Untersuchung der möglichen Auswirkungen der neuronalen Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens auf neurophysiologische und verhaltensspezifische Aspekte wurden verschiedene Analysen durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere eine verstärkte Ängstlichkeit sowie verringerte motorische Lernfähigkeit aufweisen. Im Gegensatz dazu war das Verhalten dieser Tiere in Bezug auf Habituation und Exploration im Offenfeld sowie die Fähigkeit, neue Objekte zu erkennen, normal. Neurochemische Analysen zeigten Veränderungen der Acetylcholin- und Monoamin-Systeme des frontalen Cortex, ventralen Striatums und der Amygdala (vgl. Abschnitt 4.2.4).

Läsionen des medialen präfrontalen Cortex modulieren Angst-assoziiertes Verhalten in Ratten (Lacroix et al., 2000; Sah und Treit, 2003; Rangel et al., 2003). In Nagern wurden Modulationen der Acetylcholin- (Lampera et al., 2000), Noradrenalin- (Mason et al., 1998; Neophytou et al.,

2001), Dopamin- (Dazzi et al., 2001; Thiel und Schwartig, 2001) und Serotonin-Sekretion bzw. -Gehalts im frontalen Cortex (Hashimoto et al., 1999; Nazar et al., 1999; Langen et al., 2002) in Zusammenhang mit emotionalem Verhalten gebracht. Auch die Amygdala wurde als ausschlaggebend für emotionsgebundene Verhaltensweisen beschrieben (Davies, 1998). Aus diesen Gründen könnten die Veränderungen der Neurotransmitter- und Metabolitenmengen im frontalen Cortex und der Amygdala von Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tieren mit der beschriebenen verstärkten Ängstlichkeit zusammenhängen.

Dopaminerge einmündende Neurone der Basalganglien, inklusive des ventralen Striatums, wurden mit der Kontrolle von Bewegungsvorgängen (Groenewegen, 2003) und mit motorischem Lernen (Hikosakka et al., 2002) in Verbindung gebracht. Daher könnten die erhöhten Werte der Dopamin-Metaboliten des ventralen Striatums transgener Mäuse mit der reduzierten motorischen Lernfähigkeit dieser Tiere in Zusammenhang stehen.

Bisher wurde mehrfach ein Zusammenhang zwischen verschiedenen Neurotransmittern und der Regulation der Gap Junction-vermittelten Kopplung gezeigt: So inhibiert z.B. Serotonin den Kopplungsumfang in postnatalen somatosensorischen Neuronen der Ratte (Rörig und Sutor, 1996 a). Auch für Noradrenalin und Dopamin wurde eine Hemmung des Farbstofftransfers in Rattenneuronen gezeigt (Rörig et al., 1995 a, b). Diese Entkopplung wurde mit der Aktivierung verschiedener Proteinkinasen, die den Öffnungszustand von Gap Junction-Kanälen über Phosphorylierungen regulieren, in Zusammenhang gebracht (Übersicht in: Rörig und Feller, 2000). Möglicherweise handelt es sich bei den veränderten neurochemischen Parametern um einen sekundären Effekt der transgenen Cx43-Expression, der den Kopplungsrückgang und damit die Differenzierung des postnatalen Gehirns sicherstellen soll.

5.3.4 Die neuronale Expression des Cx43-Proteins führt zu einer erhöhten Epilepsie-Anfälligkeit

Die systemische Gabe von Pilocarpin löst die Aktivierung des cholinergen Systems und damit einen epileptischen Anfall aus, bei dem es zu neuropathologischen Veränderungen des Gehirns kommen kann (Clifford et al., 1987; Borges et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere einen, im Vergleich zu Kontrollgeschwistern, erniedrigten Schwellenwert zur Ausprägung epileptiformer Entladungen aufweisen (vgl. Abschnitt 4.2.5.1).

Seit längerem wird vermutet, dass abnormale Hypersynchronität der Aktivität benachbarter Neurone, die als charakteristisches Zeichen epileptiformer Entladungen gilt, mit Gap Junction-vermittelter Kopplung zusammenhängen könnte (Übersicht in: Perez Velazquez und Carlen,

2000). Dabei haben theoretische Modelle und *in vivo*-Untersuchungen gezeigt, dass diese Kopplung nicht stark sein muss, um neuronale Verhaltensmuster grundlegend zu verändern (Sherman und Rinzel, 1992; Baimbridge et al., 1991). Die Blockierung der vermutlich Gap Junction-vermittelten Kopplung durch Halothan oder Octanol unterdrückte die spontanen synchronen Entladungen in der hippocampalen CA1-Region junger Ratten (Perez Velazquez et al., 1994). Auch für den Gap Junction-Blocker Carbenoxolon wurde eine antikonvulsive Wirkung nachgewiesen (Jahromi et al., 2002; Hosseinzadeh und Nassiri Asl, 2003). (Allerdings könnte dabei aufgrund der nachgewiesenen Nebeneffekte dieses Kopplungshemmers, die beschriebene antiepileptische Wirkungsweise nicht nur auf die Inhibierung der Gap Junction-vermittelten Kopplung zurückzuführen sein, sondern auch mit der Beeinflussung intrinsischer neuronaler Eigenschaften zusammenhängen (Rouach et al., 2003).)

Die (schwache elektrische) neuronale Kopplung, die durch die Expression des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens ausgelöst wird, könnte somit zu einer verstärkten Synchronisation der Hirnareale (wie Hippocampus, Amygdala und piriformer Cortex; vgl. Abschnitt 1.2.3.3) führen, die für die Auslösung epileptiformer Entladungen verantwortlich sind.

Weiter wurde gezeigt, dass Anfälle, die durch den cholinerg-muskarinergen Agonisten Pilocarpin induziert wurden (Turski et al., 1989), durch Acetylcholin-Rezeptoren vermittelt werden (Berkeley et al., 2002; Mark und Finn, 2002). Versuche zur Hemmung der Acetylcholin-Esterase zeigten einen Anstieg der Acetylcholin-Konzentration im Cortex und dadurch ausgelöste epileptiformer Entladungen (Shih und MacDonough, 1997). Die erhöhte Acetylcholin-Menge im frontalen Cortex von Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tieren (vgl. Abschnitt 4.2.4.2) könnte somit ebenfalls zur Entstehung des oben diskutierten epileptischen Phänotyps beitragen. Im Gegensatz dazu inhibiert die, in transgenen Tieren ebenfalls erhöhte Serotonin-Konzentration die Erregbarkeit des neuronalen Netzwerkes (Sparks und Buckholtz, 1985; Dailey et al., 1992). Möglicherweise wird durch die gegenläufigen Effekte dieser Neurotransmitter die Entstehung epileptischer Anfälle im Gehirn transgener Mäuse verhindert, die nicht mit Pilocarpin behandelt wurden. Die systemische Gabe des Acetylcholin-Analogons Pilocarpin könnte, zusammen mit der erhöhten endogenen Konzentration des Neurotransmitters, die Aktivierung von Acetylcholin-Rezeptoren jedoch soweit steigern, dass es zu einer erleichterten Anfallsentstehung in Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tieren kommt.

5.3.5 Histopathologische Veränderungen könnten in Zusammenhang mit der Ausprägung des Cx43^{TetOeGFP}-Transgens stehen

Pilocarpin-behandelte Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Mäuse und Kontroll-Tiere zeigten die für dieses Epilepsie-Modell beschriebenen histologischen Veränderungen des Hippocampus (Clifford et al., 1987, Borges et al., 2003) (vgl. Abschnitt 4.2.5.2).

Ein Zeichen verlängerter epileptischer Anfälle, des sogenannten Status epilepticus, ist die Aussprossung von Moosfasern, den Körnerzell-Axonon des hippocampalen Gyrus dentatus. Diese Neurone bilden erregende, rückläufige Synapsen mit den Körnerzellen der betreffenden Gehirnregion (Buckmaster et al., 2002; Cavazos et al., 2003; Wenzel et al., 2000). Die daraus resultierende Entstehung neuer exzitatorischer Schaltkreise innerhalb der inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus wird für die Intensivierung der nachfolgenden spontanen Anfälle diskutiert (z.B. Dudek und Spitz, 1997; Feng et al., 2003; Tauck und Nadler, 1985). Die Aussprossung der Moosfasern stellt somit eine synaptische Reorganisation als Reaktion auf starke epileptiformer Entladungen dar. Weiter zeigen Pilocarpin-behandelte Tiere häufig eine Schädigung bzw. den Verlust von Neuronen des Hippocampus und anderer Gehirnnareale (Turski et al., 1984).

In transgenen Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tieren wurde eine verstärkte Moosfaser-Sprossung festgestellt, während die Schwere des neuronalen Zellverlusts oder der Dispersion der Körnerzellschicht des Hippocampus nicht von Kontroll-Mäusen zu unterscheiden war (vgl. Abb. 4.2.16). Diese Resultate zeigen, dass die verstärkten epileptischen Anfälle der transgenen Tiere von charakteristischen histologischen Veränderungen begleitet sind, wodurch der Einfluss der neuronalen Cx43-vermittelten Kopplung unterstrichen wird.

Genauere histologische Untersuchungen des Hippocampus ergaben weitere Veränderungen der Zytoarchitektur sowohl in Pilocarpin-behandelten als auch unbehandelten Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Mäusen, die in Kontrolltieren nicht festgestellt wurden (vgl. Abb. 4.2.17). Diese Veränderungen betrafen die zelluläre Anordnung der Pyramidenneurone der hippocampalen CA2-Region und könnten mit einem veränderten Wanderungsverhalten transgener Neurone zusammenhängen.

Die Cortikogenese beginnt in Nagern mit der Entstehung von Pyramidenneuronen in der kortikalen Ventrikularzone und der radialen Wanderung dieser Zellen zur Oberfläche der cerebralen Vesikel, um später die Cortikalplatte und auch den Hippocampus zu bilden (Übersicht in: Marín und Rubenstein, 2003). Bittmann et al. (1997) zeigten am Cortex embryonaler Mäuse (E13-18), dass migrierende Neurone keine interzelluläre Kopplung aufwiesen. Entgegen den Untersuchungen zum postnatalen Expressionsbeginn der CaMKII α -Kinase (Krestel et al., 2001; Bayer et al., 1999), zeigten andere Analysen, dass eine Cre-Rekombinase, die unter der

Kontrolle des CaMKII α -Promotors exprimiert wurde, schon am Tag 18,5 der Embryonalentwicklung zu einer Cre-vermittelten Aktivierung des LacZ-Reportergens im Cortex von Mäusen führte (Dragatsis und Zeitlin, 2000). Es ist also möglich, dass Populationen wandernder transgener Neurone schon im Embryonalstadium das Cx43^{TetOeGFP}-Transgen exprimieren. Eventuell sind diese Zellen länger gekoppelt als in Wildtyp-Mäusen und zeigen daher ein verändertes Wanderungsverhalten.

In adulten Mäusen ist die neuronale Migration stark eingeschränkt. Eine häufig untersuchte Ausnahme stellt der Rostale Migratorische Strom (RMS) von der Subventrikularzone zum Bulbus olfactorius dar: Die in der Subventrikularzone gebildeten neuronalen Vorläuferzellen wandern entlang dieser Struktur in den Riechkolben und fügen sich dort als olfaktorische Interneurone (Körnerzellen) ein (Doetsch und Scharff, 2001; Marín und Rubenstein, 2003). Entsprechend der Aktivität des CaMKII α -Promotor in Körnerzellen des Riechkolbens (Zou et al., 2002), wurden in Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Mäusen grün-fluoreszierende Neurone in diesem Zelltyp, aber auch in Zellen, die möglicherweise zum RMS gehören, gefunden (vgl. Abschnitt 4.2.2.2). Dies weist darauf hin, dass auch wandernde Neuronen-Populationen das transgene Cx43-Protein ausprägen und so zu einer möglicherweise veränderten Zytoarchitektur beitragen könnten.

In Untersuchungen von Cases et al. (1996) wurde gezeigt, dass ein Überangebot des Neurotransmitters Serotonin zu Veränderungen des somatosensorischen Cortex führt, die möglicherweise mit der unter Serotonin-Einfluss beschleunigten Zellwanderung zu erklären sind (Vitalis und Parnavelas, 2003). Ein Einfluss der Cx43-Expression auf die Zellwanderung wurde in verschiedenen Studien gezeigt. In Cx43-defizienten Mäusen ist beispielsweise die astrozytäre und neuronale Migration verlangsamt (Perez Velazquez et al., 1996; Fushiki et al., 2003). Huang et al. (1998) zeigten an Cx43-überexprimierenden Herz-Neuralleistenzellen, dass der Migrations-Index in einer von der Transgen-Dosis abhängenden Weise beschleunigt werden kann. Defekte in der neuronalen Migration während der Entwicklung des Gehirns können zu Schwachsinnigkeit, Epilepsie und schweren Lernbehinderungen führen (Gleeson, 2001; McManus und Golden, 2005).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die neuronale Expression des Cx43-Proteins bis zum Adultstadium zu unterschiedlichen phänotypischen Effekten führt, die sich zudem gegenseitig beeinflussen könnten:

- 1.) Die Cx43-vermittelte Kopplung von Neuronen könnte zu verstärkter Synchronisation der neuronalen Aktivität und damit zu epileptischen Anfällen führen.

- 2.) Die nachgewiesenen neurochemischen Veränderungen im Gehirn transgener Tiere könnten die Gap Junction-vermittelte Kopplung durch Phosphorylierung des neuronalen Cx43-Proteins inhibieren, und damit möglicherweise eine Art „Widtyp-Zustand“ der Neurone unterstützen.
- 3.) Die veränderten Neurotransmitterkonzentrationen könnten andererseits die Zellwanderung und damit die zelluläre Struktur einzelner Hirnareale beeinflussen.
- 4.) Eine veränderte Zytoarchitektur könnte wiederum zur Auslösung von Epilepsie führen, die ihrerseits durch die erhöhten Acetylcholin-Konzentrationen begünstigt werden könnte.

5.4 Erzeugung einer Mausmutante zum zelltypspezifischen Austausch des Cx45- gegen das Cx36-Gen (Cx45KI36)

Jedes der 21 menschlichen und der 20 Maus-Connexine besitzt spezifische funktionelle und elektrophysiologische Eigenschaften (Willecke et al., 2002; Söhl und Willecke, 2003; Harris, 2001). Zur Untersuchung der Funktion verschiedener Connexin-Proteine wurden die meisten dieser Gene durch konventionelle oder konditionale Methoden ausgeschaltet. Jede der so erzeugten Connexin-Null-Mutanten zeigte einen eigenen Phänotyp, der auf die spezifische physiologische Rolle des jeweiligen Connexins, zumindest in einem Teil der Expressionsorte, hinweist (Übersicht in: Nicholson und Bruzzone, 1997; White und Paul, 1999). Aufgrund einer möglichen Redundanz und kompensatorischen Wirkung anderer, z.B. im gleichen Gewebe bzw. Zelltyp exprimierter Connexine, sind die verschiedenen Phänotypen jedoch häufig schwer zu interpretieren. Um zwischen spezifischen und gemeinsamen physiologischen Funktionen der Connexin-Proteine unterscheiden zu können, wurden bisher verschiedene sogenannte „Knock-in“-Mauslinien erzeugt, in denen ein Connexin-Gen gegen die kodierende Region eines anderen Connexins ausgetauscht wurde (Plum et al., 2000; White, 2002; Alcoléa et al., 2004; Zheng-Fischhöfer et al., eingereicht; Pielinsticker et al., in Vorbereitung).

Die Ausprägungsorte von Cx45 und Cx36 in der Maus überschneiden sich nur in wenigen Geweben: Im Riechkolben wurde eine Expression beider Connexin-Proteine in Mitralzellen beschrieben (Kosaka et al., 2005; Degen et al., 2004; Zhang und Restrepo, 2002). In der inferioren Olive wird eine Koexpression anhand von mRNA-Untersuchungen vermutet (Weickert et al., 2005). Für die Retina wurden heterotypische Synapsen zwischen AII-Amakrinzellen (Cx36) und ON-Zapfen Bipolarzellen (Cx45) nachgewiesen (Maxeiner et al., 2005). Außerhalb des zentralen Nervensystems konnte bisher keine gemeinsame Ausprägung dieser Connexine beobachtet werden (Degen et al., 2004; Krüger et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde eine Maus erzeugt, die durch den zelltypspezifischen oder generellen Ersatz von Cx45 durch Cx36 die Untersuchung der funktionellen Austauschbarkeit dieser Proteine innerhalb und außerhalb des Zentralnervensystems ermöglicht.

5.4.1 Der Cre-vermittelte Austausch von Cx45 gegen Cx36 und ein LacZ-Reportergen kann generell und gewebespezifisch erreicht werden

Heterozygote Cx45KI36^{ki/+}-Tiere mit generellem Austausch, sowie Mäuse mit zelltypspezifischem Ersatz der Cx45-kodierenden Region (Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Cre; Cx45KI36^{fl/+}:MyHC-Cre; Cx45KI36^{fl/+}:SMMHC-Cre) zeigten das erwartete Expressionsmuster des β -Galaktosidase- und Cx36-Gens auf RNA- und Protein-Ebene in allen untersuchten Geweben (vgl. Abb. 4.3.2). Allerdings fiel die LacZ-Färbung der betreffenden Gewebe häufig schwächer aus, als dies nach Analysen von Cx45lacZ-Mäusen erwartet werden konnte (Krüger et al., 2000). Zusätzlich wurde in der Neuronenschicht VI des Cortex, in wenigen Zellen der inneren nukleären und inneren plexiformen Schicht der Retina, im Herz und in einigen größeren Blutgefäßen (nicht gezeigt) eine Expression des LacZ-Reportergens auch in Cx45KI36^{fl/fl}-Tieren beobachtet, die keine Cre-Rekombinase besaßen und daher auch keinen Austausch der Cx45-kodierenden Region bzw. Aktivierung des Cx36- und β -Galaktosidase-Gens zeigen sollten (vgl. Abschnitt 4.3.5).

Diese unerwünschte Expression könnte einerseits bedeuten, dass die endogene Stoppsequenz des Cx45-Gens sowie das sechsfache SV40-polyA-Signal, das 3' des Cx45-Terminationssignals einkloniert wurde, nicht zum Ende der Transkription und damit zu einem multicistronischen Durchleseprodukt aus Cx45-, Cx36- und lacZ-mRNA führt. Gegen diese Erklärung sprechen die Ergebnisse von Immunfluoreszenz- und LacZ-Färbungen des adulten Herzens von Cx45KI36^{fl/fl}-Tieren (vgl. 4.3.5.2). Hier wurde gezeigt, dass zwar eine Expression des LacZ-Reporterproteins im Atrioventrikularknoten vorlag, jedoch kein Cx36-Protein nachgewiesen werden konnte. Erst nach Cre-vermittelter Deletion der Cx45-kodierenden Region konnte neben der β -Galaktosidase auch die Cx36-Expression gezeigt werden. Ebenfalls konnte die Entstehung einer multicistronischen mRNA, die durch einen Funktionsverlust der SV40- bzw. Cx45-Stopp- und Poly-Adenylierungssignale verursacht werden könnte, nicht nachgewiesen werden (Maschke, 2005).

Einen zweiten Erklärungsansatz für die Entstehung der Hintergrundaktivität des Reportergens könnte die für die zeitgleiche Expression von Cx36 und β -Galaktosidase verwendete interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) aus dem Encephalomyocarditis Virus (EMCV, Jang et al., 1988) liefern. Kozak (2002; 2003) diskutierte, dass einige IRES-Sequenzen durch eine

kryptische Promotoraktivität zur Entstehung monocistronischer mRNA führen könnten. Bisher konnte zwar keine solche Aktivität für die EMCV-IRES-Sequenz in transfizierten Maus-ES-Zellen, Cos-7- und HeLa-Zellen gezeigt werden (Kim et al., 1992; Wang et al., 2005), für andere IRES-Sequenzen, z.B. des Hepatitis C Virus (Dumas et al., 2003) oder des eukaryotischen Translations-Initiationsfaktors 4GI (Han und Zhang, 2002) wurde eine Promotoraktivität jedoch nachgewiesen. Weiter ist bekannt, dass die Transkription von Genen von der Anwesenheit zelltypspezifischer Transkriptionsfaktoren abhängt (Übersicht in: Hochheimer und Tjian, 2003; Emerson, 2002). Wang et al. (2005) vermuteten beispielsweise, dass HeLa-Zellen nur eine eingeschränkte Auswahl der Transkriptionsfaktoren aufweisen, die für die Aktivierung der kryptischen Promotoraktivität von IRES-Sequenzen nötig sein könnte.

Für EMCV-IRES-Sequenzen konnte außerdem eine gewisse Zelltypspezifität bezüglich des Expressionsniveaus des nachgeschalteten Gens gezeigt werden: In HeLa-Zellen wurde eine geringere Aktivität nachgewiesen als in anderen Zelllinien. Dieser Unterschied wurde für verschiedene Mausgewebe bestätigt (Créancier et al., 2000; 2001). Als mögliche Ursache werden IRES-*trans*-aktivierende Faktoren diskutiert, die von einigen IRES-Sequenzen für die Rekrutierung des Ribosoms benötigt werden (Martineau et al., 2004). Ebenso könnten jedoch auch Transkriptionsfaktoren, die die Rekrutierung und Aktivierung der Polymerase vermitteln, als Erklärung dienen, sofern kryptische Promotoren in Betracht gezogen werden.

Stefan Maschke (2005) aus unserer Arbeitsgruppe konnte in seiner Diplomarbeit keine kryptische Promotoraktivität der EMCV-IRES-Sequenz in HeLa- und RT4-AC-Zellen nachweisen. Da HeLa-Zellen human-epithelialen Ursprungs sind (Jones et al., 1971) und RT4-AC-Zellen aus peripheren Neuroblastomen der Ratte stammen (Donahue et al., 1996), in diesen Gewebetypen der Cx45KI36-Tiere jedoch keine Hintergrundexpression der β -Galaktosidase festgestellt wurde, ist weiterhin nicht ausgeschlossen, dass eine kryptische Promotoraktivität erst mit der Anwesenheit anderer zelltypspezifischer Transkriptionsfaktoren wie z.B. aus Herz- (z.B. H9c2, Levy et al, 1996), Glattrnuskel- (z.B. A10, Kimes et al., 1976) oder Neuronen-Zelllinien des zentralen Nervensystems (z.B. B35, Otey et al., 2003) auftritt.

Die oben diskutierten Möglichkeiten könnten somit einerseits die, im Vergleich zur Cx45lacZ-Maus, schwächere IRES-gesteuerte Expression des LacZ-Reportergens in Cx45KI36-Geweben, andererseits die β -Galaktosidase-Aktivität in Kontrolltieren erklären.

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Expression des Cx36-Gens nur Cre-vermittelt einsetzt, die Ausprägung des LacZ-Reportergens jedoch auch von zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren über die putative kryptische Promotorstruktur der IRES-Sequenz gesteuert werden kann.

5.4.2 Cx36 kann möglicherweise partiell die Funktion von Cx45 während der Embryonalentwicklung übernehmen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein genereller Ersatz der Cx45- kodierende Region zu embryonaler Letalität homozygoter Cx45KI36^{ki/ki}-Mäuse nach Tag 8,5 *post coitum* führt (vgl. Abschnitt 4.3.6.1). In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass homozygote Cx45KI36^{ki/ki}-Embryonen zwischen E10,5 und E11,5 versterben (Maschke, 2005). Da Cx45-defiziente Embryonen Tag 10,5 der intrauterinen Entwicklung nicht überleben (Krüger et al., 2000; Kumai et al., 2000), scheint Cx36 somit einen transient-substituierenden Effekt während der Embryonalentwicklung zu besitzen.

Als Todesursache Cx45-defizienter Embryonen werden Defekte in der Differenzierung der Zellen des Endokardkissens zu myokardialen Trabekeln (Kumai et al., 2000) und in der Differenzierung glatter Muskelzellen des Blutgefäßsystems diskutiert (Krüger et al., 2000), die sekundär die Verdünnung der ventrikulären Herzwand und Veränderungen in der Erregungsleitung auslösen könnten. Auch in 10,5 Tage alten homozygoten Cx45KI36^{ki/ki}-Embryonen wurde eine Dilatation des Herzens festgestellt (Maschke, 2005), die für Cx45-defiziente Tiere an Tag 9,5 der Entwicklung beschrieben wurde (Kumai et al., 2000; Krüger et al., 2000).

Möglicherweise kann Cx36 mit seiner, im Vergleich zu Cx45, um etwa 50% geringeren Einzelkanalleitfähigkeit und der mehr als fünffach größeren Spannungssensitivität (Cx45: 32±8 pS; ±13,4 mV (Moreno et al., 1995); Cx36: 10-15 pS; ±75 mV (Srinivas et al., 1999)) nur in der ersten Hälfte der Embryonalentwicklung die Funktionen der Cx45-Kanäle übernehmen, wie z.B. die Koordination der ersten langsamen Bewegungen des tubulären Herzens (Alcoléa et al., 1999). Im Zuge der weiteren Differenzierung sind möglicherweise die restriktiveren elektrophysiologischen Eigenschaften der Cx45-Gap Junctions erforderlich. Ab Tag 10 der embryonalen Entwicklung konnte Cx45 nicht mehr in Myozyten nachgewiesen werden; Alcoléa et al. (1999) postulierten daher, dass Cx45 ab diesem Zeitpunkt nur noch im Reizleitenden System exprimiert wird, das sich ab Tag 10,5 *post coitum* bildet. Es wäre denkbar, dass Cx36-Kanäle durch ihre geringere Spannungssensitivität die Weiterleitung elektrischer Signale nicht optimal gewährleisten können und daher zu ungleichmäßigen, letalen Kontraktionen des Herzens führen.

Dies scheint jedoch nur während der Embryonalentwicklung ausschlaggebend zu sein. Cx45KI36^{fl/fl}-Tiere, die, durch die bisher nicht veröffentlichte Nestin-Cre-Aktivität im Reizleitenden System, einen homozygoten Ersatz der Cx45- durch Cx36-Kanäle z.B. im Atrioventrikularknoten zeigen, waren lebensfähig und fertil. Möglicherweise zeigen diese Tiere jedoch spezifische Herzdefekte, die nur mit elektrophysiologischen Methoden zu erfassen sind.

5.3.3 Morphologische Veränderungen enterischer Nerven von Cx45KI36^{fl/fl}: Nestin-Cre-Tieren

Der Neuronen-spezifische Austausch von Cx45 gegen Cx36 führt im enterischen Nervensystem zu morphologischen Veränderungen, die in Darmneuronen von Cx45KI36^{fl/+}:SMMHC-Cre-Tieren nicht auftraten (vgl. Abb. 4.3.8). Möglicherweise hängt dieser Unterschied mit der Menge des exprimierten Cx36-Proteins, die in heterozygot-gefloxten Cx45KI36^{fl/+}:SMMHC-Cre-Tieren geringer sollte das Expressionsniveau als im homozygoten Zustand, zusammen. In jedem Fall könnte eine heteromere Kopplung zwischen Cx36-exprimierenden enterischen Neuronen und Cx45-exprimierenden Glattmuskelzellen (Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Cre) bzw. Neuronen stattfinden, die Cx45 ausprägen und Glattmuskelzellen, die das Cx36-Protein exprimieren (Cx45KI36^{fl/+}:SMMHC-Cre). Ein generelles Auftreten bzw. die Funktionalität dieser Kanalzusammensetzung wurde bereits nachgewiesen (Feigenspan et al., 2001; Maxeiner et al., 2005). Möglicherweise findet in diesen heterotypisch gekoppelten Zellen durch die unterschiedlichen funktionalen Eigenschaften (vgl. 5.3.4) eine einseitige Weiterleitung von Ionen oder Metaboliten, die sich negativ auf die Neuronen auswirken könnten, statt. Dass Neurone und Glattmuskelzellen funktional gekoppelt sind, wurde durch Farbstoffinjektionen in co-kultivierte Glattmuskelzellen und Dorsalwurzel-Ganglien des Colons der Ratte nachgewiesen (Ennes et al., 1999).

Da eine heterotypische Kopplung zwischen Cx45 und Cx36 bisher nur für neuronale Zellen, nicht aber für Zellen unterschiedlichen Ursprungs gezeigt wurde, wäre es ebenso möglich, dass die betreffenden Zellen der oben genannten Genotypen entkoppelt werden. Der dann fehlende metabolische Kontakt könnte ebenfalls zu morphologischen Änderungen führen.

5.4.4 Ersetzbarkeit heterotypischer Cx45/Cx36- durch homotypische Cx36/Cx36-Gap Junctions in der Retina

In ersten Untersuchungen an Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Cre-Tieren wurden keine Veränderungen des Elektroretinogramms im Vergleich zu Cx45KI36^{fl/fl}-Kontrolltieren gefunden (vgl. Abschnitt 4.3.6.3). Im Gegensatz dazu resultierte die Nestin-Cre-vermittelte Deletion von Cx45 in einer Reduktion der b-Welle, die die gesamte elektrische Aktivität repräsentiert, die von den Interneuronen der Retina übermittelt wird (Maxeiner et al., 2005). Ein starker Abfall in der Aktivität retinaler Interneurone, wie Bipolar- und Amakrinzellen, die über heterotypische Gap Junction-Kanäle verbunden sind, wurde auf den Verlust der Kopplung zwischen diesen beiden Zelltypen zurückgeführt.

In Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Cre-Tieren wird die ursprünglich heterotypische elektrische Synapse durch einen homotypischen Cx36-Kanal ersetzt. Auf diese Weise sind Amakrin- und Bipolarzellen weiterhin gekoppelt, wobei die Gleichrichter-Funktion dieser elektrischen Synapse aufgehoben sein könnte, die normalerweise die Übermittlung elektrischer Information von AII Amakrinzellen zu ON-Zapfen Bipolarzellen erlaubt, jedoch nicht *vice versa* (Veruki und Hartveit, 2002). Ob dies einen Einfluss auf das Sehverhalten der betreffenden Tiere hat, müssen weitere elektrophysiologische Untersuchungen zeigen.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse zur Erzeugung der Cx45KI36-Mauslinie darauf hin, dass der heterozygote Ersatz von Cx45 durch Cx36 im gesamten Körper keine offensichtlichen funktionellen und histologischen Auswirkungen hat, im homozygoten Zustand jedoch zu einem letalen Phänotyp führt. Allerdings überleben homozygote Cx45KI36^{ki/ki}-Embryonen nach ersten Analysen einen Tag länger als Cx45^{-/-}-Tiere. In der Retina scheint die Einschränkung der Aktivität retinaler Interneurone in Cx45-defizienten Tieren durch Cx36-Kanäle ausgeglichen werden zu können. Somit ist ein eingeschränkter konditioneller Ersatz des Cx45- durch das Cx36-Protein in der Maus möglich.

6. Ausblick

6.1 Weitere Anwendungen der zelltypspezifischen Inaktivierung von Connexinen in viszerale Glattmuskelzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass neben Cx43 nur Cx45 als weiteres Connexin der viszerale Muskulatur des Maus-Darms exprimiert wird. Da Tamoxifen-behandelte Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2}-Tiere eine Reduktion des gastrointestinalen Transports und eine veränderte Kontraktilität der intestinalen Muskulatur aufwiesen, jedoch keine schwerwiegende Einschränkung der gesamten gastrointestinalen Funktion auftrat, sollte überprüft werden, ob ein gleichzeitiges Ausschalten von Cx43 und Cx45 den bisherigen Phänotyp verändert. Die Glattmuskel-spezifische Deletion des Cx45-Gens führte, ähnlich wie der Verlust der Cx43-vermittelten Kopplung, zu einer Verlängerung der Darmpassage (S. Maxeiner, persönliche Mitteilung). In Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}/Cx45^{fl/fl}; SM-CreER^{T2}-Tieren könnte mit Hilfe der etablierten und in dieser Arbeit vorgestellten Methoden sowie in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Prof. J. Kalff (Bonn) oder Prof. G. Pfitzer (Köln) die koordinierte Funktion von Connexinen in der Muskulatur des gastrointestinalen Systems untersucht werden. Dabei sollte ein additiver Phänotyp erwartet werden, der zu weiteren Einschränkungen der Darmmotilität führt. Ähnlich wie von Kito und Suzuki (2003) beschrieben, könnte mit Hilfe von Farbstoffinjektionen in Glattmuskelpräparate des Darms zusätzlich der Kopplungsverlust auf Zellebene untersucht werden. Dabei kann je nach Positionierung der von Mucosa und Submucosa befreiten Tunica muscularis zwischen dem Kopplungsverhalten der zirkulären sowie der longitudinalen Muskelschicht unterschieden werden. Der Darm der Maus bietet daher die Möglichkeit, eindeutig zwischen Connexin-vermitteltem Einfluss und anderen Faktoren hinsichtlich der intestinalen Muskelkontraktion zu differenzieren.

Im Uterus würde die Untersuchung der oben genannten Tiere wahrscheinlich zu keiner Veränderung des Geburtsverhaltens führen, da die Expression des Cx45-Gens vor der Geburt durch hormonelle Regulationsmechanismen erniedrigt wird. Für Cx40 wurde eine solche Regulation bisher nicht beschrieben. Daher wäre es interessant, zunächst das Expressionsprofil dieses Connexingens im Myometrium der Maus vor und während der Schwangerschaft sowie während der Geburt zu untersuchen. Außerdem könnten Tiere des Genotyps Cx40^{-/-}/Cx43^{fl/fl};SM-CreER^{T2} erzeugt und nach Tamoxifen-Behandlung auf mögliche Veränderungen des Geburtsverhaltens überprüft werden.

6.2 Weiterführende Untersuchungen zur neuronalen Expression von Cx43

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Cx43 Neuronen-spezifisch im Gehirn adulter Mäuse exprimiert werden kann. Die verwendeten Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere zeigten neben verhaltensspezifischen Veränderungen und einer verstärkten Epileptisieneigung auch Änderungen der neuronalen Zytoarchitektur. Da eine Beeinflussung des zellulären Wanderungsverhaltens durch die Ausprägung des Cx43-Gens gezeigt wurde (Huang et al., 1998; Perez Velazquez et al., 1996; Fushiki et al., 2003), erscheint es möglich, dass die beschriebenen histologischen Änderungen des Hippocampus transgener Tiere durch die neuronale Expression des Cx43-Gens von der Neurogenese bis zum Adultstadium mit bedingt werden könnten.

Um diese Hypothese zu überprüfen, könnten die Gehirne prä- und postnataler Cx43^{TetOeGFP}:CaMKII α -tTA-Tiere präpariert und die Verteilung der eGFP-positiven Neurone mit dem bekannten Muster der neuronalen Migration verglichen werden (Marín und Rubenstein, 2003). Im postnatalen Tier kann die Wanderung neu gebildeter postmitotischer Neurone gut anhand des Rostalen Migratorischen Stroms von der Subventrikularzone zum Riechkolben untersucht werden. Dazu könnten Matrigel-Kulturen von Explantaten der Subventrikularzone junger Mäuse angelegt und das Migrationsverhalten der Zellen bestimmt werden (Wichterle et al., 1997; Hack et al., 2002).

Die Auswirkung der Cx43-Expression in adulten olfaktorischen Neuronen könnte durch verhaltensbiologische Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Dr. Ekrem Dere (Düsseldorf) durchgeführt werden. Dabei wäre interessant, ob die Kopplung von olfaktorischen Körnerzellen, für die eine Expression von Cx36 beschrieben wurde (Kosaka et al., 2005; Degen et al., 2004), durch die Ausprägung von Cx43 beeinflusst und das Riechvermögen der Tiere verändert wird.

Anhand weiterer Phosphorylierungsstudien an Neuronen könnte überprüft werden, in wieweit Kinasen zur postulierten Kopplungsregulation transgener Neurone beitragen. Dazu könnten neuronale Zellkulturen aber auch frisch kultivierte hippocampale Dickschnitte verschiedenen Alters metabolisch mit ³²P-Orthophosphat markiert werden. So könnte überprüft werden, ob sich die Menge an phosphoryliertem Cx43-Protein altersabhängig ändert. Zur Untersuchung der verantwortlichen Kinase könnten die Zellen bzw. Schnitte mit aktivierenden (z.B. TPA für die Proteinkinase C oder cAMP für die Proteinkinase A) bzw. hemmenden Substanzen (Staurosporin als allgemeiner Hemmer der Kinaseaktivität oder spezifischere Chemikalien zur Hemmung einzelner Kinasen) eingesetzt werden. Dadurch könnte der für die postulierte Phosphorylierung verantwortliche Kinasetyp bestimmt werden. Ähnliche Ergebnisse könnten auch durch Immunoblot-Analysen erzielt werden, in denen Gehirnllysate von Tieren unterschiedlichen Alters auf die Expressionsstärke verschiedener Kinasen untersucht würden. Zusätzlich könnte durch

Farbstoffinjektionen in Zellkulturen geprüft werden, ob die Aktivierung bestimmter Kinasen und die dadurch erfolgte Cx43-Phosphorylierung tatsächlich die interzelluläre Kopplung beeinflusst.

Für eine genauere Charakterisierung des epileptischen Phänotyps sollten elektrophysiologische Untersuchungen an hippocampalen Dickschnitten durchgeführt werden. Hierbei könnte überprüft werden, ob durch (axonale) Gap Junction-vermittelte Kopplung oszillatorische Veränderungen des Elektroenzephalogramms hervorgerufen werden, die die Ausprägung epileptischer Anfälle begünstigen könnten. Mit ersten Untersuchungen dieser Art wurde bereits von der Arbeitsgruppe um Prof. A. Draguhn (Heidelberg) begonnen.

Da Cx43 im adulten Skelettmuskel, ähnlich wie in den meisten Neuronen nicht exprimiert wird (Araya et al., 2004), besteht eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Cx43^{TetOeGFP}-Tiere in der Untersuchung der funktionellen Cx43-Regulation während der Skelettmuskeldifferenzierung und -regeneration. Dazu wurden Cx43^{TetOeGFP}-Mäuse mit Tieren verpaart, die das tTA-Protein unter der Kontrolle des Muskel-spezifischen Creatin-Kinase-Promotor exprimierten (MCK-tTA; Ghersa et al., 1998). Diese Tiere werden momentan von Julia von Maltzahn (Bonn) untersucht.

6.3 Charakterisierung der Cx45KI36-Mauslinie

Für die weitere Charakterisierung der Cx45KI36-Linie bieten sich besonders Untersuchungen mit neuronalem Bezug an. Aufgrund der vorläufigen Ergebnisse zur retinalen Signalübertragung sollten weitere ERG-Messungen durchgeführt werden, um die physiologische Relevanz homotypischer Kanäle zwischen AII Amakrin- und ON-Zapfen Bipolarzellen zu überprüfen.

Da im Rahmen dieser Arbeit histologische Veränderungen enterischer Neurone von Cx45KI36^{fl/fl}:Nestin-Cre-Tieren gezeigt wurden, könnten genauere Untersuchungen Aufschluss darüber geben, warum Cx36 offenbar im Auerbach-Plexus embryonaler Mäuse vorhanden ist, im adulten Tier jedoch nicht mehr exprimiert wird (Degen, 2004). Weiter könnte geklärt werden, zu welchen Auswirkungen eine Ausprägung dieses Connexin-Proteins (anstelle von Cx45) in enterischen Neuronen führt. Zur Untersuchung möglicher Änderungen von Motilität und Kontraktion könnte auf die in dieser Arbeit etablierten Techniken zurückgegriffen werden.

Weitere zukünftige Charakterisierungen sollten sich zudem mit der Aufklärung der embryonalen Letalität homozygoter Cx45KI36^{ki/ki}-Mäuse befassen. Bisher wurde nicht untersucht, ob diesem Phänotyp ähnliche Ursachen zugrunde liegen wie für Cx45-defiziente Mäuse beschrieben (Kumai et al., 2000; Krüger et al., 2000). Daher wären histologische Untersuchungen des embryonalen Herzens nötig. Weiter könnte an lebensfähigen heterozygoten Cx45KI36^{ki/+}-

Mäusen sowie Tieren mit homozygotem Herz-spezifischem Austausch des Cx45- gegen das Cx36-Protein (Cx45KI36^{fl/fl}:MyHC-Cre) überprüft werden, ob elektrophysiologische Änderungen der Reizweiterleitung festzustellen sind (beispielsweise in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um PD Dr. K. Tiemann, Bonn). Dies könnte möglicherweise auch Rückschlüsse auf den Grund der embryonalen Letalität erlauben.

7. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe verschiedener transgener Mausmodelle die Funktion unterschiedlicher Vertreter der Connexin-Genfamilie untersucht.

Durch die Erzeugung von Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Mäusen zur Tamoxifen-induzierbaren Deletion der Cx43-kodierenden Region in viszeralen glatten Muskelzellen wurde eine nahezu vollständige Ausschaltung im Darm bzw. eine 30- bis 40-prozentige Ausschaltung im Uterus erreicht. Funktionell zeigten diese Tiere Veränderungen in der Kontraktionsfähigkeit der glatten Muskulatur, eine um 29% verringerte gastrointestinale Transitzeit und eine um mehr als das Doppelte erhöhte viszerale Schmerzwahrnehmung. Histologisch wiesen die Tiere Veränderungen der Schrittmacherzellen des gastrointestinalen Traktes (Cajal-Zellen), eine 13-fach erhöhte Infiltration mit neutrophilen Zellen sowie eine hypertrophierte Darmwand auf. Die Gesamtheit dieser Symptome ähnelte stark bekannten gastrointestinalen Krankheitssymptomen des Menschen, wie z.B. dem Reizdarmsyndrom oder der chronischen intestinalen Pseudo-Obstruktion. Daher könnten diese Tiere neue Impulse für das Verständnis der Aetiologie intestinaler Erkrankungen liefern.

In Tamoxifen-behandelten Cx43^{fl/fl}:SM-CreER^{T2}-Weibchen konnte ein Zusammenhang zwischen dem Glattmuskel-spezifischen Verlust der Cx43-vermittelten Kopplung und dem Auftreten von Geburtsproblemen nachgewiesen werden. Mehr als 80% dieser Tiere zeigten eine Verlängerung des Geburtsvorgangs. Molekular wurde dieser Defekt nicht von veränderten endogenen Hormonkonzentrationen oder der Regulation Kontraktions-abhängiger Protein-Gene bestimmt, sondern konnte allein durch die eingeschränkte Gap Junction-vermittelte Kopplung zwischen myometrialen Zellen begründet werden. Klinisch könnten diese Erkenntnisse beispielsweise zur Therapie frühgeburtlicher Kontraktionen des Uterusmuskels beitragen.

Ein Verlust der Cx43-abhängigen koordinierten Kontraktion viszeraler glatter Muskelzellen kann somit in funktionellen physiologischen Konsequenzen sowohl im Darm als auch im Uterus resultieren.

Zur Untersuchung der spezifischen Relevanz der neuronalen Cx43-Regulation während der Gehirnentwicklung wurden durch Vorkerninjektion des Vektorkonstrukts pTetOCMVbi-Cx43-eGFP-Isolator transgene Cx43^{TetOeGFP}-Tiere hergestellt und charakterisiert. Durch Verpaarung mit CaMKII α -tTA-Mäusen wurde eine Neuronen-spezifische Expression des Cx43- und des eGFP-Reportergens erreicht. Neben motorischen und Angst-assoziierten Verhaltensänderungen zeigten diese Tiere Unterschiede in cerebralen Neurotransmitterkonzentrationen sowie eine verstärkte Epilepsie-Anfälligkeit. Weiter wurden histologische Veränderungen der Zytostuktur

des Hippocampus festgestellt, die möglicherweise durch eine Cx43-abhängige, veränderte neuronalen Migration begründet sind. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die entwicklungsspezifische Regulation der neuronalen Cx43-Expression einen entscheidenden Einfluss auf die Physiologie des Gehirns besitzt und die Entkopplung der Neurone während der Differenzierung ein wichtiges Merkmal der Cortikogenese darstellt.

Zur Überprüfung der funktionellen Ersetzbarkeit von Cx45- durch Cx36-Gap Junction-Kanäle wurde ein Austauschvektor zur homologen Rekombination in embryonalen Maus-Stammzellen kloniert. Nach Transfektion des Vektors und Selektion der ES-Zellen wurden über Blastozysteninjektionen dieser Zellen chimären Mäuse hergestellt. Durch die Verpaarung der Chimären mit C75BL/6-Mäusen wurde die transgene Mauslinie Cx45KI36 etabliert. Tiere, die homozygot für den Austausch der Cx45- gegen die Cx36-kodierende Region im gesamten Körper waren, starben zwischen Tag 10,5 und 11,5 der Embryonalentwicklung und damit einen Tag später als Cx45-defiziente Mäuse. Daher scheint Cx36 zumindest transient die Funktionen von Cx45 in der Entwicklung übernehmen zu können. Erste Untersuchungen zum zelltypspezifischen Ersatz des Cx45- durch das Cx36-Gen in der Retina wiesen ebenfalls auf eine gewisse funktionelle Redundanz der beiden Proteine hin. Somit wurde ein Mausmodell erzeugt, dass zum weiteren funktionalen Verständnis der hohen, in Säugern bestehenden Connexindiversität beitragen kann.

8. Literaturverzeichnis

- Agah R, Frenkel PA, French BA, Michael LH, Overbeek PA, Schneider MD. Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. *J Clin Invest.* 1997;100:169-179.
- Akagi K, Sandig V, Vooijs M, van der Valk M, Giovannini M, Strauss M, Berns A. Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:1766-1773.
- Alcoléa S, Theveniau-Ruissy M, Jarry-Guichard T, Marics I, Tzouanacou E, Chauvin JP, Briand JP, Moorman AF, Lamers WH, Gros DB. Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circ Res.* 1999;84:1365-1379.
- Alcoléa S, Jarry-Guichard T, de Bakker J, Gonzalez D, Lamers W, Coppens S, Barrio L, Jongsma H, Gros D, van Rijen H. Replacement of connexin40 by connexin45 in the mouse: impact on cardiac electrical conduction. *Circ Res.* 2004;94:100-9.
- Albrecht JL, Atal NS, Tadros PN, Orsino A, Lye SJ, Sadovsky Y, Beyer EC. Rat uterine myometrium contains the gap junction protein connexin45, which has a differing temporal expression pattern from connexin43. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;175:853-8.
- Al-Matubsi HY, Eis AL, Brodt-Eppley J, MacPhee DJ, Lye S, Myatt L. Expression and localization of the contractile prostaglandin F receptor in pregnant rat myometrium in late gestation, labor, and postpartum. *Biol Reprod.* 2001;65:1029-37.
- Altevogt BM, Kleopa KA, Postma FR, Scherer SS, Paul DL. Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci.* 2002;22:6458-6470.
- Alves LA, Campos de Carvalho AC, Cirne Lima EO, Rocha e Souza CM, Dardenne M, Spray DC, Savino W. Functional gap junctions in thymic epithelial cells formed by connexin 43. *Eur J Immunol.* 1995;25:431-437.
- Araya R, Eckardt D, Maxeiner S, Küger O, Theis M, Willecke K, Saez JC. Expression of connexins during differentiation and regeneration of skeletal muscle: functional relevance of connexin43. *J Cell Sci.* 2005;118:27-37.
- Arosh JA, Banu SK, Chapdelaine P, Fortier MA. Temporal and tissue-specific expression of prostaglandin receptors EP2, EP3, EP4, FP, and cyclooxygenases 1 and 2 in uterus and fetal membranes during bovine pregnancy. *Endocrinology.* 2004;145:407-17.
- Ausubel FM, Brent A, Kingston RE, Moore DD, Seidman JA, Struhk K. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York, 1989.
- Baimbridge KG, Peet MJ, McLennan H, Church J. Bursting response to current-evoked depolarization in rat CA1 pyramidal neurons is correlated with lucifer yellow dye coupling but not with the presence of calbindin-D28k. *Synapse.* 1991;7:269-77.
- Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM, Corinaldesi R. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2004;126:693-702.
- Balducci J, Risek B, Gilula NB, Hand A, Egan JF, Vintzileos AM. Gap junction formation in human myometrium: a key to preterm labor? *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168:1609-15.
- Baron U, Freundlieb S, Gossen M, Bujard H. Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res.* 1995;23: 3605-3606.
- Barrio LC, Capel J, Jarillo JA, Castro C, Revilla A. Species-specific voltage-gating properties of connexin-45 junctions expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 1997;73:7577-69.
- Barros FC, Victora CG, Barros AJ, Santos IS, Albernaz E, Matijasevich A, Domingues MR, Sclowitz IK, Hallal PC, Silveira MF, Vaughan JP. The challenge of reducing neonatal mortality in middle-income countries: findings from

three Brazilian birth cohorts in 1982, 1993, and 2004. *Lancet*. 2005;365:847-54.

Bayer KU, Lohler J, Schulman H, Harbers K. Developmental expression of the CaM kinase II isoforms: ubiquitous gamma- and delta-CaM kinase II are the early isoforms and most abundant in the developing nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999;70:147-54.

Bell AC, Felsenfeld G. Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 1999;9, 191-198.

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

Bayliss WM, Starling EH. The movement and innervation of the small intestine. *J. Physiol*. 1899;24, 99-143.

Beato M, Herrlich P, Schütz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*. 1995;83:851-857.

Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1985;14:375-403

Bennett MV. Gap junctions as electrical synapses. *J.Neurocytol*. 1997;26, 349-366.

Benson DL, Isackson PJ, Hendry SH, Jones EG. Differential gene expression for glutamic acid decarboxylase and type II calcium-calmodulin-dependent protein kinase in basal ganglia, thalamus, and hypothalamus of the monkey. *J Neurosci*. 1991;11:1540-64.

Berkeley JL, Decker MJ, Levey AI. The role of muscarinic acetylcholine receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in pilocarpine-induced seizures. *J Neurochem*. 2002;82:192-201.

Beyer EC, Goodenough DA, Paul DL. The connexins, a family of related gap junction proteins. In: *Gap Junctions*. (Ed. R. Werner). New York, USA, 1988.

Bibby E, Stewart A. The epidemiology of preterm birth. *Neuro Endocrinol Lett*. 2004;25:43-7.

Bittman K, Owens DF, Kriegstein AR, LoTurco JJ. Cell coupling and uncoupling in the ventricular zone of developing neocortex. *J Neurosci*. 1997;17:7037-44.

Bittman KS, LoTurco JJ. Differential regulation of connexin 26 and 43 in murine neocortical precursors. *Cereb Cortex*. 1999;9:188-95.

Bittman K, Becker DL, Cicirata F, Parnavelas JG. Connexin expression in homotypic and heterotypic cell coupling in the developing cerebral cortex. *J Comp Neurol*. 2002;443:201-12.

Black PN, Young PG, Skinner SJ. Response of airway smooth muscle cells to TGF-beta 1: effects on growth and synthesis of glycosaminoglycans. *Am J Physiol*. 1996;271:L910-7.

Blennerhassett MG, Vignjevic P, Vermillion DL, Collins SM. Inflammation causes hyperplasia and hypertrophy in smooth muscle of rat small intestine. *Am J Physiol*. 1992;262:1041-6.

Borges K, Gearing M, McDermott DL, Smith AB, Almonte AG, Wainer BH, Dingledine R. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp Neurol*. 2003;182:21-34.

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

Brink PR, Valiunas V, Christ GJ. Homotypic, heterotypic, and homomeric gap junction channels. In: *Gap Junctions. Molecular basis of cell communication in health and disease*. Ed. Camillo Peracchia. Academic Press, 2000.

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

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

- Buchholz F, Angrand PO, Stewart AF. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol* 1998;16:657-662.
- Bueno L, Fioramonti J, Delvaux M, Frexinos J. Mediators and pharmacology of visceral sensitivity: from basic to clinical investigations. *Gastroenterology*. 1997;112:1714-43.
- Bukauskas FF, Elfgang C, Willecke K, Weingart R. Heterotypic gap junction channels (connexin26-connexin32) violate the paradigm of unitary conductance. *Biophys J*. 1995;68:2289-98
- Buckmaster PS, Zhang GF, Yamawaki R. Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit. *J Neurosci*. 2002;22:6650-8.
- Burgin KE, Waxham MN, Rickling S, Westgate SA, Mobley WC, Kelly PT. In situ hybridization histochemistry of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J Neurosci*. 1990;10:1788-98.
- Brune H. Konstruktion und Test eines Vektors zur zell- bzw. entwicklungsspezifischen Deletion des Cx45-Gens in der Maus. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. 2000.
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM. XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*. 1987;5:376-380.
- Buhl DL, Harris KD, Hormuzdi SG, Monyer H, Buzsaki G. Selective impairment of hippocampal gamma oscillations in connexin-36 knock-out mouse in vivo. *J Neurosci* 2003;23:1013-1018.
- Butterweck A, Elfgang C, Willecke K, Traub O. Differential expression of the gap junction proteins connexin45, -43, -40, -31, and -26 in mouse skin. *Eur J Cell Biol*. 1994a;65:152-63
- Butterweck A, Gergs U, Elfgang C, Willecke K, Traub O. Immunochemical characterization of the gap junction protein connexin45 in mouse kidney and transfected human HeLa cells. *J Membr Biol*. 1994b;141:247-56.
- Burgin KE, Waxham MN, Rickling S, Westgate SA, Mobley WC, Kelly PT. In situ hybridization histochemistry of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J Neurosci*. 1990;10:1788-98.
- Buzsaki G. Electrical wiring of the oscillating brain. *Neuron* 2001;31:342-344.
- Cai J, Cheng A, Luo Y, Lu C, Mattson MP, Rao MS, Furukawa K. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J Neurochem*. 2004;88:212-26.
- Calabrese A, Guldenagel M, Charollais A, Mas C, Caton D, Bauquis J, Serre-Beinier V, Caille D, Söhl G, Teubner B, Le Gurun S, Trovato-Salinaro A, Condorelli DF, Haefliger JA, Willecke K, Meda P. Cx36 and the function of endocrine pancreas. *Cell Commun Adhes* 2001;8:387-391.
- Calabrese A, Zhang M, Serre-Beinier V, Caton D, Mas C, Satin LS, Meda P. Connexin 36 controls synchronization of Ca^{2+} oscillations and insulin secretion in MIN6 cells. *Diabetes* 2003;52:417-424.
- Camborova P, Hubka P, Sulkova I, Hulin I. The pacemaker activity of interstitial cells of Cajal and gastric electrical activity. *Physiol Res*. 2003;52:275-84.
- Caton D, Calabrese A, Mas C, Serre-Beinier V, Charollais A, Caille D, Zufferey R, Trono D, Meda P. Lentivirus-mediated transduction of connexin cDNAs shows level- and isoform-specific alterations in insulin secretion of primary pancreatic beta-cells. *J Cell Sci* 2003;116:2285-2294.
- Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 1989;244, 1288-1292.
- Carlen PL, Skinner F, Zhang L, Naus C, Kushnir M, Perez Velazquez JL. The role of gap junctions in seizures. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000;32:235-41.
- Cases O, Vitalis T, Seif I, De Maeyer E, Sotelo C, Gaspar P. Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron*. 1996;16:297-307.
- Castro CH, Stains JP, Sheikh S, Szejnfeld VL, Willecke K, Theis M, Civitelli R. Development of mice with osteoblast-specific connexin43 gene deletion. *Cell Commun. Adhes*. 2003;10, 445-450.

- Cavazos JE, Zhang P, Qazi R, Sutula TP. Ultrastructural features of sprouted mossy fiber synapses in kindled and kainic acid-treated rats. *J Comp Neurol*. 2003;458:272-92.
- Chadwick VS, Chen W, Shu D, Paulus B, Bethwaite P, Tie A, Wilson I. Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2002;122:1778-83.
- Challis JRG, Lye SJ. The physiology of reproduction. In Parturition. (F. Knobil and J.D. Neill, eds), 1994; 985-1031. Raven Press Ltd., New York
- Chang Q, Gonzalez M, Pinter MJ, Balice-Gordon RJ. Gap junctional coupling and patterns of connexin expression among neonatal rat lumbar spinal motor neurons. *J Neurosci*. 1999;19:10813-28.
- Chanson M, Berclaz PY, Scerri I, Dudez T, Wernke-Dollries K, Pizurki L, Pavirani A, Fiedler MA, Suter S. Regulation of gap junctional communication by a pro-inflammatory cytokine in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-expressing but not cystic fibrosis airway cells. *Am J Pathol*. 2001;158:1775-84.
- Cheng A, Tang H, Cai J, Zhu M, Zhang X, Rao M, Mattson MP. Gap junctional communication is required to maintain mouse cortical neural progenitor cells in a proliferative state. *Dev Biol*. 2004;272:203-16.
- Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*. 1987;7:2745-52
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 1987;162, 156-159.
- Chow, L. and Lye, S.J. Expression of the gap junction protein connexin-43 is increased in the human myometrium toward term and with the onset of labor. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;170:788-95.
- Créancier L, Morello D, Mercier P, Prats AC. Fibroblast growth factor 2 internal ribosome entry site (IRES) activity ex vivo and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation. *J Cell Biol*. 2000;150:275-81.
- Créancier L, Mercier P, Prats AC, Morello D. c-myc Internal ribosome entry site activity is developmentally controlled and subjected to a strong translational repression in adult transgenic mice. *Mol Cell Biol*. 2001;21:1833-40.
- Christ GJ, Spray DC, el-Sabban M, Moore LK, Brink PR. Gap junctions in vascular tissues. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone. *Circ Res*. 1996;79:631-646.
- Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 1987;23:953-968.
- Condorelli DF, Parenti R, Spinella F, Trovato SA, Belluardo N, Cardile V, Cicirata F. Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur J Neurosci* 1998;10:1202-1208.
- Condorelli DF, Mudo G, Trovato-Salinaro A, Mirone MB, Amato G, Belluardo N. Connexin-30 mRNA is up-regulated in astrocytes and expressed in apoptotic neuronal cells of rat brain following kainate-induced seizures. *Mol Cell Neurosci*. 2002;21:94-113.
- Condorelli DF, Trovato-Salinaro A, Mudo G, Mirone MB, Belluardo N. Cellular expression of connexins in the rat brain: neuronal localization, effects of kainate-induced seizures and expression in apoptotic neuronal cells. *Eur J Neurosci*. 2003;18:1807-27.
- Connors BW, Benardo LS, Prince DA. Coupling between neurons of the developing rat neocortex. *J Neurosci*. 1983;3:773-82.
- Constantin B, Cronier L. Involvement of gap junctional communication in myogenesis. *Int Rev Cytol*. 2000;196:1-65.
- Cook JL, Zaragoza DB, Sung DH, Olson DM. Expression of myometrial activation and stimulation genes in a mouse model of preterm labor: myometrial activation, stimulation, and preterm labor. *Endocrinology*. 2000;141:1718-28.

- Coppen SR, Dupont E, Rothery S, Severs NJ. Connexin45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart. *Circ Res.* 1998;82:232-43.
- Coppen SR, Kodama I, Boyett MR, Dobrzynski H, Takagishi Y, Honjo H, Yeh HI, Severs NJ. Connexin45, a major connexin of the rabbit sinoatrial node, is co-expressed with connexin43 in a restricted zone at the nodal-crista terminalis border. *J Histochem Cytochem.* 1999;47:907-18.
- Dailey JW, Mishra PK, Ko KH, Penny JE, Jobe PC. Serotonergic abnormalities in the central nervous system of seizure-naïve genetically epilepsy-prone rats. *Life Sci.* 1992;50:319-26.
- Dahl E, Winterhager E, Reuss B, Traub O, Butterweck A, Willecke K. Expression of the gap junction proteins connexin31 and connexin43 correlates with communication compartments in extraembryonic tissues and in the gastrulating mouse embryo, respectively. *J Cell Sci.* 1996;109:191-197.
- Daniel EE, Wang YF, Cayabyab FS. Role of gap junctions in structural arrangements of interstitial cells of Cajal and canine ileal smooth muscle. *Am J Physiol.* 1998;274:G1125-41.
- Daniel EE, Wang YF. Gap junctions in intestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech.* 1999;47:309-20.
- Daniel EE, Thomas J, Ramnarain M, Bowes TJ, Jury J. Do gap junctions couple interstitial cells of Cajal pacing and neurotransmission to gastrointestinal smooth muscle? *Neurogastroenterol Motil.* 2001;13:297-307.
- Daniel EE. Communication between interstitial cells of Cajal and gastrointestinal muscle. *Neurogastroenterol Motil.* 2004;16:118-22.
- Davies TC, Barr KJ, Jones DH, Zhu DG, Kidder GM. Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse. *Dev Genet.* 1996;18:234-243.
- Davis M. Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biol Psychiatry* 1998;44:1239-1247.
- Dazzi L, Serra M, Spiga F, Pisu MG, Jentsch JD, Biggio G. Prevention of the stress-induced increase in frontal cortical dopamine efflux of freely moving rats by long-term treatment with antidepressant drugs. *Eur Neuropsychopharmacol* 2001;11:343-349.
- Deans MR, Paul DL. Mouse horizontal cells do not express connexin26 or connexin36. *Cell Commun Adhes* 2001;8:361-366.
- Deans MR, Volgyi B, Goodenough DA, Bloomfield SA, Paul DL. Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. *Neuron.* 2002;36:703-12.
- Degen, J. Erzeugung und Charakterisierung von konditionalen Knock-In Reporter-gen-Mäusen des Connexin36. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. 2004.
- Degen J, Meier C, Van Der Giessen RS, Söhl G, Petrasch-Parwez E, Urschel S, Dermietzel R, Schilling K, De Zeeuw CI, Willecke K. Expression pattern of lacZ reporter gene representing connexin36 in transgenic mice. *J Comp Neurol.* 2004;473:511-25.
- Delmar M. Connexin diversity: discriminating the message. *Circ Res.* 2002;91:85-86.
- Delmar M, Coombs W, Sorgen P, Duffy HS, Taffet SM. Structural bases for the chemical regulation of Connexin43 channels. *Cardiovasc. Res.* 2004; 62, 268-275.
- Deng C, Thomas KR, Capecchi MR. Location of crossovers during gene targeting with insertion and replacement vectors. *Mol. Cell Biol.* 1993; 13, 2134-2140.
- Der T, Bercik P, Donnelly G, Jackson T, Berezin I, Collins SM, Huizinga JD. Interstitial cells of cajal and inflammation-induced motor dysfunction in the mouse small intestine. *Gastroenterology.* 2000;119:1590-9.
- Dere E, Topic B, De Souza Silva MA, Srejic M, Frisch C, Buddenberg T, Huston JP. The graded anxiety test: a novel test of murine unconditioned anxiety based on the principles of the elevated plus-maze and light-dark test. *J Neurosci Methods.* 2002;122:65-73.

- Dermietzel R. Diversification of gap junction proteins (connexins) in the central nervous system and the concept of functional compartments. *Cell Biol Int.* 1998;22:719-30.
- De Winter BY, Boeckxstaens GE, De Man JG, Moreels TG, Herman AG, Pelckmans PA. Effect of adrenergic and nitrenergic blockade on experimental ileus in rats. *Br J Pharmacol.* 1997;120:464-8.
- Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR Primer. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995.
- Doble BW, Ping P, Kardami E. The epsilon subtype of protein kinase C is required for cardiomyocyte connexin-43 phosphorylation. *Circ.Res.* 2000;86, 293-301.
- Doetsch F, Scharff C. Challenges for brain repair: insights from adult neurogenesis in birds and mammals. *Brain Behav Evol.*;58:306-22.
- Donahue LM, Coates PW, Reinhart AJ. Characterization of developmental stage and neuronal potential of the rat PNS-derived stem cell line, RT4-AC. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996;94:67-80.
- Döring B. Untersuchungen zu gezielten, zelltypspezifischen Expressionsänderungen des Connexin43 Gens der Maus. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. 2000.
- Dorshkind K, Green L, Godwin A, Fletcher WH. Connexin-43-type gap junctions mediate communication between bone marrow stromal stem cells. *Blood.* 1993;82:38-45.
- Dragatsis I, Zeitlin S. CaMKIIalpha-Cre transgene expression and recombination patterns in the mouse brain. *Genesis.* 2000;26:133-5.
- Drapeau J, El-Helou V, Clement R, Bel-Hadj S, Gosselin H, Trudeau LE, Villeneuve L, Calderone A. Nestin-expressing neural stem cells identified in the scar following myocardial infarction. *J Cell Physiol.* 2005;204:51-62
- Dubina MV, Iatckii NA, Popov DE, Vasil'ev SV, Krutovskikh VA. Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer. *Oncogene.* 2002;21:4992-6.
- Dudek FE, Spitz M. Hypothetical mechanisms for the cellular and neurophysiologic basis of secondary epileptogenesis: proposed role of synaptic reorganization. *J Clin Neurophysiol.* 1997;14:90-101.
- Duffy HS, Delmar M, Coombs W, Taffet SM, Hertzberg EL, Spray DC. Functional demonstration of connexin-protein binding using surface plasmon resonance. *Cell Commun Adhes.* 2001;8, 225-229.
- Dumas E, Staedel C, Colombat M, Reigadas S, Chabas S, Astier-Gin T, Cahour A, Litvak S, Ventura M. A promoter activity is present in the DNA sequence corresponding to the hepatitis C virus 5' UTR. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:1275-81.
- Eberhart CE, Dubois RN. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 1995;109:285-301
- Eckardt D. Konstruktion und Anwendung eines Vektors zur induzierbaren Aktivierung der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Connexin43 Promotors in embryonalen Stammzellen der Maus. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. 1999.
- Eckardt D. Erzeugung und Charakterisierung von konditionalen Mausmutanten zur funktionellen Untersuchung von Connexin43 Gap Junction Kanälen im Herzen. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. 2004.
- Eckardt D, Theis M, Döring B, Speidel D, Willecke K, Ott T. Spontaneous ectopic recombination in cell-type-specific Cre mice removes loxP-flanked marker cassettes in vivo. *Genesis.* 2004a;38:159-65.
- Eckardt D, Theis M, Degen J, Ott T, van Rijen HV, Kirchhoff S, Kim JS, de Bakker JM, Willecke K. Functional role of connexin43 gap junction channels in adult mouse heart assessed by inducible gene deletion. *J Mol Cell Cardiol.* 2004b;36:101-10.
- Egashira K, Nishii K, Nakamura K, Kumai M, Morimoto S, Shibata Y. Conduction abnormality in gap junction protein connexin45-deficient embryonic stem cell-derived cardiac myocytes. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004;280:973-9.

- Eiberger J, Degen J, Romualdi A, Deutsch U, Willecke K, Söhl G. Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell Commun Adhes.* 2001;8:163-165.
- Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hülser DF, Willecke K. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol.* 1995;129:805-817.
- Emerson BM. Specificity of gene regulation. *Cell.* 2002;109:267-70.
- Ennes HS, Young SH, Goliger JA, Mayer EA. Chemical signaling from colonic smooth muscle cells to DRG neurons in culture. *Am J Physiol.* 1999;276:C602-10.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292:154-156.
- Fargeas MJ, Fioramonti J, Bueno L. Involvement of capsaicin-sensitive afferent nerves in the intestinal motor alterations induced by intestinal anaphylaxis in rats. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993;101:190-5.
- Farraway L, Ball AK, Huizinga JD. Intercellular metabolic coupling in canine colon musculature. *Am J Physiol.* 1995;268:C1492-502.
- Feigenspan A, Teubner B, Willecke K, Weiler R. Expression of neuronal connexin36 in AII amacrine cells of the mammalian retina. *J Neurosci.* 2001;21:230-9.
- Feil R, Brocard J, Mascres B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:10887-10890.
- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237:752-7.
- Feng L, Molnar P, Nadler JV. Short-term frequency-dependent plasticity at recurrent mossy fiber synapses of the epileptic brain. *J Neurosci.* 2003;23:5381-90.
- Fernandez-Cobo M, Gingalewski C, Drujan D, De Maio A. Downregulation of connexin 43 gene expression in rat heart during inflammation. The role of tumour necrosis factor. *Cytokine.* 1999;11:216-24.
- Fischbach GD. Synapse formation between dissociated nerve and muscle cells in low density cell cultures. *Dev Biol.* 1972;28:407-29.
- Fonseca CG, Green CR, Nicholson LF. Upregulation in astrocytic connexin 43 gap junction levels may exacerbate generalized seizures in mesial temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* 2002;929:105-16.
- Francis D, Stergiopoulos K, Ek-Vitorin JF, Cao FL, Taffet SM, Delmar M. Connexin diversity and gap junction regulation by pHi. *Dev.Genet.* 1999;24, 123-136.
- Frisch C, De Souza-Silva MA, Sohl G, Guldenagel M, Willecke K, Huston JP, Dere E. Stimulus complexity dependent memory impairment and changes in motor performance after deletion of the neuronal gap junction protein connexin36 in mice. *Behav Brain Res.* 2005;157:177-85.
- Fröscher W, Vasella F. (Eds) (1994) *Die Epilepsien.* W. deGruyter-Verl.: Berlin
- Froes MM, Correia AH, Garcia-Abreu J, Spray DC, Campos de Carvalho AC, Neto MV. Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:7541-6.
- Fujikawa DG, Itabashi HH, Wu A, Shinmei SS. Status epilepticus-induced neuronal loss in humans without systemic complications or epilepsy. *Epilepsia* 2000;41:981-991
- Fujimoto K, Nagafuchi A, Tsukita S, Kuraoka A, Ohokuma A, Shibata Y. Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *J Cell Sci.* 1997;110:311-22.
- Fushiki S, Perez Velazquez JL, Zhang L, Bechberger JF, Carlen PL, Naus CC. Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003;6:304-1

- Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Bouwer J, Tour O, Laird DW, Sosinsky GE, Tsien RY, Ellisman MH. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking, *Science*. 2002;296:503-507.
- Ghersa P, Gobert RP, Sattonnet-Roche P, Richards CA, Merlo Pich E, Hooft van Huijsduijnen R. Highly controlled gene expression using combinations of a tissue-specific promoter, recombinant adenovirus and a tetracycline-regulatable transcription factor. *Gene Ther*. 1998;5:1213-20.
- Giaume C, Tabernero A, Medina JM. Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia* 1997;21:114-123
- Giepman BN, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM, Moolenaar WH. Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol*. 2001;11:1364-1368.
- Gimlich RL, Kumar NM, Gilula NB. Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos. *J Cell Biol*. 1990;110:597-605.
- Gleeson JG. Neuronal migration disorders. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2001;7(3):167-71
- Goldstein SR, Siddhanti S, Ciaccia AV, Plouffe L Jr. A pharmacological review of selective oestrogen receptor modulators. *Hum Reprod Update*. 2000; 6:212-24
- Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:1-10.
- Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:5547-5551.
- Gossen M, Bonin AL, Bujard H. Control of gene activity in higher cells by prokaryotic regulatory elements. *TIBS* 1993;18, 471-475.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*. 1995;268:1766-1769.
- Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*. 1997;18:502-19.
- Gros, D.B., Jongsma, H.J. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 1996;18, 719-730.
- Güldenagel M, Ammermüller J, Feigenspan A, Teubner B, Degen J, Söhl G, Willecke K, Weiler R. Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin36. *J Neurosci* 2001;21:6036-6044.
- Gulisano M., Parenti R, Spinella F, Cicirata F. Cx36 is dynamically expressed during early development of mouse brain and nervous system. *Neuroreport* 2000;11:3823-3828.
- Gordon JW, Ruddle FH. Germ line transmission in transgenic mice. *Prog.Clin.Biol.Res*. 1982; 85, 111-124.
- Groenewegen HJ. The basal ganglia and motor control. *Neural Plast* 2003;10:107-120.
- Gutnick MJ, Prince DA. Dye coupling and possible electrotonic coupling in the guinea pig neocortical slice. *Science*. 1981;211:67-70.
- Guo C, Yang W, Lobe CG. A Cre recombinase transgene with mosaic, widespread tamoxifen-inducible action. *Genesis*. 2002;32:8-18.
- Hack I, Bancila M, Loulier K, Carroll P, Cremer H. Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci*. 2002;5:939-45.
- Hamilton DL, Abremski K. Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol*. 1984;178:481-486.
- Hammer MG, Sheridan JD. Electrical coupling and dye transfer between acinar cells in rat salivary glands. *J Physiol*. 1978;275:495-505.

- Han B, Zhang JT. Regulation of gene expression by internal ribosome entry sites or cryptic promoters: the eIF4G story. *Mol Cell Biol.* 2002;22:7372-84.
- Hanahan D, Meselson M. Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.* 1983;100, 333-342.
- Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, Ronnback L. Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gapjunction communication. *Neurochem. Int.* 2000;37:317-329.
- Harris AL. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys.* 2001;34:325-472.
- Hashimoto S, Inoue T, Koyama T. Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. *Eur J Pharmacol* 1999;378:23-30.
- Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia* 1993;34, 453-468.
- Heinemann U, Eder C, Laß A. Epilepsy. In: *Neuroglia* 1995;62:936-949. Kettenmann H, Ransom BR. (Eds). Oxford University Press. New York
- Hendrix EM, Myatt L, Sellers S, Russell PT, Larsen WJ. Steroid hormone regulation of rat myometrial gap junction formation: effects on cx43 levels and trafficking. *Biol Reprod.* 1995;52:547-60.
- Hennemann H, Kozjek G, Dahl E, Nicholson B, Willecke K. Molecular cloning of mouse connexins26 and -32: similar genomic organization but distinct promoter sequences of two gap junction genes.1992; *Eur J Cell Biol.* 58, 81-89.
- Hikosaka O, Nakamura K, Sakai K, Nakahara H. Central mechanisms of motor skill learning. *Curr Opin Neurobiol* 2002;12:217-222.
- Hinkerohe D, Smikalla D, Haghikia A, Heupel K, Haase CG, Dermietzel R, Faustmann PM. Effects of cytokines on microglial phenotypes and astroglial coupling in an inflammatory coculture model. *Glia.* 2005; [Epub ahead of print]
- Hinrichs W, Kisker C, Düvel M, Müller A, Tovar K, Hillen W, Saenger W. Structure of the tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science* 1994;264, 418-420.
- Hochheimer A, Tjian R. Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes Dev.* 2003;17:1309-20.
- Hoess RH, Abremski K. Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984;81:1026-1029.
- Holtmann G, Goebell H, Talley J. Impaired small intestinal peristaltic reflexes and sensory thresholds are independent functional disturbances in patients with chronic unexplained dyspepsia. *Am J Gastroenterol.* 1996;9:485-91.
- Holtmann G, Goebell H, Talley NJ. Functional dyspepsia and irritable bowel syndrome: is there a common pathophysiological basis? *Am J Gastroenterol.* 1997;92:954-9.
- Hombach S, Janssen-Bienhold U, Söhl G, Schubert T, Büssow H, Ott T, Weiler R, Willecke K. Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. 2004; *Eur.J.Neurosci.* 19, 2633-2640.
- Homma N, Alvarado JL, Coombs W, Stergiopoulos K, Taffet SM, Lau AF, Delmar M. A particle-receptor model for the insulin-induced closure of connexin43 gap junction channels. *Circ Res.* 1998;83:27-32.
- Hooper M, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Monk M. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 1987;326, 292-295.
- Hormuzdi SG, Pais I, LeBeau FE, Towers SK, Rozov A, Buhl EH, Whittington MA, Monyer H. Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice. *Neuron* 2001;31:487-495.

- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 1990;250, 533-538.
- Hosseinzadeh H, Nassiri Asl M. Anticonvulsant, sedative and muscle relaxant effects of carbenoxolone in mice. *BMC Pharmacol.* 2003;3:3.
- Huang GY, Wessels A, Smith BR, Linask KK, Ewart JL, Lo CW. Alteration in connexin 43 gap junction gene dosage impairs conotruncal heart development. *Dev Biol.* 1998;198:32-44.
- Imamura T, Luedke CE, Vogt SK, Muglia LJ. Oxytocin modulates the onset of murine parturition by competing ovarian and uterine effects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279:1061-7
- Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol.* 1988;62:2636-43.
- Jahromi SS, Wentlandt K, Piran S, Carlen PL. Anticonvulsant actions of gap junctional blockers in an in vitro seizure model. *J Neurophysiol.* 2002;88:1893-902.
- Jones HW Jr, McKusick VA, Harper PS, Wu KD. George Otto Gey. The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet Gynecol* 1971;38:945-949.
- Jordan K, Chodock R, Hand AR, Laird DW. The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J Cell Sci.* 2001;114:763-773.
- Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod.* 1999;60:1263-1270.
- Kalff JC, Schraut WH, Simmons RL, Bauer AJ. Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Ann Surg.* 1998;228:652-63.
- Kalff JC, Turler A, Schwarz NT, Schraut WH, Lee KK, Tweardy DJ, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Intra-abdominal activation of a local inflammatory response within the human muscularis externa during laparotomy. *Ann Surg.* 2003;237:301-15.
- Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Koda M, Sobaniec-Lotowska M, Sulkowska M. Expression of connexins 26, 32 and 43 in the human colon-an immunohistochemical study. *Folia Histochem Cytobiol.* 2004;42:203-7.
- Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev.* 1997;49:157-230.
- Kirchhoff S. Untersuchung zur gezielten Inaktivierung des Connexin45-Gens und zu Herz-Kreislaufanomalien Connexin40-defekter sowie Connexin40/Connexin43-defekter Mäuse. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. 1999.
- Kirchhoff S, Kim JS, Hagedorff A, Thönnissen E, Krüger O, Lamers WH, Willecke K. Abnormal cardiac conduction and morphogenesis in connexin40 and connexin43 double-deficient mice. *Circ Res.* 2000;87:399-405.
- Kilarski WM, Dupont E, Coppen S, Yeh HI, Vozzi C, Gourdie RG, Rezapour M, Ulmsten U, Roomans GM, Severs NJ. Identification of two further gap-junctional proteins, connexin40 and connexin45, in human myometrial smooth muscle cells at term. *Eur J Cell Biol.* 1998;75:1-8
- Kilarski WM, Rothery S, Roomans GM, Ulmsten U, Rezapour M, Stevenson S, Coppen SR, Dupont E, Severs NJ. Multiple connexins localized to individual gap-junctional plaques in human myometrial smooth muscle. *Microsc Res Tech.* 2001;54:114-22
- Kim DG, Kang HM, Jang SK, Shin HS. Construction of a bifunctional mRNA in the mouse by using the internal ribosomal entry site of the encephalomyocarditis virus. *Mol Cell Biol.* 1992;12:3636-43.
- Kim DY, Kam Y, Koo SK, Joe CO. Gating connexin 43 channels reconstituted in lipid vesicles by mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 1999;274, 5581-5587.

- Kimes BW, Brandt BL. Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp Cell Res.* 1976;98:349-66.
- Kistler WM, De Jeu MT, Elgersma Y, Van Der Giessen RS, Hensbroek R, Luo C, Koekkoek SK, Hoogenraad CC, Hamers FP, Gueldenagel M, Söhl G, Willecke K, De Zeeuw CI. Analysis of Cx36 knockout does not support tenet that olivary gap junctions are required for complex spike synchronization and normal motor performance. *Ann N Y Acad Sci* 2002;978:391-404.
- Kito Y, Suzuki H. Properties of pacemaker potentials recorded from myenteric interstitial cells of Cajal distributed in the mouse small intestine. *J Physiol.* 2003;553:803-18.
- Kozak M. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene.* 2002;299:1-34.
- Kozak M. Alternative ways to think about mRNA sequences and proteins that appear to promote internal initiation of translation. *Gene.* 2003;318:1-23.
- Kosaka T, Deans MR, Paul DL, Kosaka K. Neuronal gap junctions in the mouse main olfactory bulb: morphological analyses on transgenic mice. *Neuroscience.* 2005; [Epub ahead of print]
- Krenacs T, van Dartel M, Lindhout E, Rosendaal M. Direct cell/cell communication in the lymphoid germinal center: connexin43 gap junctions functionally couple follicular dendritic cells to each other and to B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1997;27:1489-1497.
- Krestel HE, Mayford M, Seeburg PH, Sprengel R. A GFP-equipped bidirectional expression module well suited for monitoring tetracycline-regulated gene expression in mouse. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:E39.
- Kretz M, Euwens C, Hombach S, Eckardt D, Teubner B, Traub O, Willecke K, Ott T. Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice. *J Cell Sci.* 2003;116:3443-3452.
- Krüger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, Willecke K. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development.* 2000;127:4179-4193.
- Kühbandner S, Brummer S, Metzger D, Chambon P, Hofmann F, Feil R. Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. *Genesis.* 2000;28:15-22.
- Kühn R, Schwenk F. Advances in gene targeting methods. *Curr. Opin. Immunol.* 1997;9:183-188.
- Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell.* 1996;84:381-388.
- Kumai M, Nishii K, Nakamura K, Takeda N, Suzuki M, Shibata Y. Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development.* 2000;127:3501-12.
- Kuriyama H, Kitamura K, Itoh T, Inoue R. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. *Physiol Rev.* 1998;78:811-920.
- Lacroix L, Spinelli S, Heidbreder CA, Feldon J. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. *Behav Neurosci* 2000;114:1119-1130.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
- Laing JG, Tadros PN, Green K, Saffitz JE, Beyer EC. Proteolysis of connexin43-containing gap junctions in normal and heat-stressed cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 1998;38:711-718.
- Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:4293.
- Lallemant Y, Luria V, Haffner-Krausz R, Lonai P. Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase. *Transgenic Res.* 1998;7:105-112.
- Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG, Lau AF. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J. Cell Biol.* 2000;149, 1503-1512.

- Lamprea MR, Cardenas FP, Silveira R, Morato S, Walsh TJ. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behav Brain Res* 2000;17:97-105.
- Landisman CE, Long MA, Beierlein M, Deans MR, Paul DL, Connors BW. Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *J Neurosci*. 2002;22, 1002-1009.
- Langen B, Dietze S, Fink H. Acute effect of ethanol on anxiety and 5-HT in the prefrontal cortex of rats. *Alcohol* 2002;27:135-141.
- Langley JN, Magnus R. Some Observations of Movements of the Intestine Before and After Degenerative Section of the Mesenteric Nerves. *J. Physiol*. 1905;33, 34-51.
- Langley JN. The autonomic nervous system Part1. 1921; W. Heffer and Sons, Cambridge
- Lauf U, Giepmans BN, Lopez P, Braconnot S, Chen SC, Falk MM. Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:10446-51.
- Le Gurun S, Martin D, Formenton A, Maechler P, Caille D, Waeber G, Meda P, Haefliger JA. Connexin-36 contributes to control function of insulin-producing cells. *J Biol Chem*. 2003; 278:37690-7.
- Leung DS, Unsicker K, Reuss B. Expression and developmental regulation of gap junction connexins cx26, cx32, cx43 and cx45 in the rat midbrain-floor. *Int J Dev Neurosci*. 2002;20:63-75.
- Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem*. 1996;271:2746-53.
- Lewandoski M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. 2001;Genet*. 2:743-755
- Li L, Miano JM, Cserjesi P, Olson EN. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ Res*. 1996;78:188-95.
- Li X, Simard JM. Connexin45 gap junction channels in rat cerebral vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:H1890-8.
- Lin JH, Takano T, Cotrina ML, Arcuino G, Kang J, Liu S, Gao Q, Jiang L, Li F, Lichtenberg-Frate H, Haubrich S, Willecke K, Goldman SA, Nedergaard M. Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. *J Neurosci*. 2002;22:4302-11.
- Liu XB, Jones EG. Fine structural localization of connexin-36 immunoreactivity in mouse cerebral cortex and thalamus. *J Comp Neurol* 2003; 466:457-467.
- Lo Turco JJ, Kriegstein AR. Clusters of coupled neuroblasts in embryonic neocortex. *Science*. 1991;252:563-6.
- Long MA, Deans MR, Paul DL, Connors BW. Rhythmicity without synchrony in the electrically uncoupled inferior olive. *J Neurosci* 2002;22:10898-10905.
- Löscher W, Ebert U. The role of the piriform cortex in kindling. *Prog. Neurobiol*. 1996;50, 427-481.
- Lu G, Qian X, Berezin I, Telford GL, Huizinga JD, Sarna SK. Inflammation modulates in vitro colonic myoelectric and contractile activity and interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol*. 1997;273:1233-45.
- Lucius C, Arner A, Steusloff A, Troschka M, Hofmann F, Aktories K, Pfitzer G. C. difficile toxin B inhibits carbachol-induced force and myosin light chain phosphorylation in guinea pig smooth muscle: role of Rho proteins. *J. Physiol*. 1998; 506: 83-93
- Lüllmann-Rauch, R. Histologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 2003.
- Lye SJ, Nicholson BJ, Mascarenhas M, MacKenzie L, Petrocelli T. Increased expression of connexin-43 in the rat myometrium during labor is associated with an increase in the plasma estrogen:progesterone ratio. *Endocrinology*. 1993;132:2380-6.

- Lye SJ. The initiation and inhibition of labor-toward a molecular understanding. *Semin Reprod Endocrinol.* 1994;12:284-297.
- Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M. Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J Cell Biol.* 1990;111:2427-2436.
- Madsen CS, Regan CP, Hungerford JE, White SL, Manabe I, Owens GK. Smooth muscle-specific expression of the smooth muscle myosin heavy chain gene in transgenic mice requires 5'-flanking and first intronic DNA sequence. *Circ Res.* 1998;82:908-1
- Magin TM, McWhir J, Melton DW. A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:3795-3796.
- Magnus R. Versuche am überlebenden Dünndarm von Säugetieren. *Pflügers Arch.* 1904;102:123-151.
- Mangel AW, Taylor IL. Modulation of electrical activity in gastrointestinal smooth muscle by peptides. *Regul Pept.* 1992;42:1-13.
- Manjunath CK, Goings GE, Page E. Cytoplasmic surface and intramembrane components of rat heart gap junctional proteins. *Am.J.Physiol* 1984;246, H865-H875.
- Mark GP, Finn DA. The relationship between hippocampal acetylcholine release and cholinergic convulsant sensitivity in withdrawal seizure-prone and withdrawal seizure-resistant selected mouse lines. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002;26:1141-52.
- Marín O, Rubenstein JL. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci.* 2003;26:441-83.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78:7634-7638.
- Martin AO, Mathieu MN, Chevillard C, Guerineau NC. Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca^{2+} increases between chromaffin cells in adrenal slices: a role in catecholamine release. *J Neurosci.* 2001;21:5397-5405.
- Martineau Y, Le Bec C, Monbrun L, Allo V, Chiu IM, Danos O, Moine H, Prats H, Prats AC. Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. *Mol Cell Biol.* 2004;24:7622-35.
- Mas C, Taske N, Deutsch S, Guipponi M, Thomas P, Covanis A, Friis M, Kjeldsen MJ, Pizzolato GP, Villemure JG, Buresi C, Rees M, Malafosse A, Gardiner M, Antonarakis SE, Meda P. Association of the connexin36 gene with juvenile myoclonic epilepsy. *J Med Genet.* 2004;41:e93.
- Maschke S. Untersuchung der embryonalen Letalität von Mäusen, in denen Connexin36 anstelle von Connexin45 ausgeprägt wird. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. 2005.
- Mason K, Heal DJ, Stanford SC. The anxiogenic agents, yohimbine and FG 7142, disrupt the noradrenergic response to novelty. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;60:321-327.
- Maxeiner S, Krüger O, Schilling K, Traub O, Urschel S, Willecke K. Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience.* 2003;119:689-700.
- Maxeiner S, Dedek K, Janssen-Bienhold U, Ammermüller J, Brune H, Kirsch T, Pieper M, Degen J, Krüger O, Willecke K, Weiler R. Deletion of connexin45 in mouse retinal neurons disrupts the rod/cone signaling pathway between AII amacrine and ON cone bipolar cells and leads to impaired visual transmission. *J Neurosci.* 2005;25:566-76.
- Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science.* 1996;274:1678-83.
- McManus MF, Golden JA. Neuronal migration in developmental disorders. *J Child Neurol.* 2005 Apr;20(4):280-6.
- Menichella DM, Goodenough DA, Sirkowski E, Scherer SS, Paul DL. Connexins are critical for normal myelination in the CNS. *J. Neurosci.* 2003;23:5963-5973

- Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 2001;24:71-80.
- Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR. An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* 1998;18:136-141.
- Mikkelsen HB, Huizinga JD, Thuneberg L, Rumessen JJ. Immunohistochemical localization of a gap junction protein (connexin43) in the muscularis externa of murine, canine, and human intestine. *Cell Tissue Res*. 1993;274:249-56.
- Mitchell JA, Lye SJ. Differential expression of activator protein-1 transcription factors in pregnant rat myometrium. *Biol Reprod*. 2002;67:240-6.
- Mokry J, Cizkova D, Filip S, Ehrmann J, Osterreicher J, Kolar Z, English D. Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev*. 2004;13:658-64
- Moorby CD, Gherardi E. Expression of a Cx43 deletion mutant in 3T3 A31 fibroblasts prevents PDGF-induced inhibition of cell communication and suppresses cell growth. *Exp.Cell Res*. 1999;249, 367-376.
- Moreels TG, De Man JG, De Winter BY, Herman AG, Pelckmans PA. How to express pharmacological contractions of the inflamed rat intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2001a;364:524-33.
- Moreels TG, De Man JG, Bogers JJ, De Winter BY, Vrolix G, Herman AG, Van Marck EA, Pelckmans PA. Effect of *Schistosoma mansoni*-induced granulomatous inflammation on murine gastrointestinal motility. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001b;280:G1030-42.
- Moreels TG, Nieuwendijk RJ, De Man JG, De Winter BY, Herman AG, Van Marck EA, Pelckmans PA. Concurrent infection with *Schistosoma mansoni* attenuates inflammation induced changes in colonic morphology, cytokine levels, and smooth muscle contractility of trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Gut*. 2004;53:99-107.
- Moreno AP, Laing JG, Beyer EC, Spray DC. Properties of gap junction channels formed of connexin 45 endogenously expressed in human hepatoma (SKHep1) cells. *Am J Physiol*. 1995;268:C356-65.
- Moreno AP, Chanson M, Elenes S, Anumonwo J, Scerri I, Gu H, Taffet SM, Delmar M. Role of the carboxyl terminal of connexin43 in transjunctional fast voltage gating. *Circ.Res*. 2002;90, 450457.
- Moreno AP. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to channel gating. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1711:164-71.
- Müller J. Transcriptional control: The benefits of selective insulation. *Current Biology* 2000;10, R241-R244.
- Murakami S, Muramatsu T, Shimono M. Expression and localization of connexin 43 in rat incisor odontoblasts. *Anat Embryol*. 2001;203:367-374.
- Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA. Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J.Cell Biol*. 1990;111, 2077-2088.
- Musil LS, Goodenough DA. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell*. 1993;74:1065-1077.
- Musil LS, Le AC, VanSlyke JK, Roberts LM. Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J.Biol.Chem*. 2000;275, 25207-25215.
- Nadarajah B, Parnavelas JG. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3:423-32.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder J. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:8424-8428.
- Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*. 2000;26:99-109.

- Nagy A, Perrimon N, Sandmeyer S, Plasterk R. Tailoring the genome: the power of genetic approaches. *Nat Genet.* 2003a;33:276-284.
- Nagy A, Gertsenstein M, Vinterstein K, Behringer R. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003b.
- Nagy JI, Dermietzel R. Gap Junctions and connexins in the mammalian central nervous system. In: Gap Junctions. Advances in Molecular and Cell Biology. 2000;30:323-396. Bittar EE, Hertzberg EL. (Eds). JAI Press Inc. Stanford, Connecticut
- Nakamura K, Kuraoka A, Kawabuchi M, Shibata Y. Specific localization of gap junction protein, connexin45, in the deep muscular plexus of dog and rat small intestine. *Cell Tissue Res.* 1998;292:487-94.
- Naus CC, Bechberger JF, Paul DL. Gap junction gene expression in human seizure disorder. *Exp Neurol.* 1991;111:198-203.
- Nathan CF. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest.* 1987;80:1550-60.
- Nazar M, Siemiatkowski M, Bidzinski A, Czlonkowska A, Sienkiewicz-Jarosz H, Plaznik A. The influence of serotonin depletion on rat behavior in the Vogel test and brain 3H-zolpidem binding. *J Neural Transm* 1999;106:355-368.
- Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature.* 2005;434:83-8.
- Nemeth L, Maddur S, Puri P. Immunolocalization of the gap junction protein Connexin43 in the interstitial cells of Cajal in the normal and Hirschsprung's disease bowel. *J Pediatr Surg.* 2000;35:823-8.
- Neophytou SI, Aspley S, Butler S, Beckett S, Marsden CA. Effects of lesioning noradrenergic neurones in the locus coeruleus on conditioned and unconditioned aversive behaviour in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001;25:1307-1321.
- Nicholson SM, Bruzzone R. Gap junctions: getting the message through. *Curr Biol.* 1997;7:R340-4.
- Nicholson BJ, Weber PA, Cao F, Chang HC, Lampe P, Goldberg G. The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33:369-378.
- Nicholson BJ. Gap junctions - from cell to molecule. *J Cell Sci.* 2003;116:4479-4481.
- Nishii K, Kumai M, Egashira K, Miwa T, Hashizume K, Miyano Y, Shibata Y. Mice lacking connexin45 conditionally in cardiac myocytes display embryonic lethality similar to that of germline knockout mice without endocardial cushion defect. *Cell Commun Adhes.* 2003;10:365-9
- Ochiishi T, Yamauchi T, Terashima T. Regional differences between the immunohistochemical distribution of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II alpha and beta isoforms in the brainstem of the rat. *Brain Res.* 1998;790:129-40.
- Odermatt B, Wellershaus K, Wallraff A, Seifert G, Degen J, Euwens C, Fuss B, Büsow H, Schilling K, Steinhäuser C, Willecke K. Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS. *J. Neurosci.* 2003;23:4549-4559
- Okuma A, Kuraoka A, Iida H, Inai T, Wasano K, Shibata Y. Colocalization of connexin 43 and connexin 45 but absence of connexin 40 in granulosa cell gap junctions of rat ovary. *J Reprod Fertil.* 1996;107:255-64.
- Orsino A, Taylor CV, Lye SJ. Connexin-26 and connexin-43 are differentially expressed and regulated in the rat myometrium throughout late pregnancy and with the onset of labor. *Endocrinology.* 1996;137:1545-53
- O'Sullivan M, Clayton N, Breslin NP, Harman I, Bountra C, McLaren A, O'Morain CA. Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2000;12:449-57.

- Otey CA, Boukhelifa M, Maness P. B35 neuroblastoma cells: an easily transfected, cultured cell model of central nervous system neurons. *Methods Cell Biol.* 2003;71:287-304.
- Ou CW, Orsino A, Lye SJ. Expression of connexin-43 and connexin-26 in the rat myometrium during pregnancy and labor is differentially regulated by mechanical and hormonal signals. *Endocrinology.* 1997;138:5398-407.
- Oviedo-Orta E, Howard Evans W. Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1662:102-12.
- Qiu C, Coutinho P, Frank S, Franke S, Law LY, Martin P, Green CR, Becker DL. Targeting connexin43 expression accelerates the rate of wound repair. *Curr Biol.* 2003;13:1697-703.
- Palliser HK, Ooi GT, Hirst JJ, Rice G, Dellios NL, Escalona RM, Young IR. Changes in the expression of prostaglandin E and F synthases at induced and spontaneous labour onset in the sheep. *J Endocrinol.* 2004;180:469-77.
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Turmbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 1982;300, 611-615.
- Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol.* 2000;10:R473-R474.
- Pearce FL, Befus AD, Bienenstock J. Isolation and properties of mast cells from the small bowel lamina propria of the rat. *Agents Actions.* 1982;12:183-5.
- Peinado A, Yuste R, Katz LC. Extensive dye coupling between rat neocortical neurons during the period of circuit formation. *Neuron.* 1993a;10:103-14.
- Peinado A, Yuste R, Katz LC. Gap junctional communication and the development of local circuits in neocortex. *Cereb Cortex.* 1993b;3:488-98.
- Pepe GJ, Rothchild I. A comparative study of serum progesterone levels in pregnancy and in various types of pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology.* 1974;95:275-9.
- Peracchia C, Wang XG, Peracchia LL. Behavior of chemical- and slow voltage-sensitive gates of connexin channels: The "cork" gating hypothesis. In: *Gap Junctions. Molecular basis of cell communication in health and disease.* Ed. Camillo Peracchia. Academic Press, 2000.
- Perez-Velazquez JL, Valiante TA, Carlen PL. Modulation of gap junctional mechanisms during calcium-free induced field burst activity: a possible role for electrotonic coupling in epileptogenesis. *J Neurosci.* 1994;14:4308-17.
- Perez Velazquez JL, Frantseva M, Naus CC, Bechberger JF, Juneja SC, Velumian A, Carlen PL, Kidder GM, Mills LR. Development of astrocytes and neurons in cultured brain slices from mice lacking connexin43. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996;97:293-6.
- Perez Velazquez JL, Carlen PL. Gap junctions, synchrony and seizures. *Trends Neurosci.* 2000;23:68-74.
- Perkins GA, Goodenough DA, Sosinsky GE. Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons. *J Mol Biol.* 1998;277:171-177.
- Phelan P. Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2005;171:225-45.
- Pielensticker N, Bohnen J, Ghanem A, Schrickel J, Kim J-S, Behr R, Grümmer R, Winterhager E, Tiemann K, Willecke K. The replacement of Connexin43 by Connexin26 causes alterations in the releasing hormones of the pituitary gland. 2005. Manuskript in Vorbereitung
- Piersanti M, Lye SJ. Increase in messenger ribonucleic acid encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, requires protein synthesis and is associated with increased expression of the activator protein-1, c-fos. *Endocrinology.* 1995;136:3571-8.

- Piroleau MN, Nony P, Simpson M, Felsenfeld G. An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken β -globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene. *EMBO J.* 1999;18, 4035-4048.
- Plum A, Hallas G, Magin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher B, Wolpert C, Kim JS, Lamers WH, Evert M, Meda P, Traub O, Willecke K. Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol.* 2000;10:1083-1091.
- Porcher C, Baldo M, Henry M, Orsoni P, Jule Y, Ward SM. Deficiency of interstitial cells of Cajal in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:118-25.
- Priest CA, Thompson AJ, Keller A. Gap junction proteins in inhibitory neurons of the adult barrel neocortex. *Somatosens Mot Res* 2001;18:245-252.
- Qu Y, Dahl G. Function of the voltage gate of gap junction channels: selective exclusion of molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002; 99, 697-702.
- Racine RJ Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 1972;32, 269-279.
- Racine RJ, Paxinos G, Mosher M, Kairiss EW. The effects of various lesions and knife-cuts on septal and amygdala kindling in the rat. *Brain. Res.* 1988;454, 264-274.
- Rangel A, Gonzalez LE, Villarroel V, Hernandez L. Anxiolysis followed by anxiogenesis relates to coping and corticosterone after medial prefrontal cortical damage in rats. *Brain Res* 2003;992:96-103.
- Ransom BR. Do glial gap junctions play a role in extracellular ion homeostasis? In: *Gap Junctions in the nervous system.* 1996;9:159-173. Herausgeber: Spray D.C., Dermietzel R. Springer-Verlag, Heidelberg
- Rash JE, Staines WA, Yasumura T, Patel D, Furman CS, Stelmack GL, Nagy JI. Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7573-7578.
- Rash JE, Yasumura T, Davidson KG, Furman CS, Dudek FE, Nagy JI. Identification of cells expressing Cx43, Cx30, Cx26, Cx32 and Cx36 in gap junctions of rat brain and spinal cord. *Cell Commun Adhes* 2001a;8:315-320.
- Rash JE, Yasumura T, Dudek FE, Nagy JI. Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J Neurosci.* 2001b;21:1983-2000.
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science.* 1995;267:1831-1834.
- Regan CP, Manabe I, Owens GK. Development of a smooth muscle-targeted cre recombinase mouse reveals novel insights regarding smooth muscle myosin heavy chain promoter regulation. *Circ Res.* 2000;87:363-9.
- Revel JP, Karnovsky MJ. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol.* 1967;33:C7-C12.
- Reynolds LP, Redmer DA. Growth and development of the corpus luteum. *J Reprod Fertil.* 1999;54:181-91.
- Risek B, Klier FG, Phillips A, Hahn DW, Gilula NB. Gap junction regulation in the uterus and ovaries of immature rats by estrogen and progesterone. *J Cell Sci.* 1995;108:1017-32.
- Rodríguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre- loxP. *Nat Genet* 2000;25:139-140.
- Rörig B, Klaus G, Sutor B. Dye coupling between pyramidal neurons in developing rat prefrontal and frontal cortex is reduced by protein kinase A activation and dopamine. *J Neurosci.* 1995a;15:7386-400.
- Rörig B, Klaus G, Sutor B. Beta-adrenoreceptor activation reduces dye-coupling between immature rat neocortical neurones. *Neuroreport.* 1995b;6:1811-5.

- Rörig B, Klausa G, Sutor B. Intracellular acidification reduced gap junction coupling between immature rat neocortical pyramidal neurones. *J Physiol.* 1996;490:31-49.
- Rörig B, Sutor B. Serotonin regulates gap junction coupling in the developing rat somatosensory cortex. *Eur J Neurosci.* 1996a;8:1685-95.
- Rörig B, Sutor B. Regulation of gap junction coupling in the developing neocortex. *Mol Neurobiol.* 1996b;12:225-49.
- Rörig B, Feller MB. Neurotransmitters and gap junctions in developing neural circuits. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;32:86-114.
- Roscoe WA, Barr KJ, Mhawi AA, Pomerantz DK, Kidder GM. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin43. *Biol Reprod.* 2001;65:829-838.
- Rouach N, Segal M, Koulakoff A, Giaume C, Avignone E. Carbenoxolone blockade of neuronal network activity in culture is not mediated by an action on gap junctions. *J Physiol.* 2003;553:729-45.
- Rozental R, Mehler MF, Morales M, Andrade-Rozental AF, Kessler JA, Spray DC. Differentiation of hippocampal progenitor cells in vitro: temporal expression of intercellular coupling and voltage- and ligand-gated responses. *Dev Biol.* 1995;167:350-62.
- Rozental R, Morales M, Mehler MF, Urban M, Kremer M, Dermietzel R, Kessler JA, Spray DC. Changes in the properties of gap junctions during neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci.* 1998;18:1753-62.
- Rozental R, Andrade-Rozental AF, Zheng X, Urban M, Spray DC, Chiu FC. Gap junction-mediated bidirectional signaling between human fetal hippocampal neurons and astrocytes. *Dev Neurosci.* 2001;23:420-31.
- Ruangvoravat CP, Lo CW. Connexin 43 expression in the mouse embryo: localization of transcripts within developmentally significant domains. *Dev Dynam.* 1992;194:261-281.
- Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA. Connexin expression and turnover: implications for cardiac excitability. *Circ Res.* 2000;86:723-728.
- Shah AA, Treit D. Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. *Brain Res* 2003;969:183-194.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239:487-491.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Sauer B. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1987;7:2087-2096.
- Schauwecker PE, Steward O. Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: implications for gene targeting approaches. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:4103-8.
- Scherer SS, Chance PF. Myelin genes: getting the dosage right. *Nat. Genet.* 1995;11:226-228
- Schlieker C. Reinigung der C-terminalen Domäne des Ratten Connexin43 Proteins nach Expressionsklonierung in Bakterien, Hefen und Insektenzellen. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. 2000.
- Schneider T, Fetscher C, Kresse S, Michel MC. Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of human urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:1148-53.
- Schultz T, Daniel V, Daniel EE. Does ICC pacing require functional gap junctions between ICC and smooth muscle in mouse intestine? *Neurogastroenterol Motil.* 2003;15:129-38.
- Schwenk F, Kühn R, Angrand PO, Rajewsky K, Stewart AF. Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res.* 1998;26:1427-1432.

- Schwob JE, Fuller T, Price JL, Olney JW. Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience* 1980;5:991-1014
- Seibler J, Zevnik B, Kuter-Luks B, Andreas S, Kern H, Hennek T, Rode A, Heimann C, Faust N, Kauselmann G, Schoor M, Jaenisch R, Rajewsky K, Kühn R, Schwenk F. Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:e12.
- Seki K, Zhou DS, Komuro T. Immunohistochemical study of the c-kit expressing cells and connexin 43 in the guinea-pig digestive tract. *J Auton Nerv Syst.* 1998;68:182-7.
- Seki K, Komuro T. Immunocytochemical demonstration of the gap junction proteins connexin 43 and connexin 45 in the musculature of the rat small intestine. *Cell Tissue Res.* 2001;306:417-22.
- Serio R, Barajas-Lopez C, Daniel EE, Berezin I, Huizinga JD. Slow-wave activity in colon: role of network of submucosal interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol.* 1991;260:G636-45.
- Serre-Beinier V, Le Gurun S, Belluardo N, Trovato-Salinaro A, Charollais A, Haefliger JA, Condorelli DF, Meda P. Cx36 preferentially connects beta-cells within pancreatic islets. *Diabetes* 2000;49:727-734.
- Severs NJ, Coppen SR, Dupont E, Yeh HI, Ko YS, Matsushita T. Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc.Res.* 2004;62, 368-377.
- Shashikant CS, Ruddle FH. Impact of transgenic technologies on functional genomics. *Curr. Issues. Mol. Biol.* 2003;5:75-98
- Sherman A, Rinzel J. Rhythmogenic effects of weak electrotonic coupling in neuronal models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:2471-4.
- Shibley H, Smith BN. Pilocarpine-induced status epilepticus results in mossy fiber sprouting and spontaneous seizures in C57BL/6 and CD-1 mice. *Epilepsy Res.* 2002;49:109-20.
- Shih TM, McDonough JH Jr. Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures. *J Appl Toxicol.* 1997;17:255-64.
- Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* 1988;16:7583-7600
- Shynlova OP, Oldenhof AD, Liu M, Langille L, Lye SJ. Regulation of c-fos expression by static stretch in rat myometrial smooth muscle cells. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186:1358-65.
- Sidman RL, Angevine Jr. JB, Pierce ET. *Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord.* Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 1971.
- Söhl G, Degen J, Teubner B, Willecke K. The murine gap junction gene connexin36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. *FEBS Lett.* 1998;428:27-31.
- Söhl G. Identifizierung des Connexin36 Gens sowie Expressionsanalyse in Retina und Gehirn der Maus. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. 1999.
- Söhl G, Theis M, Hallas G, Brambach S, Dahl E, Kidder G, Willecke K. A new alternatively spliced transcript of the mouse connexin32 gene is expressed in embryonic stem cells, oocytes, and liver. *Exp Cell Res.* 2001;266:177-186.
- Söhl G, Willecke K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun.Adhes.* 2003; 10, 173-180.
- Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6:191-200.
- Solway J, Seltzer J, Samaha FF, Kim S, Alger LE, Niu Q, Morrissey EE, Ip HS, Parmacek MS. Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha. *J Biol Chem.* 1995;270:13460-9.

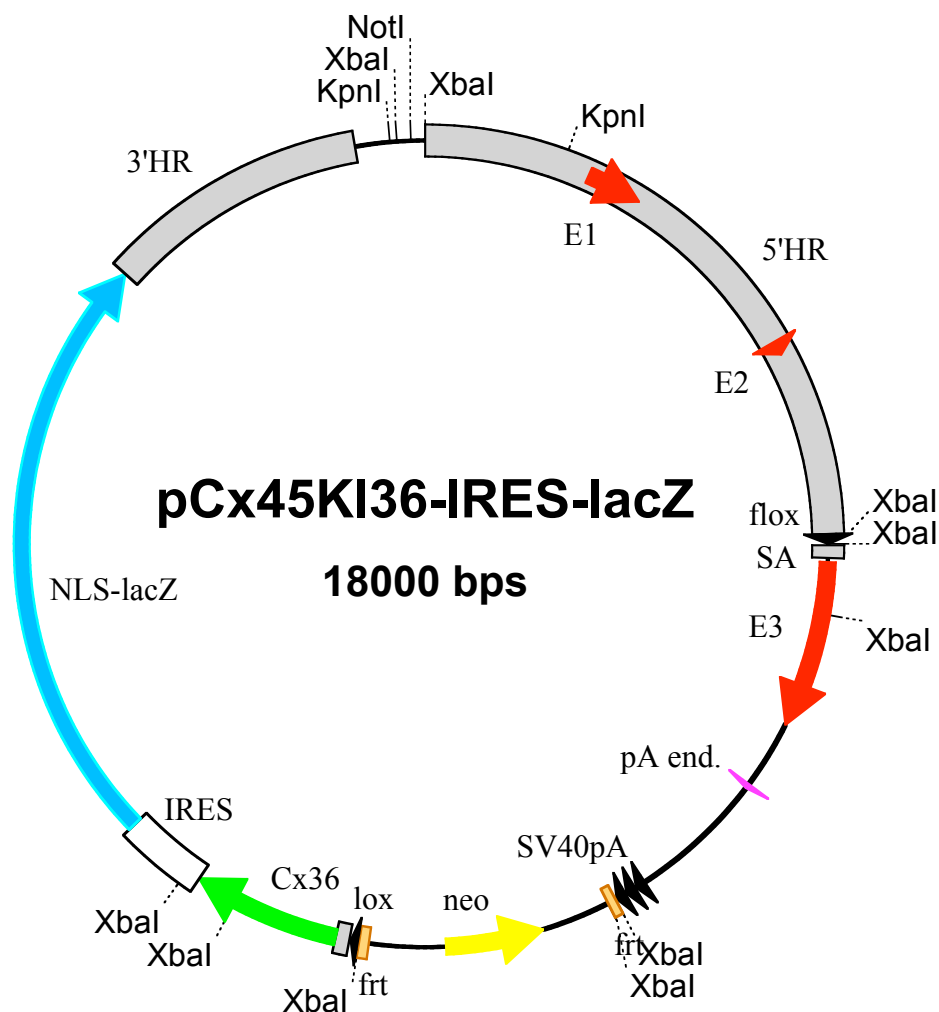
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975;98:503-517.
- Sparks DL, Buckholtz NS. Combined inhibition of serotonin uptake and oxidative deamination attenuates audiogenic seizures in DBA/2J mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1985;23:753-7.
- Spray DC, Burt JM. Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am.J.Physiol* 1990;258, C195-C205.
- Srinivas M, Rozental R, Kojima T, Dermietzel R, Mehler M, Condorelli DF, Kessler JA, Spray DC. Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction protein connexin36. *J Neurosci.* 1999;19:9848-55.
- Stark LG. Kindling: amygdaloid neuronal networks and actions of convulsant and antiepileptic drugs. In: Faingold CL, Fromm GH. (Eds) *Drugs for control of Epilepsy: Actions on Neuronal Networks Involved in Seizure Disorders.* CRC Press: Boca Raton 1992; 195-212.
- Stark ME, Bauer AJ, Sarr MG, Szurszewski JH. Nitric oxide mediates inhibitory nerve input in human and canine jejunum. *Gastroenterology.* 1993;104:398-409.
- Steinhäuser C, Berger T, Frotscher M, Kettenmann H. Heterogeneity in the Membrane Current Pattern of Identified Glial Cells in the Hippocampal Slice. *Eur J Neurosci.* 1992;4:472-484.
- Steriopoulos K, Alvarado JL, Mastroianni M, Ek-Viktorin JF, Taffet SM, Delmar M. Hetero-domain interactions as a mechanism for the regulation of connexin channels. *Circ Res.* 1999;84:1144-1155.
- Strauss WM. Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. In: *Current protocols in molecular biology.* John Wiley & Sons, New York, 1998.
- Sui GP, Coppen SR, Dupont E, Rothery S, Gillespie J, Newgreen D, Severs NJ, Fry CH. Impedance measurements and connexin expression in human detrusor muscle from stable and unstable bladders. *BJU Int.* 2003;92:297-305.
- Takeda Y, Ward SM, Sanders KM, Koh SD. Effects of the gap junction blocker glycyrrhetic acid on gastrointestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288:G832-41.
- Tamura K, Wood JD. Effects of prolonged exposure to histamine on guinea pig intestinal neurons. *Dig Dis Sci.* 1992;37:1084-8.
- Tauk DL, Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci.* 1985;5:1016-22.
- Temme A, Buchmann A, Gabriel HD, Nelles E, Schwarz M, Willecke K. High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr.Biol.* 1997;7, 713716.
- Temme A, Traub O, Willecke K. Downregulation of connexin32 protein and gap-junctional intercellular communication by cytokine-mediated acute-phase response in immortalized mouse hepatocytes. *Cell Tissue Res.* 1998;294:345-50.
- Teubner B, Degen J, Söhl G, Güldennagel M, Bukauskas FF, Trexler EB, Verselis VK, De Zeeuw CI, Lee CG, Kozak CA, Petrasch-Parwetz E, Dermietzel R, Willecke K. Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein. *J. Membr. Biol.* 2000;176:249-262.
- Theis M, de Wit C, Schlaeger TM, Eckardt D, Krüger O, Döring B, Risau W, Deutsch U, Pohl U, Willecke K. Endothelium-specific replacement of the connexin43 coding region by a lacZ reporter gene. *Genesis.* 2001;29:1-13.
- Theis M, Jauch R, Zhuo L, Speidel D, Wallraff A, Döring B, Frisch C, Söhl G, Teubner B, Euwens C, Huston J, Steinhäuser C, Messing A, Heinemann U, Willecke K. Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotor activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J Neurosci.* 2003;23:766-776.
- Thiel CM, Schwarting RK. Dopaminergic lateralisation in the forebrain: relations to behavioural asymmetries and anxiety in male Wistar rats. *Neuropsychobiology.* 2001;43:192-9.

- Timmermans, JP, Adriaensen D, Cornelissen W, Scheuermann DW. Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* 1997;118 , 331-340.
- Törnblom H, Lindberg G, Nyberg B, Veress B. Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2002;123:1972-9.
- Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M, Tada M. Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1998;273:12725-12731.
- Traub O, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Elfgang C, Bastide B, Scheidtmann KH, Hülser DF, Willecke K. Immunochemical and electrophysiological characterization of murine connexin40 and -43 in mouse tissues and transfected human cells. *Eur J Cell Biol.* 1994;64:101-112.
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 1999;23:99-103.
- Tronche F, Casanova E, Turiault M, Sahly I, Kellendonk C. When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice. *FEBS Lett.* 2002;529:116-121.
- Tsacopoulos M, Magistretti PJ. Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* 1996;16:877-885
- Turski WA, Cavalheiro EA, Turski L, Kleinrok Z. Intrahippocampal bethanechol in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Behav Brain Res.* 1983;7:361-70.
- Unwin PN, Ennis PD. Calcium-mediated changes in gap junction structure: evidence from the low angle X-ray pattern. *J Cell Biol.* 1983;97:1459-1466.
- Vallano ML, Beaman-Hall CM, Mathur A, Chen Q. Astrocytes express specific variants of CaM KII delta and gamma, but not alpha and beta, that determine their cellular localizations. *Glia.* 2000;30:154-64.
- van Rijen HV, Eckardt D, Degen J, Theis M, Ott T, Willecke K, Jongsma HJ, Opthof T, de Bakker JM. Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation.* 2004;109:1048-55.
- van Veen TAB, van Rijen HVM, Opthof T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res.* 2001;51:217-229.
- Valiunas V, Weingart R, Brink PR. Formation of heterotypic gap junction channels by connexins 40 and 43. *Circ Res* 2000;86:E42-E49.
- Veruki ML, Hartveit E. Electrical synapses mediate signal transmission in the rod pathway of the mammalian retina. *J Neurosci.* 2002;22:10558-66
- Vitalis T, Parnavelas JG. The role of serotonin in early cortical development. *Dev Neurosci.* 2003;25:245-56
- Wahnschaffe U, Löscher W. Effect of selective bilateral destruction of the substantia nigra on antiepileptic drug actions in kindled rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1990;186, 157-167.
- Wang YF, Daniel EE. Gap junctions in gastrointestinal muscle contain multiple connexins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281:533-43.
- Wang Y, Iyer M, Annala AJ, Chappell S, Mauro V, Gambhir SS. Noninvasive monitoring of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals using improved bicistronic vectors. *J Nucl Med.* 2005;46:667-74.
- Ward SM, Sanders KM, Hirst GD. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil.* 2004;16:112-7.
- Wei CJ, Francis R, Xu X, Lo CW. Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. *J Biol Chem.* 2005;280:19925-36.
- Weickert S, Ray A, Zoidl G, Dermietzel R. Expression of neural connexins and pannexin1 in the hippocampus and

- inferior olive: a quantitative approach. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;133:102-9.
- Wenzel HJ, Woolley CS, Robbins CA, Schwartzkroin PA. Kainic acid-induced mossy fiber sprouting and synapse formation in the dentate gyrus of rats. *Hippocampus*. 2000;10:244-60.
- White TW, Paul DL. Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annu Rev Physiol* 1999;61:283-310.
- White TW. Unique and redundant connexin contributions to lens development. *Science*. 2002;295:319-20.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron*. 1997;18:779-91.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M, Deutsch U, Söhl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem*. 2002;383:725-737.
- Wolf HK, Aliashkevich AF, Blümcke I, Wiestler OD, Zentner J. Neuronal loss and gliosis of the amygdaloid nucleus in temporal lobe epilepsy. A quantitative analysis of 70 surgical specimens. *Acta Neuropathol*. 1997;93:606-610.
- Ya J, Erna BHW, Erdtsieck-Ernste BHW, de Boer PAJ, van Kempen MJA, Jongsma H, Gros D, Moorman AFM, Lamers WH. Heart defects in connexin43-deficient mice. *Circ Res*. 1998;82:360-366.
- Yamada KA, Rogers JG, Sundset R, Steinberg TH, Saffitz JE. Up-regulation of connexin45 in heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;14:1205-12.
- Yancey SB, Biswal S, Revel JP. Spatial and temporal patterns of distribution of the gap junction protein connexin43 during mouse gastrulation and organogenesis. *Development*. 1992;114:203-212.
- Yeh HI, Dupont E, Coppen S, Rothery S, Severs NJ. Gap junction localization and connexin expression in cytochemically identified endothelial cells of arterial tissue. *J Histochem Cytochem*. 1997;45:539-50.
- Zamir O, Hanani M. Intercellular dye-coupling in intestinal smooth muscle. Are gap junctions required for intercellular coupling? *Experientia*. 1990;46:1002-5.
- Zhang Y, Riesterer C, Ayrall AM, Sablitzky F, Littlewood TD, Reth M. Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 1996;24:543-548.
- Zhang Y, Wienands J, Zurn C, Reth M. Induction of the antigen receptor expression on B lymphocytes results in rapid competence for signaling of SLP-65 and Syk. *EMBO J*. 1998;17:7304-7310.
- Zhang C, Restrepo D. Expression of connexin 45 in the olfactory system. *Brain Res*. 2002;929:37-47.
- Zhang JT, Nicholson BJ. Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA. *J Cell Biol*. 1989;109:3391-3401.
- Zhang YW, Nakayama K, Nakayama K, Morita I. A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). *Cancer Res*. 2003;63:16231630.
- Zheng-Fischhöfer Q, Ghanem A, Kim J-S, Kibschull M, Schwarz G, Schwab JO, Nagy J, Winterhager E, Tiemann K, Willecke K. Connexin31 cannot functionally replace Connexin43 during cardiac morphogenesis in mice. 2005. Zur Veröffentlichung eingereicht.
- Zhou L, Kasperek, EM, Nicholson BJ. Dissection of the molecular basis of pp60 (v-src) induced gating of connexin 43 gap junction channels. *J Cell Biol*. 1999;144:1033-1045.
- Zingg HH, Rozen F, Chu K, Larcher A, Arslan A, Richard S, Lefebvre D. Oxytocin and oxytocin receptor gene expression in the uterus. *Recent Prog Horm Res*. 1995;50:255-73.
- Zoidl G, Dermietzel R. On the search for the electrical synapse: a glimpse at the future. *Cell Tissue Res*. 2002;310:137-142.
- Zou DJ, Greer CA, Firestein S. Expression pattern of alpha CaMKII in the mouse main olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 2002;443:226-36.

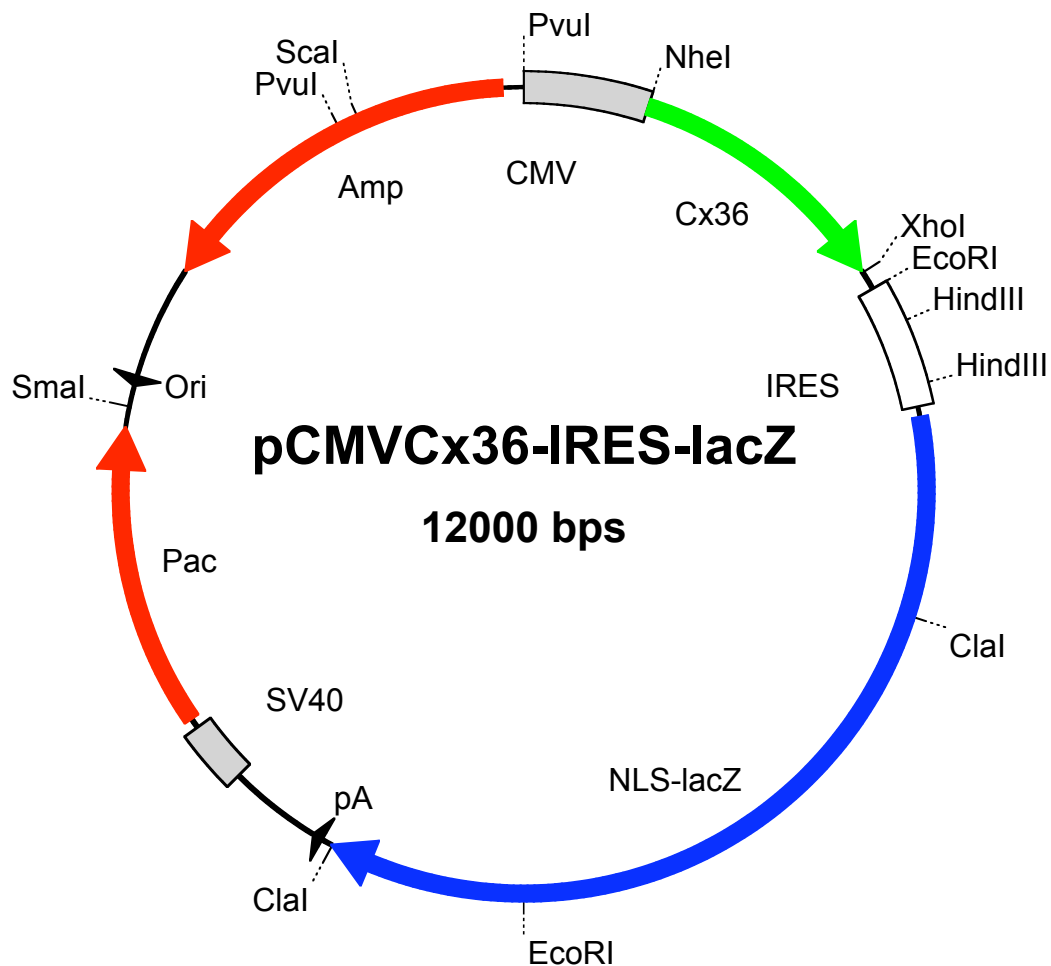
9. Anhang

Vektorkarten



A1: Karte des Austauschvektors pCx45KI36-IRES-lacZ.

Cx36: kodierende, Intron-freie Region des Cx36-Gens, E1-3: Cx45Exon1-3, flox: loxP-Erkennungsstelle, firt: firt-Erkennungsstelle, 3'HR: 3'-Homologiebereich, 5'HR: 5'-Homologiebereich, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, neo: Neomycin-Resistenzgen, NLS-lacZ: Gen der β -Galaktosidase mit Kernlokalisationssignal, pA end.: endogenes Polyadenylierungssignal des Cx45-Gens, SA: Spleißakzeptor des Cx45-Gens, SV40pA: 6-faches Polyadenylierungssignal aus dem SV40-Virus



A2: Karte des HeLa-Testvektors pCMVCx36-IRES-lacZ.

Amp: Ampicillin-Resistenzgen, CMV: Promotor des Cytomegalovirus, Cx36: kodierende, Intron-freie Region des Cx36-Gens, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, NLS-lacZ: Gen der β -Galaktosidase mit Kernlokalisationssignal, Ori: Replikationsursprung, pA: Polyadenylierungs-signal des SV40-Virus, Pac: Puromycin-Resistenzkassette, SV40: Promotor des SV40-Virus

Erklärung

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

Bonn, den 09. August 2005.

Britta Döring