

**Untersuchungen zur Regulation der Zell-Zell-Kommunikation durch  
Degradation und posttranslationale Modifizierung der Connexine**

**Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. Nat.)

der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

vorgelegt von  
Stephanie Brigitte Urschel  
aus Saarbrücken

Bonn 2001

# Inhaltsübersicht

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen

1 Einleitung	7
2 Material	29
3 Methoden	43
4 Ergebnisse	68
5 Diskussion	122
6 Zusammenfassung	142
7 Literatur	144

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsübersicht.....	1
Inhaltsverzeichnis .....	2
Verzeichnis der Abkürzungen .....	6
1 Einleitung.....	7
1.1 Interzelluläre Kommunikation mittels Gap Junctions.....	7
1.2 Aufbau der Gap Junctions .....	7
1.3 Connexine: Die Proteine der Gap Junctions .....	8
1.3.1 Nomenklatur .....	9
1.3.2 Genfamilie der Connexine.....	9
1.3.3 Topologie der Connexine .....	11
1.4 Eigenschaften der Gap Junction Kanäle.....	13
1.4.1 Die strukturelle Vielfalt der Gap Junction Kanäle .....	13
1.4.2 Elektrische Einzelkanalleitfähigkeit, Permeabilität und Selektivität .....	14
1.5 Funktionen von Gap Junction Kanälen .....	16
1.5.1 Embryonalentwicklung.....	16
1.5.2 Nährstoffaustausch .....	17
1.5.3 Weiterleitung elektrischer Erregungswellen .....	17
1.5.4 Connexine und Krankheiten .....	18
1.6 Regulation der Gap Junction vermittelten interzellulären Kommunikation .....	20
1.6.1 Regulation des Öffnungszustandes.....	20
1.6.2 Regulation der Connexinexpression.....	22
1.6.3 Regulation durch Degradation der Connexine .....	23
1.7 Der Lebenszyklus der Gap Junctions .....	24
1.7.1 Bildung von Gap Junction Kanälen.....	24
1.7.2 Degradation von Gap Junction Kanälen.....	26
1.8 Ziele dieser Arbeit.....	27
1.8.1 Degradation .....	27
1.8.2 Phosphorylierung.....	27
2 Material.....	29
2.1 Chemikalien .....	29
2.2 Einwegartikel .....	29

2.3	Allgemeine Stammlösungen, Puffer und Enzymlösungen.....	29
2.4	Lösungen für die Bakterienkultur .....	31
2.5	Bakterienstamm.....	33
2.6	Plasmide .....	33
2.7	Oligonukleotide und Hybridisierungssonden.....	35
2.8	Lösungen für die Zellkultur.....	36
2.9	Zellen.....	38
2.10	Antikörper .....	39
2.11	Größenstandards.....	41
2.12	Kommerzielle Reagenzien-Sätze .....	42
3	Methoden .....	43
3.1	Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation.....	43
3.2	DNS-Präparation .....	44
3.2.1	Analytische-Plasmid-Isolierung (Minipräparation).....	44
3.2.2	Präparative-Plasmid-Isolierung (Midipräparation).....	45
3.2.3	Isolierung von DNS aus Agarosegelen.....	45
3.2.4	Fällung von DNS mit der Natriumacetat-Methode .....	45
3.2.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	46
3.3	RNS-Präparation .....	46
3.3.1	RNS-Isolierung aus Kulturzellen mit TriStar <sup>TM</sup> -Reagenz.....	47
3.4	DNS-in-vitro Rekombination.....	48
3.4.1	Restriktionsendonukleasespaltung.....	48
3.4.2	Ligation überhängender, kohäsiver Enden .....	48
3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
3.6	Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNS und RNS .....	50
3.6.1	Native Gelelektrophorese .....	50
3.6.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese.....	50
3.6.3	Nukleinsäuretransfer und – Hybridisierung .....	51
3.6.4	Transfer von RNS auf eine Trägermembran (Northern Blot) .....	51
3.7	Herstellung radioaktiv markierter Sonden .....	52
3.7.1	Hybridisierung an immobilisierter RNS.....	52
3.8	Kultur und stabile Transfektion höherer Zellen .....	53
3.8.1	Kultivierung von adhärenenten Säugerzelllinien .....	53
3.8.2	Präparation und Kultivierung von Hepatozyten aus Mausembryonen.....	54

3.8.3	Behandlung von Zellen mit Degradationshemmern und anderen Reagenzien....	55
3.8.4	Metabolische Markierung von Kulturen adhärenter Zellen .....	56
3.8.5	Stabile Transfektion mit Hilfe der Lipofektin-Methode.....	57
3.9	Mikroinjektion in adhärent wachsenden Kulturzellen .....	57
3.10	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse .....	60
3.11	Proteinpräparation .....	61
3.11.1	Herstellung von Zelllysaten.....	61
3.11.2	Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten .....	62
3.11.3	Immunpräzipitation .....	62
3.12	„Pulse-Chase“-Experimente.....	64
3.13	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	64
3.14	Proteintransfer und immunologischer Nachweis .....	66
3.14.1	Elektroblot .....	66
3.14.2	Immunologischer Proteinnachweis.....	67
4	Ergebnisse .....	68
4.1	Die Halbwertszeit von Connexin43 ist abhängig von der exprimierenden Zelle.....	68
4.1.1	Nachweis von Cx43 in den verschiedenen Zellsystemen.....	69
4.1.2	Bestimmung der Halbwertszeit von Connexin43 in den verschiedenen Zellsystemen.....	73
4.2	Connexin26 wird in primären Hepatozyten durch die Expression von Cx32 stabilisiert.....	78
4.3	An der Degradation von Connexin26 und 32 sind sowohl Lysosomen als auch Proteasomen beteiligt.....	81
4.3.1	Die Hemmung des lysosomalen und des proteasomalen Abbauweges führen zu einer Steigerung der Proteinmenge von Cx26 und Cx32 .....	81
4.3.2	Die Hemmung des lysosomalen und des proteasomalen Abbauweges führt zu einer Verlängerung der Halbwertszeit von Cx26 und Cx32.....	85
4.3.3	Die Hemmung des lysosomalen und des proteasomalen Abbauweges führt zu einer Steigerung der Kopplung.....	91
4.3.4	Die Hemmung des lysosomal vermittelten Abbaus durch Chloroquin führt zu einer Anreicherung von Cx32 in dephosphorylierter Form.....	97
4.4	Connexin26 wird auch in HeLa-Zellen durch die Expression von Cx32 stabilisiert	101
4.4.1	Stabile Transfektion von HeLa-Cx26-Zellen mit Cx32 .....	101
4.4.2	Charakterisierung der HeLa-Cx26/ Cx32- Doppeltransfektanten .....	102

4.4.3	In VI F5-Zellen ist die Halbwertszeit von Cx26 im Vergleich zu HeLa-Cx26-Zellen stark verlängert .....	106
4.5	Hinweise auf die Bildung von heteromeren Kanälen aus Connexin26 und Connexin32.....	108
4.6	Die Stabilisierung eines Connexins auf Proteinebene durch Koexpression eines zweiten Connexins lässt sich auch auf andere Connexine übertragen: Cx43 stabilisiert Cx45.....	110
4.7	Die Zell-Zell-Kommunikation mittels Gap Junction Kanälen kann durch das Phosphorylierungsmuster des exprimierten Connexins gesteuert werden .....	113
4.7.1	Vergleichende Charakterisierung der Cx43-Expression in U 87- und A 172-Zellen .....	113
4.7.2	Die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und die Aktivierung der Proteinkinase C mit TPA verändern die Kopplung von U 87- und A 172-Zellen.....	118
5	Diskussion.....	122
5.1	Kann die Zell-Zell-Kommunikation durch die Degradationsrate gesteuert werden?122	
5.1.1	Ein Connexin kann durch die Koexpression eines weiteren Connexins gegen Abbau stabilisiert werden .....	122
5.1.2	Der Abbauweg von Connexin26 und Connexin32 beinhaltet lysosomale und proteasomale Degradation .....	125
5.1.3	Die Hemmung der lysosomalen Degradation führt zu einer Anreicherung von deutlich schwächer phosphoryliertem Cx32 im Vergleich zur Kontrolle .....	129
5.1.4	Die Degradationsrate beeinflusst die Zell-Zell- Kommunikation .....	132
5.2	HeLa-Transfektanten: ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Degradation .....	135
5.3	Bilden Connexin26 und Connexin32 heteromere Kanäle?.....	136
5.4	Die Beeinflussung der Kopplung durch Reagenzien, die das Phosphorylierungsmuster verändern können .....	137
5.5	Ausblick .....	139
6	Zusammenfassung.....	142
7	Literatur.....	144

## Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin	µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung	µl	Mikroliter
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser	mA	Milliampere
abs.	absolut	mg	Milligramm
Ac	Acetat	ml	Milliliter
ad	addieren	mM	Millimolar
Amp	Ampicillin(Resistenzgen)	min	Minuten
APS	Ammoniumpersulfat	MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
AS	Aminosäure	mRNS	Boten-RNS
ATP	Adenosintriphosphat	N	Normalität
bp	Basenpaare	nA	Nanoampere
BSA	Rinderserumalbumin	ng	Nanogramm
Bq	Bequerel, Einheit der Radioaktivität	nm	Nanometer
C	Cytosin	Neurobiotin	N-(2-aminoethyl)-biotinamid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat	OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei Wellenlänge x in nm
dbcAMP	dibutyryl-cAMP	p	Plasmid
Ci	Curie (3,7×10 <sup>10</sup> Zerfälle / sec)	pM	Pikomolar
CL	Zytoplasmatische Schleife	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
cm	Zentimeter	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
CMV	Cytomegalovirus	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
cpm	Zerfälle pro Minute	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
CT	Carboxy-Ende eines Peptids	RNase	Ribonuklease
CTP	Cytidintriphosphat	RNS	Ribonukleinsäure
Cx	Connexin	rRNS	Ribosomale RNS
Da	Dalton	RT	Raumtemperatur
DAB	Diaminobenzidin	s	Sekunden
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	SDS	Natriumdodecylsulfat
DMPC	Dimethylpyrocarbonat	SSC	Trinatriumcitrat
DMSO	Dimethylsulfoxid	SV40	Simian Virus 40
DNase	Desoxyribonuklease	T	Thymin
DNS	Desoxyribonukleinsäure	Tab.	Tabelle
dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat	TBE	TRIS-Borat-EDTA Puffer
EGFP	Verstärkt Grün-Fluoreszierendes-Protein	TE	TRIS-EDTA Puffer
E. coli	Escherichia coli	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
EtBr	Ethidiumbromid	TRIS	TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan
EtOH	Ethanol	tRNS	Transfer-RNS
FCS	fötales Kälberserum	U	Enzymeinheit (Unit)
G	Guanin	ÜN	über Nacht
GAR	Goat anti rabbit	UpM	Umdrehungen pro Minute
GTP	Guanosintriphosphat	UV	Ultraviolett
°C	Grad Celsius	V	Volt
g	Gramm	Vol.	Volumen
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat	wt	Wildtyp
kb	Kilobasenpaare (1000 bp)	v/v	Volumen pro Volumen
kDa	Kilodalton (1000 Da)	w/v	Gewicht pro Volumen
LB-Medium	Luria-Bertani Medium		
Lsg.	Lösung		
l	Liter		
M	Molar		
MCS	Vielfachklonierungsstelle		
MG (MW)	Molekulargewicht		

# 1 Einleitung

## 1.1 Interzelluläre Kommunikation mittels Gap Junctions

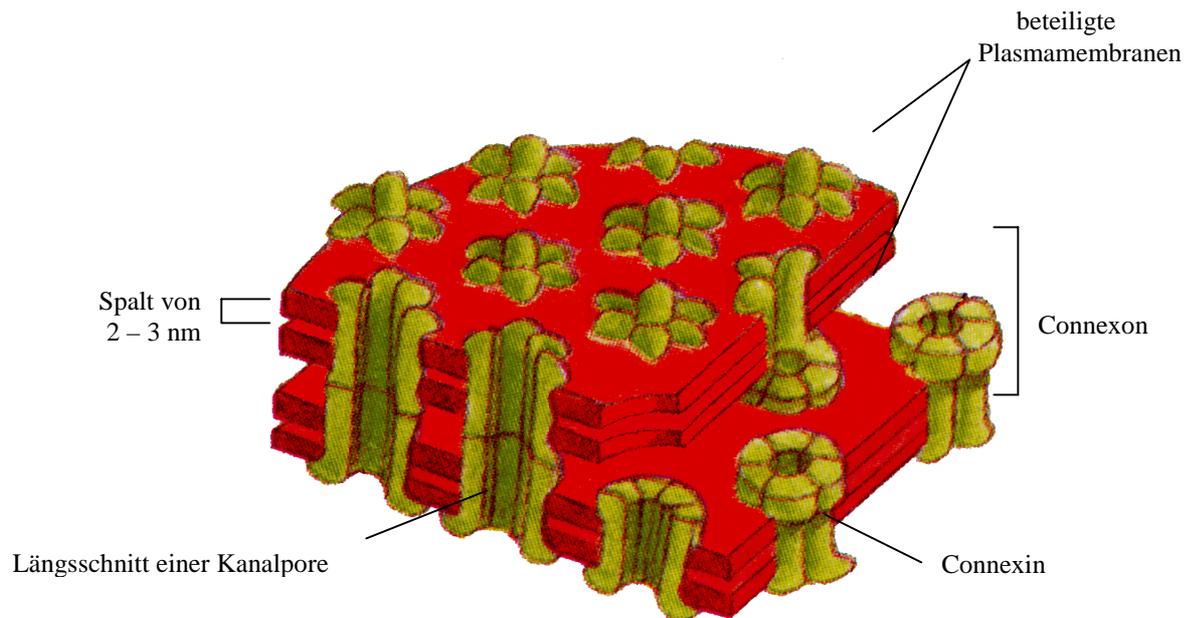
Ein Hauptmerkmal von multizellulären Organismen ist die koordinierte Antwort auf externe und interne Reize. Dieses Verhalten erfordert eine komplexe interzelluläre Kommunikation, die ein geordnetes physiologisches Zusammenwirken einzelner Zellen und Zellgruppen zum Nutzen des Gesamtorganismus ermöglicht. Mechanismen zur Übermittlung von interzellulären Signalen erlauben jeder Zelle ihre spezielle Rolle im Zellverband zu erfüllen. Die stammesgeschichtlich älteste Form der Signalübermittlung von Zelle zu Zelle bei Tieren sind Gap Junction Kanäle, spezialisierte Membranstrukturen, die Zytoplasmata benachbarter Zellen direkt miteinander verbinden und so den Austausch von Ionen und kleinen Molekülen ermöglichen.

Gap Junction Kanäle konnten sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten gefunden werden (Finbow et al., 1984; Pitts und Finbow, 1986; Berdan und Gilula, 1988). Bei den Mammalia sind sie in fast allen Zelltypen vertreten, mit Ausnahme einiger weniger terminal differenzierten Zellen wie Skelettmuskelzellen, Spermien und Erythrozyten. Auch Pflanzen weisen Gap Junction-ähnliche Strukturen auf, die als Plasmodesmata bezeichnet werden, und ebenfalls der Zell-Zell-Kommunikation dienen (Yaholm et al., 1991; Hunte et al., 1993).

## 1.2 Aufbau der Gap Junctions

Der Begriff der Gap Junctions wurde von Revel und Karnovsky (1967) geprägt, die das Auftreten spezieller Membranstrukturen im Zusammenhang mit der elektrischer Kopplung zwischen tierischen Zellen beobachtet hatten.

Der Abstand der Plasmamembranen zweier benachbarter Zellen beträgt im Normalfall 20 bis 30 nm, im Bereich der Gap Junctions verringert sich dieser Abstand auf 2 bis 3 nm (Caspar et al., 1988). Dieser interzelluläre Spalt wird von hexameren Strukturen, den Gap Junction Kanälen überbrückt (Revel und Karnovsky, 1967). Gap Junction Kanäle können einzeln oder als Aggregate von bis zu mehreren tausend auftreten. Ab einer Dichte von circa  $10^4$  Kanälen pro  $\mu\text{m}^2$  Membranfläche spricht man von Gap Junction-Plaques (Löwenstein, 1981). Aus den Ergebnissen elektronenmikroskopischer Untersuchungen (Chalcrokt und Bullivant, 1970, Unwin und Zampighi, 1980) und Röntgenstrahlbeugungsanalysen (Makowski et al., 1977) konnte schließlich ein Modell für die Struktur der Gap Junction Kanäle abgeleitet werden.



**Abbildung 1 - 1:** Schematischer Ausschnitt aus einem Gap Junction-Plaque mit Gap Junction Kanälen und den Plasmamembranen zweier Zellen (verändert nach: Makowski et al., 1977)

Jede Zelle stellt einen Halbkanal, auch als Connexon bezeichnet, zur Bildung eines kompletten, funktionellen Kanals zur Verfügung, um den interzellulären Spalt zu überbrücken. Sechs identische oder ähnliche Transmembranproteine (Connexine) lagern sich radial zusammen und bilden so eine zentrale, hydrophile Pore. Dieses Hexamer stellt ein Connexon dar. Jedes Connexon hat einen Außendurchmesser von 7 bis 8 nm, und in geöffneten Zustand eine Porenweite von 1 bis 1,5 nm (Caspar et al., 1977, Makowski et al., 1977; Loewenstein, 1981; Yaeger, 1998).

### 1.3 Connexine: Die Proteine der Gap Junctions

Gap Junction Proteine stammen aus einer Multigenfamilie. Die biochemische Untersuchung von Gap Junction-haltigen Membranfraktionen diverser Gewebe, wie beispielsweise Leber, Herz und Linse, ergab, dass es sich bei den in diesen Organen vorkommenden Connexinen um unterschiedliche, aber homologe Proteine handelt (Kistler et al., 1988). Manche Connexine werden in mehr Zellen exprimiert als andere, und die meisten Zellen exprimieren mindestens zwei verschiedene Connexine. Trotz der hohen Homologie weisen die aus unterschiedlichen Connexine gebildeten Kanäle spezifische, unterschiedliche Eigenschaften auf.

### 1.3.1 Nomenklatur

Für die Nomenklatur der Connexine existieren zwei alternative Systeme. Nach der von Beyer vorgeschlagenen Nomenklatur setzt sich der Name für ein Connexin aus der Abkürzung Cx und der aus der cDNS-Sequenz abgeleiteten theoretischen Molekülmasse zusammen (Beyer et al., 1988). Beispielsweise wird das in der Leber vorkommende 21kDa-Connexinprotein mit Cx26 bezeichnet. Die Bezeichnung der Spezies, abgekürzt oder ausgeschrieben, kann dem Namen vorangestellt werden, so ist hCx26 oder humanCx26 der Name für das menschliche Connexin Cx26.

Die zweite Nomenklatur unterteilt die Connexine entsprechend dem Grad ihrer Sequenzidentität in vier verschiedene Gruppen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ) ein. Die Mehrheit der bekannten Connexine gehören der  $\alpha$ - oder der  $\beta$ -Gruppe an (Gimlich et al., 1990), Cx36 und Cx45 bilden jeweils eine eigene Gruppe (Goodenough et al., 1996; Söhl et al., 1996). Der Name eines Connexins ergibt sich aus der Bezeichnung der Gruppe gefolgt von einer Zahl, die den Connexinen einer Gruppe fortlaufend nach dem Zeitpunkt ihrer Entdeckung zugeordnet wird.

### 1.3.2 Genfamilie der Connexine

Gemeinsames Merkmal fast aller Connexine ist ihre Genstruktur (siehe Abbildung 1 - 2). Connexingene bestehen aus zwei Exons, wobei dem oft kurzen, untranslatierten ersten Exon ein Intron variabler Länge und dann das zweite Exon, das die komplette kodierende Region enthält, folgt.



**Abbildung 1 - 2:** Schema der Genstruktur der Connexine

Bisher wurden drei Connexine gefunden, deren Genstruktur von diesem Muster abweicht. Bei Cx35 aus Rochen (O'Brien et al., 1996) und dem dazu homologen Cx36 der Maus (Söhl et al., 1998) unterbricht ein Intron die kodierende Region; das Cx45-Gen aus Maus enthält drei Exons, die untranslatierten Exons 1 und 2, die von dem kodierenden Exon 3 gefolgt werden (Plum, Dissertation 1999).

In Tabelle 1 - 1 ist eine Übersicht der bisher bekannten Connexine der Maus dargestellt. Ebenso konnten auch Connexingene aus dem Genom einiger anderer Tierarten beispielsweise Xenopus (Ebihara et al., 1989; Gimlich et al., 1990), Huhn (Beyer et al., 1990; Rup et al., 1993), Hund (Kanter et al., 1992) und aus Mensch kloniert und dem entsprechenden Nager-Connexinen zugeordnet werden.

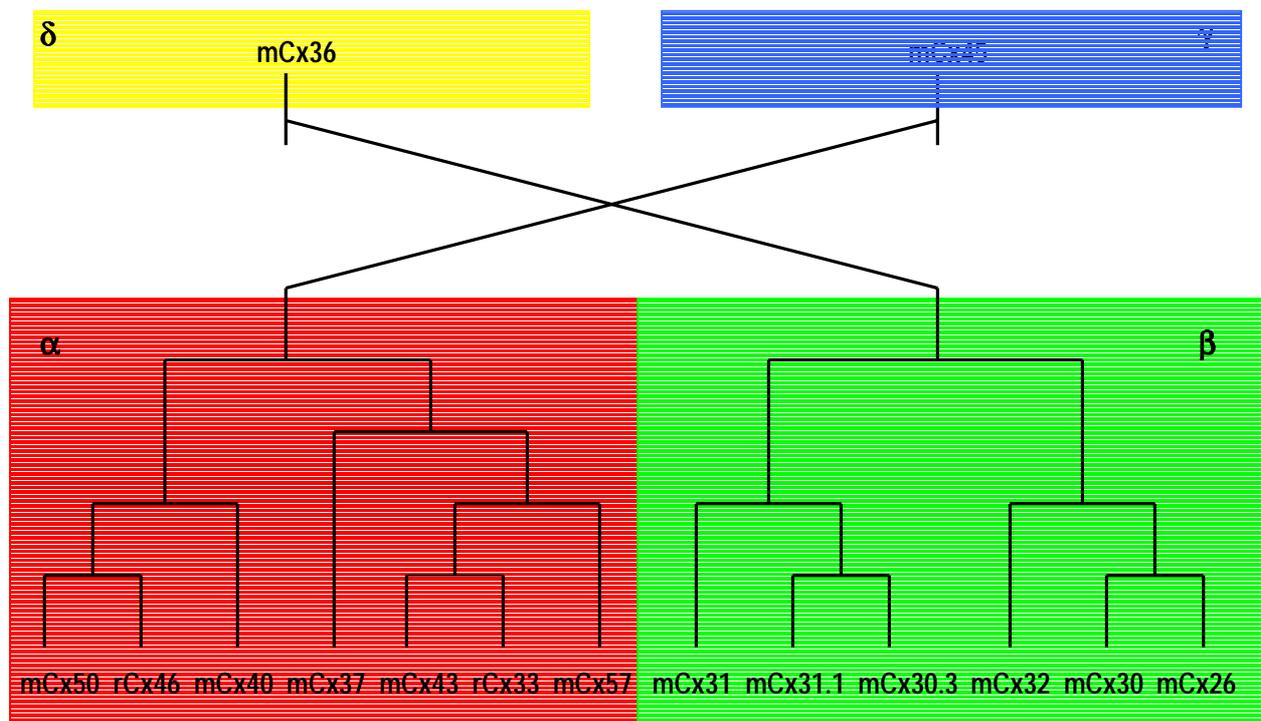
Connexin	Alternative Nomenklatur	Theoretische Molmasse [kDa]	Expressionsorte (Beispiele)	Chromosomale Lokalisierung
<b>Cx26</b>	β2	26.5	Gehirn <sup>3</sup> , Pankreas <sup>4</sup> , Niere <sup>5</sup> , Endometrium <sup>7</sup> ,	14
<b>Cx30</b>	β6	30.4	Haut <sup>17</sup> , Gehirn <sup>17</sup>	
<b>Cx30.3</b>	β5	30.3	Haut <sup>13</sup>	4
<b>Cx31</b>	β3	31.0	Placenta <sup>8</sup> , Haut <sup>13</sup>	4
<b>Cx31.1</b>	β4	31.1	Haut <sup>13</sup>	4
<b>Cx32</b>	β1	32.0	Pankreas <sup>1</sup> , Gehirn <sup>3</sup> , Leber <sup>5</sup> ,	X
<b>Cx33</b>	α7	32.9	Haut <sup>12</sup> , Hoden <sup>12</sup>	X
<b>Cx36</b>	δ1	36.1	Retina <sup>18</sup>	
<b>Cx37</b>	α4	37.6	Lunge <sup>11</sup> , Niere <sup>11</sup> ,	4
<b>Cx40</b>	α5	40.4	Herz <sup>13</sup> , Lunge <sup>13</sup> , Niere <sup>13</sup> , Endothel <sup>15</sup>	3
<b>Cx43</b>	α1	43.1	Herz <sup>11</sup> , Gehirn <sup>3</sup> , Endothel <sup>6</sup> , Lunge <sup>9</sup>	10
<b>Cx45</b>	γ1	45.7	Lunge <sup>13</sup> , Haut <sup>16</sup> , Herz <sup>19</sup>	11
<b>Cx46</b>	α3	46.0	Linse <sup>10</sup> , Herz <sup>10</sup>	14
<b>Cx50</b>	α8	49.6	Linse <sup>14</sup>	3
<b>Cx57</b>	α9	57.1	Haut <sup>20</sup> , Herz <sup>20</sup> , Niere <sup>20</sup>	

**Tabelle 1 - 1:** Bekannte Nagerconnexine, Beispiele ihrer Expressionsorte und die chromosomale Lokalisierung ihrer Gene bei der Maus (Beispiele), Cx29 ist noch nicht berücksichtigt.

Quellen : <sup>1</sup> Dermitzel et al., 1984; <sup>2</sup> Beyer et al., 1987; <sup>3</sup> Dermitzel et al., 1984; <sup>4</sup> Traub et al., 1989; <sup>5</sup> Zhang und Nicholson, 1989; <sup>6</sup> Larson et al., 1990; <sup>7</sup> Risek et al., 1990; <sup>8</sup> Hoh et al., 1991; <sup>9</sup> Nishi et al., 1991; <sup>10</sup> Paul et al., 1991; <sup>11</sup> Willecke et al., 1991b; <sup>12</sup> Haeflinger et al., 1992; <sup>13</sup> Hennemann et al., 1992a, b, c und d; <sup>14</sup> White et al., 1992; <sup>15</sup> Bruzzone et al., 1993; <sup>16</sup> Butterweck et al., 1994; <sup>17</sup> Dahl et al., 1996; <sup>18</sup> Söhl et al., 1998; <sup>19</sup> Thomas et al., 1998; <sup>20</sup> Mantey et al., 1999.

Genfamilien entstehen im Verlauf der Evolution durch Duplikation und Abwandlung der ursprünglichen Gene. Wie auch für andere Genfamilien lässt sich für die Connexine ein

Stammbaum durch einen Vergleich der Aminosäuresequenzen aufstellen. Eine Betrachtung aller bisher bekannten Aminosäuresequenzen von Connexinen weist auf einen ähnlichen Aufbau der Connexinproteine aus Zytoplasma-, Transmembran- und Extrazellulardomänen hin. Die beiden extrazellulären Schleifen haben einen hohen Konservierungsgrad, sie weisen 60 bis 80 % Sequenzidentität auf und eignen sich gut für vergleichende Analysen. Abbildung 1 - 3 zeigt die Aufteilung der Connexine in vier Gruppen; Cx36 und Cx45 haben Sonderstellung als einziges Connexin in ihrer jeweiligen Gruppe.

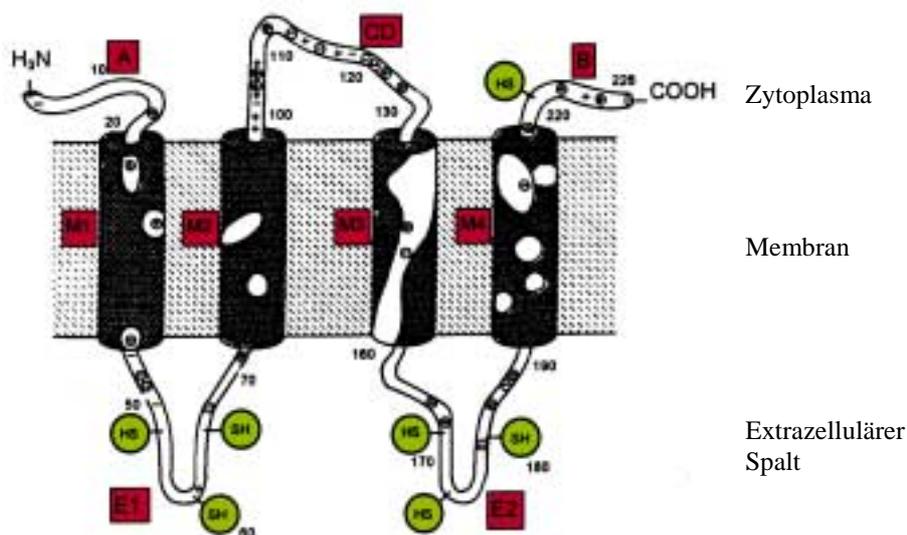


**Abbildung 1 - 3:** Phylogenetischer Stammbaum der Nagetier-Connexine. Grundlage ist der Vergleich der ersten extrazellulären Schleifen von Ratte Cx33, Ratte Cx46 und fast allen bekannten Maus-Connexinen mittels des HUSAR-Programms TREE. (Verändert nach Söhl et al., 1998). Nicht berücksichtigt ist Cx29, das erst kürzlich von Söhl (in Vorbereitung) entdeckt wurde und das in zusätzliche, neue Gruppe eingeordnet wird.

### 1.3.3 Topologie der Connexine

Um ein Modell der molekularen Struktur der Connexine abzuleiten, wurden diverse Connexine mit verschiedenen Methoden untersucht. Hydrophobizitäts-Analysen der von den jeweiligen cDNS abgeleiteten Aminosäuresequenzen (Kyte und Doolittle, 1982) ergaben ein Muster aus konservierten und variablen Regionen, aus dem sich ein Strukturmodell eines

Transmembranproteins ergab, das die Plasmamembran mit vier, circa 20 Aminosäuren langen, hydrophoben Domänen durchspannt. Weitere Ergebnisse aus selektiven proteolytischen Spaltungen (Zimmer et al., 1987; Hertzberg et al., 1988; Yancey et al., 1989), Peptidmikrosequenzierungen und Untersuchungen mit peptidspezifischen Antikörpern (Goodenough et al., 1988; Nicholson und Zhang, 1988; Beyer et al., 1989; Laird und Revel, 1990) bestätigten und erweiterten dieses Modell. Danach besteht ein Connexin aus vier als M1 bis M4 bezeichneten Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Schleifen (E1 und E2) und Amino- und Carboxyterminus, die beide im Zytoplasma lokalisiert sind. Die beiden extrazellulären Schleifen E1 (zwischen M1 und M2) und E2 (zwischen M3 und M4), sowie die Transmembrandomänen M1 bis M4 stellen die am stärksten konservierten Regionen der Connexine dar. Im Gegensatz dazu weisen die zytoplasmatische Schleife (zwischen M2 und M3) und der Carboxyterminus höchste Sequenzvariabilität auf. Die Ursache der Größenunterschiede der Connexine liegt hauptsächlich in den verschiedenen Längen dieser Regionen des Moleküls (Bennett et al, 1991).



**Abbildung 1 – 4:** Topologisches Modell des Cx26-Proteins, (Nicholson und Zhang, 1988.)

Röntgenstrahl-Beugungsanalysen (Tibbitts et al., 1990) ergaben weitere Informationen über die Transmembranregionen: sie sind circa 3 bis 4 nm lang, haben eine  $\alpha$ -helicale Sekundärstruktur und sind bezüglich der Kanalachse um  $20^\circ$  geneigt. Die dritte Transmembrandomäne ist wahrscheinlich an der Auskleidung der Kanalpore beteiligt, da sie einen amphiphilen Charakter hat, jede vierte Aminosäure trägt hier einen polaren Rest.

Rahmann und Evans (1991) zeigten, dass die beiden extrazellulären Domänen über drei konservierte Cysteinreste verfügen, die sowohl innerhalb einer Schleife als auch zwischen den

Schleifen Disulfidbrücken ausbilden. Diese Disulfidbrücken stabilisieren die Konformation der extrazellulären Schleifen und sind wichtig für das Andocken zweier Connexone zur Bildung eines vollständigen Kanals (Dahl et al., 1994; Foote et al., 1998; Yeager, 1998).

## **1.4 Eigenschaften der Gap Junction Kanäle**

Ursprünglich wurde angenommen, dass Gap Junction Kanäle unspezifische Poren sind, durch die Moleküle bis circa 1000 Da frei passieren können. Inzwischen ist aber bekannt, dass Gap Junctions unterschiedliche Permeabilität für bestimmte Moleküle aufweisen und so eine selektive Kommunikation erlauben. Aus verschiedenen Connexinen aufgebaute Gap Junction Kanäle haben spezifische biophysikalische Eigenschaften und unterscheiden sich sowohl in ihrer Selektivität und in ihrer Permeabilität als auch in ihrer elektrischen Einzelkanalleitfähigkeit. Diese Charakteristika zusammen mit der Vielfalt von Connexinisoformen eröffnet ein breites Spektrum möglicher spezifischer Funktionen von biologischer Relevanz.

### **1.4.1 Die strukturelle Vielfalt der Gap Junction Kanäle**

Connexine zeigen ein spezifisches, zeitliches und räumliches Ausprägungsmuster. Ihre Expression erfolgt gewebe- und zelltypisch ( z. B.: Paul, 1985; Beyer et al., 1989; Dermietzel et al., 1989; Gimlich et al., 1990; Risek und Gilula, 1991; Golinger und Paul 1994, Söhl et al., 1998). Gap Junction Kanäle, die aus verschiedenen Connexinen zusammengesetzt sind, besitzen unterschiedliche biophysikalische Eigenschaften. Sie unterscheiden sich in Einzelkanalleitfähigkeit, Permeabilität und Spannungsabhängigkeit (Fishman et al., 1990; Swensom et al., 1990; Bennett et al., 1991; Moreno et al., 1991 und 1994; Chen et DeHaan, 1992; Takens-Kwak und Jongma, 1992; Veenstra et al., 1992 und 1994a und b; Kanemitsu und Lau 1993, Steinberg et al., 1994).

Zusätzlich zu den diversen Kanälen, die nur aus einem einzigen Connexin zusammengesetzt sind, ermöglicht der Aufbau eines Gap Junction Kanals aus zwei Connexonen, die ihrerseits wieder aus sechs Connexinen aufgebaut sind, eine große Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten an Gap Junction Kanälen unterschiedlicher Eigenschaften. Man

unterscheidet zwischen *homomeren* (aus sechs gleichen Untereinheiten aufgebauten) und *heteromeren* (aus verschiedenen Untereinheiten aufgebauten) Connexonen. Connexone können entweder mit Connexonen desselben Typs einen *homotypischen* oder mit anderen Connexonen einen *heterotypischen* Kanal bilden (Kumar und Gilula, 1996).

Durch Untersuchungen an Oozyten-Paaren der Spezies *Xenopus laevis*, in die mRNS verschiedener Connexine mikroinjiziert wurde, konnten heterotypische Kanäle nachgewiesen werden (White et al., 1995). Die Existenz heterotypische Kanäle konnte auch mit humanen Zellen, die mit cDNS für unterschiedliche Connexine transfiziert wurden bestätigt werden (Elfgang et al., 1995). Diese Experimente zeigten, dass nur einige Kombinationen von Connexinen zu funktionsfähigen Kanälen führen. So können beispielsweise homomere Cx43 Connexone mit homomeren Connexonen, aufgebaut aus Cx37 oder Cx45, heterotypische, funktionelle Gap Junction Kanäle bilden, nicht aber mit Cx40. Mutagenesestudien ergaben, dass die zweite extrazelluläre Schleife der beteiligten Connexine das Andocken zweier Connexone zur Bildung eines kompletten Kanals vermittelt (White et al., 1994). Andere Untersuchungen deuten auf eine Beteiligung der zytoplasmatischen Schleife und des C-Terminus hin (Haubrich et al., 1996). Der Nachweis von heteromeren Kanälen ist schwierig und konnte nur in Einzelfällen durchgeführt werden. So konnte die Bildung von heteromeren Gap Junction Halbkanälen aus den in Hepatozyten vorkommenden Connexinen Cx26 und Cx32 nur in einem zellfreien Transkriptions/Translations-System nachgewiesen werden (Ahmad et al., 1999). In Hepatozyten dagegen konnte nur gezeigt werden, dass homotypische und heterotypische Gap Junction Kanäle aus Cx26 und Cx32 existieren, die Anwesenheit von heteromeren Kanälen aus diesen beiden Connexinen konnte weder nachgewiesen noch ausgeschlossen werden (Valiunas et al., 1999).

#### **1.4.2 Elektrische Einzelkanalleitfähigkeit, Permeabilität und Selektivität**

**Elektrische Einzelkanalleitfähigkeit:** Die Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen zeigten, dass Gap Junction Kanäle aus verschiedenen Connexinen unterschiedliche elektrische Einzelkanalleitfähigkeiten von 26 bis 300 pS zeigen (Chen und DeHaan, 1992; Takens-Kwak et al., 1992; Veenstra et al., 1992 und 1994a und b; Moreno et al., 1994; Spray, 1994). Auch

können die Werte der elektrischen Einzelkanalleitfähigkeit eines, aus einem Connexin gebildeten Kanals, abhängig von der Phosphorylierung des Connexins, variieren (Moreno et al., 1992 und 1994).

**Permeabilität und Selektivität:** Die Permeabilität eines Gap Junction Kanals kann durch die Mikroinjektion eines Indikatormoleküls oder eines Farbstoffs und die Beobachtung deren Ausbreitung durch Gap Junctions in Nachbarzellen bestimmt werden. Eine Korrelation zwischen der Permeabilität eines Kanals für ein (Farbstoff-)Molekül und der elektrischen Einzelkanalleitfähigkeit ist in den meisten Fällen nicht gegeben, eher scheint die Permeabilität von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Molekül und Kanalpore abhängig zu sein (Elfgang et al., 1995; Veenstra et al., 1995; Veenstra, 1996). Die Injektion von Farbstoffmolekülen oder -Ionen unterschiedlicher Größe, Struktur und Ladung in Zellen, die mittels Gap Junctions kommunizieren, zeigt ein komplexes Muster an Permeabilitäten. Untersuchungen von Elfgang et al. (1995) ergaben, dass beispielsweise aus Cx26, 37, 43 oder 45 gebildete Gap Junction Kanäle den Farbstoff Ethidiumbromid (393 kDa) gut transferierten. Bei Cx40-Kanälen hingegen ist der Transfer stark reduziert und Kanäle aus Cx31 und Cx32 sind für Ethidiumbromid undurchlässig. Der Transfer anderer Farbstoffe wie Lucifer Yellow (443 kDa), DAPI (279 kDa) und Propidiumjodid (414 kDa) ist ebenso unterschiedlich ausgeprägt und von den Connexinen, die die Gap Junction Kanäle bilden, abhängig.

Verschiedene Gap Junction Kanäle zeigen zwar keine Spezifität bezüglich bestimmter Ionen, aber unterschiedliche Selektivität gegenüber Ionen verschiedener Ladungen. Zum Beispiel beträgt das Permeabilitätsverhältnis von Anionen zu Kationen für Huhn Cx45 0,12 und für menschliches Cx37 0,43 (Veenstra et al., 1994).

Des Weiteren sind Gap Junction Kanäle spannungsabhängig, das bedeutet, dass die Funktion des Kanals (der Öffnungszustand eines Kanals) von der Potentialdifferenz zwischen den Nachbarzellen bestimmt wird, die der Kanal verbindet. Das Ausmaß der Spannungsabhängigkeit und die Beziehung zwischen Leitfähigkeit und Spannung ist spezifisch für die jeweiligen Connexine, die den Kanal bilden (Bennett und Verselis, 1992). Ebenso besteht eine Abhängigkeit der Kanalfunktion vom  $\text{pH}_i$  (pH-Wert in Innern der Zelle), deren Ausmaß durch die Connexine, die den Kanal bilden, bestimmt wird (Liu et al., 1993).

## 1.5 Funktionen von Gap Junction Kanälen

Gap Junction Kanäle sind für die meisten niedermolekularen Metabolite und Signalmoleküle permeabel. Physiologisch wirksame Substanzen wie Aminosäuren, Zucker und Nukleotide (Johnson und Sheridan, 1971; Rieseke et al., 1975; Pitts und Simms, 1977; Pederson et al., 1980) und sekundäre Botenstoffe wie cAMP (Imanaga, 1974; Tsien und Weingart, 1976) und  $\text{Ca}^{2+}$  (Sanderson et al., 1990; Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1992; Enkvist und McCarthy, 1992) können mittels Gap Junctions von einer Zelle in die nächste gelangen. Durch die unterschiedlichen Permeabilitäten und Selektivitäten der aus verschiedenen Connexinen aufgebauten Gap Junction Kanälen kann ein komplexes Muster aus Kommunikation und Kommunikationsbarrieren zwischen verschiedenen Zellen und Zelltypen innerhalb eines Organismus entstehen. Zusammen mit der zell- und gewebespezifischen Expression der verschiedenen Connexine und der Bildung sowohl homomerer als auch heteromerer Connexone und ihrer Zusammenlagerung zu homotypischen und heterotypischen Kanälen kann eine Diversität der Kommunikation erreicht werden, die es den Gap Junctions ermöglicht, vielfältige Funktionen innerhalb unterschiedlichster biologischer Prozesse zu erfüllen.

### 1.5.1 Embryonalentwicklung

Schon in sehr frühen Entwicklungsstadien eines Embryos kann die Transkription von verschiedenen Connexinen und interzelluläre Kommunikation via Gap Junctions (Kopplung) nachgewiesen werden (Davies et al., 1996; Dahl et al., 1995). Insbesondere die Fähigkeit der Gap Junctions, den Transfer von Signalmolekülen und Zweitbotenstoffen wie cAMP,  $\text{IP}_3$  und Kalzium zu ermöglichen, dürfte hier von großer Bedeutung sein. Wird die Kommunikation in frühen Entwicklungsstadien beispielsweise mit Hilfe von anti-Connexin Antikörpern oder Gegensinn-mRNS blockiert, kommt es bei Xenopus- und Mausembryonen zu Entwicklungsstörungen (Paul, 1995; Paul et al., 1995; Lee et al., 1987; Bevilacqua et al., 1989). Die Bildung von Kommunikationsbereichen innerhalb derer eine individuelle Regulierung der Genexpression möglich sein könnte, wird durch das spezifische Expressionsmuster verschiedener Connexine ermöglicht. Die Inkompatibilität einzelner Connexine, die miteinander keine funktionellen Gap Junction Kanäle bilden, können zu Kommunikationsbarrieren führen. So sind im Mausembryo Zellen, die sich aus der inneren

Zellmasse entwickelt haben über Cx43 Kanäle gekoppelt, während vom Trophektoderm abstammende Zellen das zu Cx43 inkompatible Cx31 exprimieren (Dahl et al., 1996). Auch bei Drosophila Larven und bei anderen Vertebraten konnten solche Übereinstimmungen zwischen Kommunikations- und Entwicklungsbereichen gefunden werden (Lo, 1988; Bagnall et al., 1992), was nahe legt, dass den Gap Junctions eine wichtige Funktion bei der Entstehung von Entwicklungsbereichen zukommt.

## **1.5.2 Nährstoffaustausch**

Eine weitere Funktion der Gap Junctions ist die metabolische Kopplung, die Gewährleistung des Austauschs von physiologisch relevanten Substanzen zwischen Zellen, die nicht über Blutgefäße versorgt werden können. Dies gilt zum Beispiel für die Zellen der Augenlinse (Goodenough, 1992; White et al., 1992), für die Versorgung der Follikelzellen im Säugerovar (Caveney et al., 1985) und für den Glucosetransport über die Placenta (Gabriel et al., 1998). Auch innerhalb einer Zelle kann es metabolische Kopplung geben. Im peripheren Nervensystem verbinden reflexive, aus Cx32 gebildete, Gap Junctions die vielen Schichten einer Schwann'schen Zelle (Snipes und Suter, 1995).

## **1.5.3 Weiterleitung elektrischer Erregungswellen**

Gap Junction Kanäle erlauben die Weiterleitung elektrischer Erregungswellen in neuronalen und nicht neuronalen Geweben. In elektrischen Synapsen ist so eine im Vergleich zu chemischen Synapsen schnellere Übertragung von Aktionspotentialen möglich. Dies wird zum Beispiel von kaltblütigen Fischen in arktischen Gewässern genutzt (Bruzzone und Resson, 1997). Beispiele für die elektrische Kopplung über Gap Junctions sind die Erregungsleitung im Herzen (Gros und Jongasma, 1996), die koordinierte Kontraktion der Uterusmuskulatur während der Geburt (Winterhager et al., 1991, Chow and Lye, 1994), die Koordination der Darmperistaltik sowie die synchrone Kontraktion von Myoepithelzellen in den Endstücken exokriner Drüsen (Nagato und Tandler, 1986).

Im Gehirn erfüllen die Gap Junction Kanäle wahrscheinlich noch eine weitere Funktion bei der Pufferung von Kaliumionen, die bei neuronaler Aktivität in den extrazellulären Raum

ausgeschüttet werden. So erlauben astrozytäre Gap Junctions wahrscheinlich eine schnellere Verteilung der lokal am Ort der Freisetzung durch Astrozyten aktiv aufgenommene  $K^+$ -Ionen. Dadurch wird der elektrochemische Gradient, der der Aufnahme entgegenwirkt, reduziert (Orkand, 1986; Enkvist und Maccarthy, 1994).

## 1.5.4 Connexine und Krankheiten

Ein Zusammenhang zwischen Mutation von Connexingenen und Krankheiten konnte in vielen Fällen nachgewiesen werden. Die meisten Mutationen wurden bisher im Cx32-Gen bei Menschen mit einer X-chromosomal vererbten Form der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (CMTX) gefunden. Diese Krankheit äußert sich in einer langsam fortschreitenden Degeneration des Myelins, das die Axone der Motoneuronen umgibt (Bergoffen et al., 1993). Es kommt zu einer Störung der saltatorischen Erregungsleitung, die zu einer zunehmend verlangsamten Reizweiterleitung und einer Atrophie der Muskeln führt. Bei CMTX-Patienten sind, obwohl Cx32 auch in einer Vielzahl anderer Gewebe exprimiert wird, keine weiteren Defekte gefunden worden, was auf eine mögliche Kompensation der Cx32-Funktion durch andere, koexprimierte Connexine hinweist. Die besondere Bedeutung von Cx32 für das Myelin besteht in der Bildung reflexiver Gap Junctions in den Schwann'schen Zellen (Bone et al., 1997).

Ebenso wurden Mutationen in drei Connexin-Genen mit Hördefekten assoziiert. Das Auftreten von Taubheit beim Menschen wird sowohl mit dominanten als auch mit rezessiven Mutationen des unter anderem auch im Innenohr exprimierten Cx26 in Verbindung gebracht (Denoyelle et al., 1997 und 1998; Kelley et al., 1998a; Estivill et al., 1998). Auch dominante Mutationen von Cx31 scheinen beim Menschen in Zusammenhang mit einer verfrüht einsetzenden Hochfrequenzschwerhörigkeit zu stehen (Xia et al., 1998), ebenso wurden dominante Mutationen im Cx30-Gen beim Menschen mit einer sensineuralen Schwerhörigkeit assoziiert (Grifa et al., 1999). Interessanterweise wurden Mutationen von Cx26 und Cx31 auch mit Hautleiden in Verbindung gebracht (Richards et al., 1997, 1998a und b).

Eine der ersten Funktionen, die der interzellulären Kommunikation durch Gap Junctions zugeschrieben wurde, war die Steuerung des Zellwachstums (Loewenstein und Kanno, 1966). Aufgrund der offensichtlichen Wichtigkeit der Gap Junctions für die Erhaltung der metabolischen Kontinuität wurde schon 1979 die Modulation der interzellulären

Kommunikation mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht (Loewenstein, 1979). Es konnte gezeigt werden, dass einige Tumorpromotoren die interzelluläre Kommunikation inhibieren. Dadurch könnte die Wachstumskontrolle, welche die umgebenden normalen Zellen durch die Gap Junctions auf die Tumorzellen ausüben, aufgehoben werden und die Expansion des Tumors voranschreiten (Murray und Fitzgerald, 1979; Enmoto und Yamasaki, 1985; Mesnil und Yamasaki, 1988; Klaunig und Ruch, 1990). Bei Brustkrebs zum Beispiel exprimieren die Tumorzellen nicht länger diejenigen Connexine, die im normalen Brustgewebe zu finden sind (Lee et al., 1991). Umgekehrt steigern differenzierungsfördernde Substanzen wie Retinolsäurederivate, die als Tumorsuppressoren wirken können, die Expression von Connexinen (Wolf, 1992; Asato et al., 1993). Allerdings ist die Tumorpromotion nicht notwendigerweise mit einer Abnahme interzellulärer Kommunikation verbunden, und Wachstumsfaktoren wie beispielsweise TGF- $\beta$  können tumorfördernd wirken, ohne die Kopplung zu beeinflussen (Abernethy et al., 1985; Boreiko et al., 1986; Hamel et al., 1988; Budunova, 1994). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass bei der Tumorentstehung *in vivo* die heterologe Kommunikation zwischen Tumorzellen und umgebenden normalen Gewebe die Invasivität und Metastasis des Tumors bedingt (Bräuner et al., 1990; El Sabban und Pauli, 1995).

Die Herstellung und Erforschung Connexin-defizienter Knockout-Mäuse bestätigen und erweitern die Ergebnisse, die mit anderen Methoden über die Funktion der Gap Junctions und insbesondere über den Zusammenhang der über Connexine vermittelten interzellulären Kommunikation und verschiedenen Krankheitsbildern gewonnen wurden.

So ergab die Untersuchung einer Cx32-defizienten Knockout-Maus, dass die Mäuse im fortgeschrittenen Alter in Analogie zu CMTX-Patienten eine Degeneration des peripheren Myelins und eine damit einhergehende Verminderung der Nervenleitgeschwindigkeit aufwiesen (Anzini et al., 1997). Aufgrund der kürzeren Übertragungstrecke von Nervenimpulsen bei Mäusen zeigt die motorische Beeinträchtigung geringere Auswirkungen als beim Menschen. Außerdem zeigten die Cx32-defizienten Mäuse im Vergleich zu normalen Mäusen eine gesteigerte Anfälligkeit für chemisch induzierte Lebertumoren, womit erstmals ein direkter Beweis für die Rolle eines Connexins in der Wachstumskontrolle *in vivo* erbracht wurde (Temme et al., 1997).

## 1.6 Regulation der Gap Junction vermittelten interzellulären Kommunikation

Gap Junctions können durch eine Vielzahl von Faktoren und Mechanismen reguliert werden, die zu einer Verstärkung oder einer Verminderung der von Gap Junctions vermittelten Kommunikation führen können. Die Regulation kann sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Proteinebene, wie beispielsweise durch die Modulation der Kanaleigenschaften (Öffnen und Schließen) und die Degradation der Connexinproteine, erfolgen.

### 1.6.1 Regulation des Öffnungszustandes

Gap Junction vermittelte interzelluläre Kommunikation kann durch die Regulation des Öffnungszustandes der Kanäle schnell und reversibel beeinflusst werden. Die Öffnungswahrscheinlichkeit des Einzelkanals kann durch die intrazelluläre Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, den pH-Wert und die Potentialdifferenz zwischen den Zellen beeinflusst werden.

Erreicht die intrazelluläre Kalziumkonzentration Werte oberhalb des normalen physiologischen Rahmens von  $10^{-6}$  mol/l, kommt es zu einer schnellen Entkopplung der Zellen, was als Schutzmechanismus in unmittelbarer Nähe von Verletzungen interpretiert wird (Rose und Loewenstein, 1975). Unter normalen physiologischen Bedingungen sind die Kanäle jedoch für Kalzium-Ionen permeabel, was für die Signalkopplung von Zellverbänden wichtig ist (Saez et al., 1989a). Auch eine Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes führt zu einem Verschluss der Gap Junction Kanäle. Der Connexin-spezifische Regulationsmechanismus ist hierbei stark von der Länge des C-Terminus abhängig (Bennett und Verselis, 1992; Liu et al., 1993; Hermans et al., 1995; Wang und Peracchia, 1996; Wang et al., 1996). Es ist möglich, dass der Einfluss des pH-Wertes das Öffnen und Schließen der Kanäle nicht unabhängig reguliert, sondern die Folge eines Konzentrationsanstiegs der Kalzium-Ionen ist, da Kalziumchelatoren einer pH-abhängigen Entkopplung entgegenwirken (Peracchia et al., 1996).

Auch die Potentialdifferenz zwischen den durch Gap Junctions verbundenen Zellen reguliert das Öffnen und Schließen der Kanäle in einer Connexin-spezifischen Weise. So reagiert ein aus Cx45 aufgebauter Kanal bereits auf geringe Unterschiede in der Potentialdifferenz

innerhalb des normalen physiologischen Bereiches, die Cx43-Kanäle unbeeinflusst lassen (Reed et al., 1993; Moreno et al., 1994a und 1995; Bukauskas et al., 1995). Die Bedeutung der Potentialabhängigkeit der interzellulären Kommunikation könnte darin liegen, dass zellspezifische Wechsel im Ruhepotential zu einer Potentialdifferenz führen könnten, die einen Verschluss der Gap Junction Kanäle und somit eine Entkopplung von angrenzenden Zellen nötig macht (Bevans und Harris et al., 1999).

Auch viele Zweitbotenstoffe und Wachstumsfaktoren wie beispielsweise cAMP, cGMP, IP<sub>3</sub> und DAG können Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation durch eine Veränderung der Öffnungswahrscheinlichkeit ausüben. Diese schnelle Regulation erfolgt zumeist über die Phosphorylierung der einzelnen Connexinproteine. Durch solche Substanzen kann die Kopplung sowohl gesteigert als auch verringert werden (Bennett et al., 1991; Takens-Kwak und Jongma, 1992; Saez et al., 1990, 1993 und 1998). So wird in primären Rattenhepatozyten die Kommunikation durch cAMP gesteigert, was mit einer verstärkten Phosphorylierung von Cx32 an Serinresten einhergeht (Saez et al., 1990). Eine cAMP induzierte Phosphorylierung von Cx43-Kanälen kann, abhängig von der Zelle in der Cx43 exprimiert wird, entweder zu einer Abnahme der Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals (Moreno et al., 1992 und 1994b; Takens-Kwak und Jongma, 1992) oder zu einer gesteigerten Kommunikation (DeMello, 1988; Burt und Spray, 1988; Godwin et al., 1993) führen. Die Modulation der Phosphorylierung des Connexins steuert in diesen Zellen also die Kommunikation.

Auch der Transport von Cx43 zur Plasmamembran wird durch Phosphorylierung beeinflusst (Musil und Goodenough, 1991, Laird et al., 1995). Cx43 kann über verschiedene Wege phosphoryliert werden. Unterschiedliche Phosphorylierung kann die interzelluläre Kommunikation steigern oder aber herabsetzen. So ist eine direkte Phosphorylierung an Tyrosinresten durch die v-src-Kinase genauso möglich wie durch diverse Signaltransduktionswege über Rezeptortyrosinkinasen und die MAP-Kinase (Lau et al., 1996; Warn et al., 1998). Phosphorylierung an Serinresten kann über Zweitbotenstoffe wie DAG und cGMP erreicht werden (Kwak et al., 1995; Kwak und Jongma, 1996; Hossain et al., 1998). Somit erscheint Cx43 als ein Beispiel für die Ausprägung eines signalmodulierten zell- und gewebespezifischen Phosphorylierungsmusters der Connexine, welches die Gap Junction Kanäle funktionell an die jeweiligen physiologisch definierten Bedingungen anpasst (Swenson et al., 1990; Kadle et al., 1991; Kanter et al., 1992).

Als Mechanismus für die Regulation der Connexin Kanäle durch Öffnen und Schließen werden zwei Modelle diskutiert. Nach dem Twist- oder Rotationsmodell soll eine Drehung

der Connexone beziehungsweise der dritten Transmembrandomänen zu einer Änderung des Neigungswinkels der Connexine führen, wodurch die Kanalpore verschlossen wird (Unwin und Ennis, 1983; Unwin, 1989; Perkins et al., 1998). Das zweite „Ball-an-der-Kette“-Modell beinhaltet den Verschluss der Kanalpore durch den C-Terminus als „Ball“ an einer flexiblen Verbindungsdomäne („Kette“), welcher mit der zytoplasmatischen Schleife interagiert und so die Kanalpore wie ein Flaschenkorken verschließt (Ek et al., 1994 und 1996; Calero et al., 1998; Stergiopolus et al., 1999). Beide Modelle zur Regulation des Öffnungszustandes eines Gap Junction Kanals könnten nebeneinander realisiert sein (Barrio et al., 1997; Nicholson et al., 1998).

Des Weiteren blockieren viele lipophile Substanzen, wie beispielsweise die aliphatischen Alkohole Octanol und Heptanol sowie die ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure, die Kommunikation über Gap Junctions in einer reversiblen, dosisabhängigen Weise (Burt, 1991; Bennett und Verselis; 1992; Perrachia et al., 1994). Diese Hemmung beruht wahrscheinlich nicht auf einer spezifischen Interaktion mit den Connexin Kanälen, sondern auf einer Inkorporation der Substanzen in die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran.

## **1.6.2 Regulation der Connexinexpression**

Hinweise auf eine komplexe Transkriptionskontrolle der Connexine gibt nicht nur ihr spezifisches räumliches und zeitliches Ausprägungsmuster, sondern auch die vielfältigen Regulationsmöglichkeiten der Expression durch Hormone. So wird im Myometrium die Expression von Cx26 durch Progesteron reguliert (Orsino et al., 1996) und die Menge von Cx43 durch das Verhältnis Progesteron zu Östrogen gesteuert (Petrocelli und Lye, 1993). Im Endometrium korreliert das Expressionsniveau beider Connexine mit der Östrogenkonzentration (Grümmer et al., 1994). Zusätzlich kann die Expression des Cx43-Gens in verschiedenen Zellen durch Prostaglandin E<sub>2</sub> und PTH sowie durch Interleukin 1 $\beta$  beeinflusst werden (Civitelli et al., 1998; Fernandez et al., 1998).

Zwar konnten mögliche Promotoren bei den Connexingenen Cx26 (Hennemann et al., 1992b; Kiang et al., 1997), Cx32 (Hennemann et al., 1992b; Bai et al., 1993), Cx40 (Seul et al., 1997; Groenewegen et al., 1998) und Cx43 (De Leon et al., 1994; Yu et al., 1994; Lefebvre et al., 1995) isoliert und teilweise analysiert werden, die molekularen Grundlagen der Transkriptionskontrolle sind aber bisher noch weitgehend unverstanden.

Neben der Kontrolle der Transkriptionsinitiation gibt es auch Möglichkeiten für eine Regulation der mRNA-Stabilität. So konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass in verschiedenen Zelltypen cAMP die Stabilität der mRNA von Cx32 und Cx43 erhöhen kann (Fujita et al., 1987; Saez et al., 1989b; Stagg und Fletcher, 1990) und die Stabilität des Cx43-Transkripts ebenso durch Retinolsäure beeinflusst wird (Clairmont und Sies, 1997).

### **1.6.3 Regulation durch Degradation der Connexine**

Untersuchungen zeigten, dass die komplexen Membranstrukturen der Gap Junctions keine statischen und langlebigen Strukturen sind, sondern als sehr dynamische Strukturen vorliegen, die einem ständigen Prozess von Neubildung und Abbau unterworfen sind. So wurden für Connexine relativ kurze Halbwertszeiten bestimmt: 1-2 Stunden für Cx43 in primären Rattenherzmuskelzellen (Laird et al., 1991); 2-3 Stunden für Cx32 und Cx26 in primären Mausleberzellen (Traub et al., 1987 und 1989) und 2,9 Stunden für Cx45 in primären Rattenherzmuskelzellen (Darrow et al., 1995). Diese schnelle Degradation der Connexine deutet auf einen möglichen Regulationsmechanismus der interzellulären Kommunikation hin. Ein weiterer Hinweis ist die Reaktion von E36 Zellen und primären Rattenherzmyozyten auf ein kurzzeitiges Erhöhen der Temperatur. Dieses Experiment dient als Modell für den Stress, dem Herzmuskelzellen während einer Ischämie ausgesetzt sind; die Zellen zeigten einen schnelleren Abbau des exprimierten Cx43-Proteins (Laing und Beyer 1995; Laing et al., 1998).

Die Menge an Connexinprotein in der Plasmamembran scheint direkt mit der Kopplung zu korrelieren. Hinweise dafür geben beispielsweise diverse Kopplungsexperimente, die die Ausbreitung eines mikroinjizierten Farbstoffs in mit verschiedenen Connexinen transfizierten Zellen untersuchten. Es zeigte sich hierbei, dass Zellen, die das gleiche Connexin in unterschiedlicher Menge exprimieren, größere Kopplung aufwiesen, wenn das Expressionsniveau des Connexins höher war (D. Manthey persönliche Mitteilung; Diestel, Dissertation 2001). Es kann davon ausgegangen werden, dass Zellen ihre interzelluläre Kommunikation unter anderem durch Verringerung der Menge an bestehenden Gap Junction Kanälen beeinflussen können, auch wenn die möglichen Mechanismen zur Steuerung der Degradation in der Zelle noch nicht gefunden sind.

Inwieweit die Phosphorylierung der Connexine eine Rolle bei ihrem Abbau spielt, ist bisher nicht ausreichend untersucht und daher noch unklar. Dennoch finden sich Hinweise, dass die Phosphorylierung einen möglichen Mechanismus zur Steuerung der Degradation der Connexine darstellt. Bei einer Cx43 exprimierenden Tumorzelllinie konnte eine Korrelation zwischen dem Verlust bestimmter phosphorylierter Isoformen von Cx43 und dem schnellen Turnover der Gap Junctions gezeigt werden (Laird et al., 1995). Weitere Untersuchungen an Cx32 zeigten außerdem, dass die durch cAMP induzierte Phosphorylierung den durch bestimmte Proteasen,  $\mu$ -Calpain und *m*-Calpain, vermittelten Abbau des Connexin verringern kann (Elvira et al., 1993 und 1994).

## 1.7 Der Lebenszyklus der Gap Junctions

Die einzelnen Schritte die zur Formation der Gap Junctions führen, die Biosynthese der Connexine, Transport, Zusammenlagerung zu Connexonen und die Bildung der Gap Junction Kanäle sowie ihre räumliche Abfolge sind weitgehend erforscht, wenn auch noch immer viele Detailfragen offen sind (Laird, 1996). Insbesondere die Darstellung und Untersuchung von GFP-Connexin-Chimären in jüngster Zeit (Jordan et al., 1999) hat viele der vorher gewonnenen Resultate anschaulich bestätigt und neue Erkenntnisse hinzugefügt. Im Gegensatz dazu sind die Prozesse, die zur Degradation der Gap Junctions führen, noch weitgehend ungeklärt.

### 1.7.1 Bildung von Gap Junction Kanälen

Ebenso wie andere kanalbildende Membranproteine werden die Connexine von Ribosomen synthetisiert, die an das Endoplasmatische Retikulum (ER) gebunden sind, und kotranslational in dessen Membran integriert, bevor die Polypeptidkette vollständig translatiert ist (Falk et al., 1994; Zhang et al, 1996). Cx26 kann in vitro allerdings auch posttranslational in die ER-Membran inseriert werden (Zhang et al, 1996). Im ER bilden die Connexine ihre korrekte Struktur aus, die intramolekulare Disulfidbrücken innerhalb der späteren extrazellulären Schleifen werden kotranslational gebildet (Evans et al, 1994). Der Amino- und Carboxyterminus der Connexine in der Membran des ER sind zum Cytoplasma

hin orientiert. Auch die Phosphorylierung der Connexine beginnt bereits im ER und auch im Golgiapparat (Laird et al., 1995).

Die Zusammenlagerung von sechs Connexinen zu einem Connexon erfolgt im Gegensatz zu den meisten anderen integralen Membranproteinen nicht im ER, sondern findet erst im trans-Golgi-Netzwerk statt (Musil und Goodenough, 1991; Musil, 1993). Der Mechanismus, der die Oligomerisierung der Connexine im ER verhindert, ist noch nicht aufgeklärt. Es ist aber möglich, dass eine Interaktion mit Chaperonen im ER die Ursache ist.

Der Transport der gebildeten Connexone erfolgt wahrscheinlich über vom trans-Golgi-Netzwerk abgeschnürte Vesikel. Der Mechanismus des Transports und der Adressierung zur Plasmamembran ist allerdings noch nicht vollständig erforscht. Die Untersuchung von MDCK-Zellen, die mit GFP-Cx43-Chimären transfiziert wurden zeigte, dass hier zwei Populationen von Vesikeln verschiedener Größe und Mobilität existieren, die als Transportintermediaten in Frage kommen. Es konnte beobachtet werden, wie die kleineren der beobachteten Vesikel gelegentlich mit der Plasmamembran zu verschmelzen schienen, was darauf hinweist, dass sie tatsächlich ein Teil des Transportmechanismus der Connexone zur Membran sein könnten (Jordan et al., 1999).

Sind die Connexone in der Plasmamembran angekommen, müssen zur Bildung funktionsfähiger Gap Junction Kanäle zwei Halbkanäle benachbarter Zellen aneinanderdocken. Elektrophysiologische Daten lassen vermuten, dass die Connexone auch als ungepaarte Halbkanäle in der Plasmamembran existieren können (Paul et al., 1991; DeVries und Schwartz, 1992). Diese Ergebnisse wurden durch die Beobachtung von mit Cx43-GFP transfizierten N2A-Zellen bestätigt. Hier wurde das chimäre Protein nicht nur an Kontaktmembranen sondern auch in der Plasmamembran an Stellen ohne Kontakt zu anderen Zellen und von einzelnen Zellen gefunden (Jordan et al., 1999). Dies könnte erklären, warum die Formation von Gap Junction Kanälen sehr schnell innerhalb weniger Minuten nach der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten erfolgen kann (Rook et al., 1990).

Das Andocken zweier Halbkanäle geschieht durch die Ausbildung von nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen den extrazellulären Schleifen der beteiligten Connexine (Manjunath et al., 1984; Unger et al., 1999). Hierbei spielen Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle (Kanno et al., 1984, Musil et al., 1990b; Bergoffen et al., 1993; Fujimoto et al., 1997). In der Plasmamembran findet auch die weitere Phosphorylierung der Connexine statt. So erfolgt der größte Teil der Phosphorylierung von Cx43, wenn es die Plasmamembran erreicht hat. Ein kausaler Zusammenhang zur Ausbildung von funktionellen Gap Junction Kanälen konnte allerdings noch nicht aufgezeigt werden (Laird et al., 1996).

## 1.7.2 Degradation von Gap Junction Kanälen

Larsen und Mitarbeiter konnten 1979 als erste annuläre Gap Junctions beobachten. Dabei handelt es sich um intrazelluläre Strukturen, die von einer Doppelmembran umgeben sind. Es wurde angenommen, dass annuläre Gap Junctions Zwischenstufen einer Internalisierung der Gap Junctions durch Endocytose und der anschließenden Degradation durch Lysosomen darstellen (Larsen und Tung, 1978; Larsen et al., 1979, Vaughan und Lasater, 1990). Annuläre Gap Junctions wurden morphologisch in vielen Arbeiten beschrieben und gegen Connexine spezifische Antikörper benutzt, um zu bestätigen, dass diese Strukturen Connexine beinhalten (Dermietzel et al., 1991; Risley et al., 1992; Naus et al., 1993). Auch in neueren Untersuchungen an Zellen, die ein Cx43/EGFP-Fusionsprotein exprimieren, konnten Connexin enthaltende Vesikel nachgewiesen werden, die wahrscheinlich den annulären Gap Junctions entsprechen (Jordan et al., 1999 und 2001). Annuläre Gap Junctions scheinen also eine Zwischenstufe in der Degradation der Gap Junctions darzustellen, es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es noch andere Möglichkeiten der Internalisierung gibt.

Es gibt mehrere Hinweise auf eine Beteiligung von Lysosomen an der Degradation von Connexinen. So zeigte die subzelluläre Fraktionierung von Rattenleber, dass Cx32 in Lysosomen in vergleichbarer Menge wie im Golgiapparat zu finden ist (Rahman et al., 1993). Gap Junctions beziehungsweise Connexine konnten in Lysosomen oder Phagolysosomen nachgewiesen werden (Naus et al., 1993). Außerdem verursachen Inhibitoren der lysosomalen Enzyme in verschiedenen Zellen eine Anreicherung von Cx43 sowie eine Verlängerung der Halbwertszeit (Laing et al., 1997; Laing et al., 1998).

Ebenso gibt es aber auch Ergebnisse, die eine Beteiligung von Proteasomen am Abbau der Connexine nachweisen. Durch elektromikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Ubiquitin an Gap Junction Plaques assoziiert sein kann (Hülser et al., 1998; Rüz und Hülser et al., 2001). Laing und Bayer (1995) zeigten, dass die Degradation von Cx43 Ubiquitin-abhängig ist und somit das Proteasom eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Des Weiteren führen auch Inhibitoren des proteasomalen Abbaus zu einer Steigerung der Menge an Cx43 in einigen Zellen und zu einer verlängerten Halbwertszeit des Proteins (Laing und Bayer, 1995; Laing et al., 1997; Laing et al., 1998). Es gibt zumindest für Cx43 Hinweise, dass sowohl Lysosomen als auch Proteasomen an der Degradation beteiligt sind. Unklar ist aber noch, ob dies für alle Connexine gilt und ob Proteasomen und Lysosomen gleichermaßen zu einem einzigen Abbauweg beitragen oder ob es alternative Wege zum Abbau von Connexinen in einer Zelle gibt, die entweder über Proteasomen oder Lysosomen verlaufen.

## **1.8 Ziele dieser Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollten Regulationsmöglichkeiten der Zell-Zell-Kommunikation auf Proteinebene untersucht werden. Insbesondere sollte die Bedeutung der Degradation als Regulationsmechanismus nachgewiesen werden. Auch der Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung eines Connexins und seiner Kopplungseigenschaften sollte analysiert werden.

### **1.8.1 Degradation**

Die Degradation der Connexinproteine kann nur dann als Regulationsmechanismus der Zell-Zell-Kommunikation eine Bedeutung haben, wenn in den Zellen Möglichkeiten zur Verfügung stehen um die Degradationsrate zu variieren.

Die Änderung der Degradationsrate (Halbwertszeit) eines Connexins durch die Koexpression mit anderen Connexinen ist eine dieser Möglichkeiten. Analysen der Halbwertszeit eines Connexins in An- und Abwesenheit eines zweiten sollten zeigen, ob diese Möglichkeit zur Regulation der Kommunikation Anwendung findet. Zu diesem Zweck sollten vergleichende Untersuchungen an embryonalen Maushepatozyten aus normalen und Cx32-defizienten Tieren vorgenommen werden. Mit den Hepatozyten steht ein System von zwei fast identischen Zellen zur Verfügung, die sich nur in der Expression eines Connexins unterscheiden: normale Hepatozyten exprimieren Cx26 und Cx32 während Cx32-defiziente Hepatozyten nur Cx26 ausprägen.

Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob sich diese Ergebnisse auf das artifizielle System der HeLa-Transfektanten übertragen lassen.

### **1.8.2 Phosphorylierung**

Eine Beeinflussung der Zell-Zell-Kommunikation durch eine veränderte Phosphorylierung eines Connexins konnte in vielen Fällen nachgewiesen werden. Einige Reagenzien, wie cAMP und TPA, können die Phosphorylierung von Connexinen verändern; diese

Veränderungen zeigen in verschiedenen Zellen unterschiedliche Auswirkungen auf die Kopplung (Kapitel 1.6.1).

Anhand von Untersuchungen an zwei Tumorzelllinien, A 172 und U 87, die aus dem gleichen Gewebe stammen, sollten die Auswirkungen einer veränderten Phosphorylierung vergleichend an Zellen untersucht werden, die sich nur in wenigen Parametern unterscheiden. Dafür sollte die Phosphorylierung des exprimierten Cx43 unter Einfluss von cAMP und TPA analysiert werden und ein Zusammenhang mit der Kopplung hergestellt werden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in Analyse-Qualität (p.a.) von den Firmen Difco, Fluka, Gibco BRL, Roche (ehemals Boehringer Mannheim), Merck, Serva, oder Sigma bezogen. Enzyme und Nukleotide lieferten die Firmen Amersham Pharmacia Biotech, Roche, New England BioLabs, Pharmacia und Promega. Radiochemikalien und Nylonmembranen wurden bei Amersham Pharmacia Biotech erworben.

### 2.2 Einwegartikel

Sterile Zellkulturartikel wurden von den Firmen Costar, Falcon, Nunc und Sarstedt bezogen. Pipettenspitzen und Reagenzgefäße stammten von Sarstedt.

### 2.3 Allgemeine Stammlösungen, Puffer und Enzymlösungen

Die angegebenen Lösungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit zweifach destilliertem Wasser (A. bidest) angesetzt.

Denhardt´s-Lösung (50 x)	1 % (w/v) Ficoll 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon 1 % (w/v) BSA/Fraktion Filtrieren durch Faltenfilter
DMPC-H <sub>2</sub> O	(v/v) 0,2 % Dimethylpyrocarbonat in A. bidest ÜN rühren und 1 h autoklavieren
DNS-Ladepuffer (6x)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 30 % Glycerin Lagerung bei 4°C

Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml)	1 % Ethidiumbromid Lagerung lichtgeschützt bei 4°C
Formamid (deionisiert)	5 % (w/v) Ionenaustauscherharz mit Formamid 30 min rühren (RT), filtrieren Lagerung bei -20°C
Hybridisierungslösung	50 % Formamid SSC 5 x Denhardt's Reagenz 5 x 0,5 % (w/v) SDS 50 µg/ml Heringsperma-DNS (sonifiziert, Roche)
MOPS (10x) (pH 7,0)	200 mM Morpholinopropansulfonsäure 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA 1 Srd bei 120°C autoklavieren Lagerung lichtgeschützt bei 4°C
PBS <sup>+</sup> (pH 7,2)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,7 mM CaCl <sub>2</sub> 0,5 mM MgCl <sub>2</sub>
PBS <sup>-</sup>	wie PBS <sup>+</sup> , jedoch ohne Calcium- und Magnesium-Salze
RNS-Auftragspuffer	(v/v) 10 x MOPS Puffer (= 4ml) Glycerin 87 %ig (= 2ml) Formamid <sub>deion</sub> (= 3ml) EDTA (= 40 µl 1 M EDTA) Formaldehyd (= 720 µl Formaldehyd 37%) Ethidiumbromid 50 µg/µl

	Bromphenolblau (= 0,025 g) mit DMPC-H <sub>2</sub> O auf 10 ml auffüllen Lagerung bei 4°C
SSC 20 x (pH 7,5)	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat
SDS-Stammlösung	20 % SDS Lösen bei 65°C; Lagerung bei RT
TBE (10x) (pH 8,3)	900 mM Tris 900 mM Borsäure 25 m EDTA
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 20 min autoklavieren
TBS (pH 7,5)	10 mM Tris 50 mM NaCl

## 2.4 Lösungen für die Bakterienkultur

Die hier aufgeführten Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit *A. bidest* angesetzt und autoklaviert. Hitzelabile Substanzen wurden sterilfiltriert (Rotrandfilter 0,2 µm, Schleicher & Schüll) und den Medien nach Abkühlung auf 55°C zugegeben. Bei der Verwendung der Medien für Agarplatten erfolgte vor dem Autoklavieren die Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar.

Ampizillin-Stammlösung (100 mg/ml)	500 mg Ampizillin in 5 ml <i>A. bidest</i> lösen, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20° C
---------------------------------------	--

LB-Medium (pH 7,4)	10 g NaCl 10 g Bacto Trypton 5 g Bacto Hefe-Extrakt mit A. bidest auf 1 Liter auffüllen Lagerung bei 4° C
Kanamycin-Stammlösung (10 mg/ml)	Kanamycin in A.bidest lösen, sterilfiltrieren Lagerung bei -20° C
RNase 2000 (2 mg/ml)	100 mg RNase 2000 1 ml RNase T (1 x 10 <sup>5</sup> U) 49 ml RNase Puffer 15 min kochen, langsam abkühlen lassen Lagerung bei -20° C
TFB I (pH 5,8)	30 mM KAc 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM RbCl 10 mM NaCl 15 % (v/v) Glycerin Lagerung bei 4° C
TFB II (pH 7,0)	10 mM NaMOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl 15 % (v/v) Glycerin Lagerung bei 4° C
YT <sup>++</sup> (pH 7,5)	0,8 % Trypton 0,5 % Bacto-Hefe-Extrakt 0,5 % NaCl autoklavieren, abkühlen und Zugabe von: 20 mM MgSO <sub>4</sub> (sterilfiltriert) 10 mM KCl (sterilfiltriert) Lagerung bei 4° C

## 2.5 Bakterienstamm

Name:	<i>E. coli</i> XL1-blue
Genotyp:	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, Δ(mcr)A183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, supE44, relA1, lac [F <sup>+</sup> proAB lacI <sup>q</sup> Z ΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> 12,5 μg/ml)]
Verwendung:	Vermehrung von Plasmiden
Quelle:	Bullock et al., 1987

## 2.6 Plasmide

### Klonierungsvektor

Name:	pcDNA3.1/Zeo(+)
Beschreibung:	eukaryontischer Expressionsvektor, enthält Zeocynresistenz
Bezugsquelle:	Invitrogen

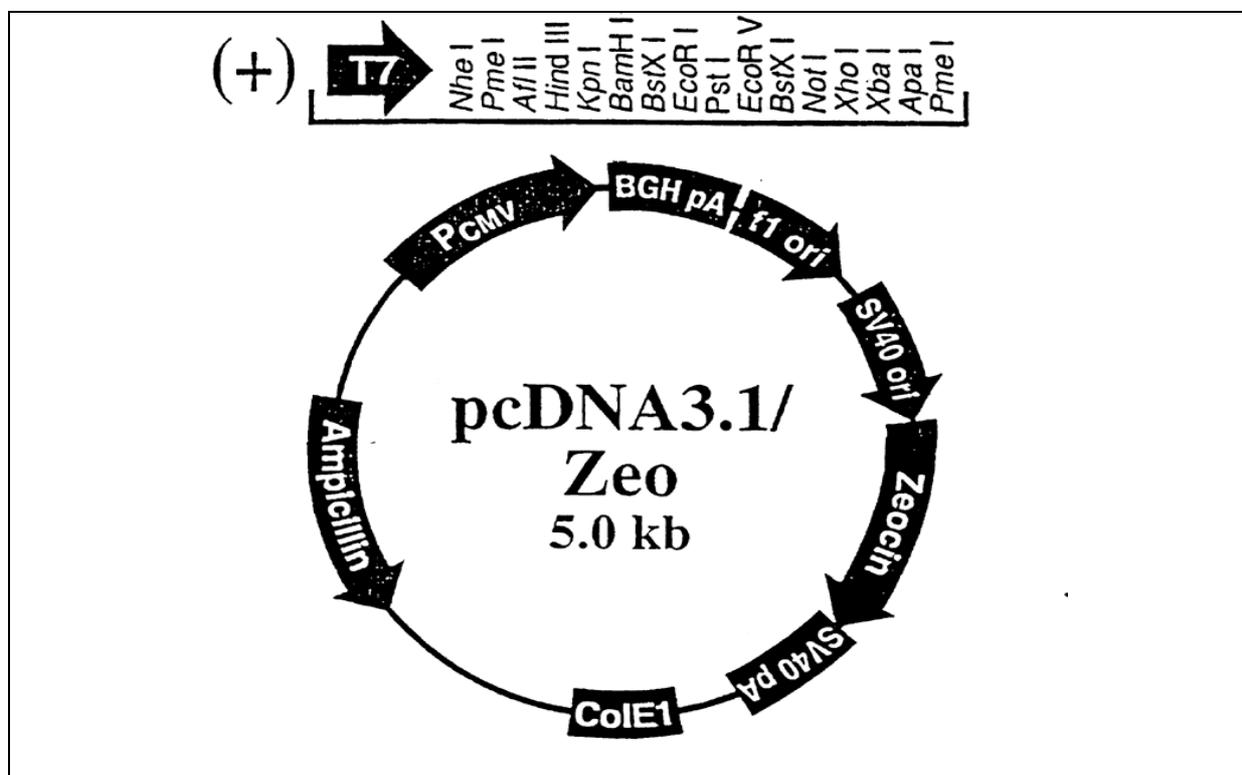


Abbildung 2 – 1: Vektorkarte von pcDNA3.1/Zeo(+)

## Rekombinantes Plasmid

Name: pBS/cod.cx32NaeSac  
 Insertion: codierende Region von Cx32 der Maus  
 Referenz: Eva Thönnisen, unveröffentlichte Ergebnisse

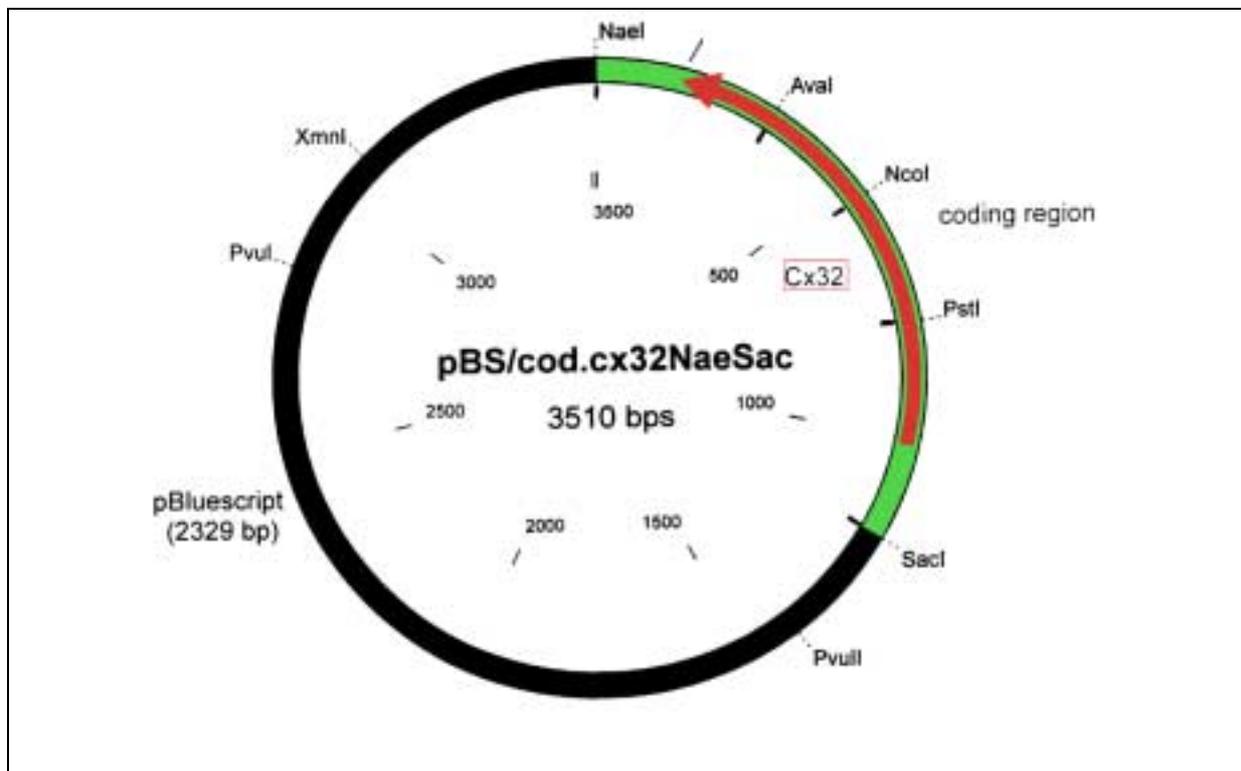


Abbildung 2 – 1: Vektorkarte von pBS/cod.cx32NaeSac

## Rekombinantes Plasmid für die Transfektion

Name: pcDNA3.1/Zeo(+)/CX32  
 Klonierungsstrategie: mittels PCR mit spezifisch abgeleiteten Startermolekülen wurde die codierende Region von Cx32 der Maus des Vektors pBS/cod.cx32NaeSac amplifiziert und dabei Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonucleasen *BamHI* und *EcoRI* vor und hinter der codierenden Region von Cx32 eingeführt. Das PCR-Fragment wurde mit *BamHI* und *EcoRI* verdaut und in den mit *BamHI* und *EcoRI* linearisierten Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(+) kloniert.

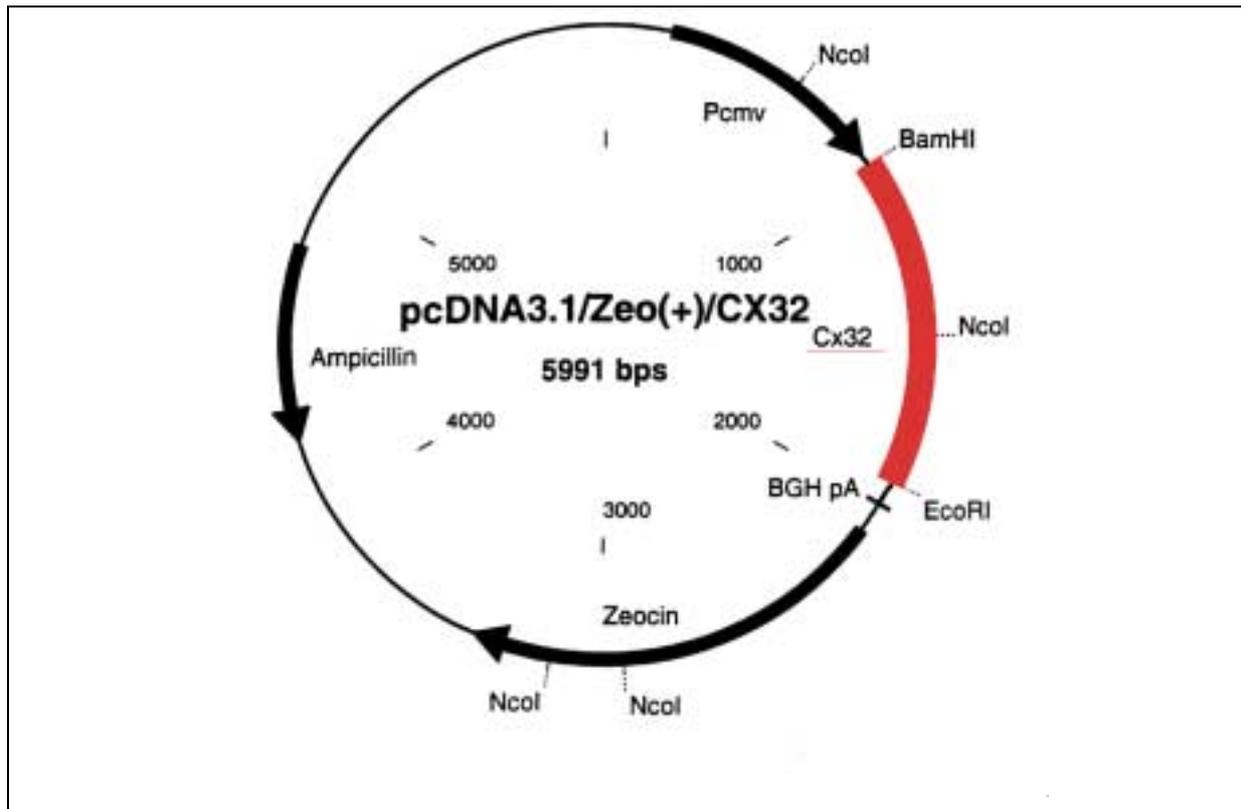


Abbildung 2 – 1: Vektorkarte von pcDNA3.1/Zeo(+)/CX32

## 2.7 Oligonukleotide und Hybridisierungssonden

Die für die gezielte Einführung von Erkennungssequenzen von Endonukleasen verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma ARK Scientific GmbH Biosystems hergestellt. Die Schmelztemperatur ( $T_M$ ) wurde nach der in Abschnitt 3.5 beschriebenen Formel berechnet. Die lyophilisiert gelieferten Oligonukleotide wurden in TE-Puffer gelöst. Die Lagerung erfolgte bei  $-20^\circ\text{C}$ .

Cx32hin (Sinn-Starter, enthält eine Bam HI-Erkennungssequenz):

Sequenz 5'=>3': **CGG GAT CCC** TGC CCT GAC CTT TTG ACG GC

Cx32rueck2 (Gegensinn-Starter, enthält eine Eco RI-Erkennungssequenz):

Sequenz 5'=>3': **GGA ATT CCG** TAG GAG AAG GAG GGG CAG GT

Die eingeführten Schnittstellen sind fettgedruckt dargestellt und die im Vergleich zur ursprünglichen Sequenz veränderten Basen unterstrichen.

In den Hybridisierungsexperimenten wurden folgende DNS-Fragmente eingesetzt:

Cx26-Probe Fragment aus der codierenden Region von Cx26 (Nelles et al., 1996),

Cx31-894Bp mit *EcoRI* und *Bam HI* aus pcDNA3.1/Zeo(+)/CX32 geschnittenes 953 bp langes DNS-Fragment, welches die codierende Region von Maus-Cx32 enthält.

## 2.8 Lösungen für die Zellkultur

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle angegebenen Lösungen mit A. bidest hergestellt und sterilfiltriert. Medien für die aktive Zellkultur wurden vor Gebrauch 20 min bei 37°C erwärmt.

Anheftungsmedium	45 % (v/v) MX83 45 % (v/v) DMEM 10 % (v/v) fötales Kälberserum
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium (10 g/L) NaHCO <sub>3</sub> (3,7 g/L) pH 6,9; Lagerung bei 4° C
DMEMM <sup>-</sup>	Dulbecco`s Modified Eagle Medium ohne Methionin (10 g/L) NaHCO <sub>3</sub> (3,7 g/L) pH 6,9; Lagerung bei 4° C
DMEMP <sup>-</sup>	Dulbecco`s Modified Eagle Medium ohne ortho-Phoshat (10 g/L) NaHCO <sub>3</sub> (3,7 g/L) pH 6,9; Lagerung bei 4° C
D 10-Medium	DMEM (450 ml) 10 % (v/v) fötales Kälberserum (50 ml) 100 U/ml Penizillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin

D 10 M <sup>-</sup> -Medium	DMEM M <sup>-</sup> 10 % (v/v) gegen 0,9 % NaCL dialysiertes fötales Kälberserum 2 mM L-Glutamin
D 10 P <sup>-</sup> -Medium	DMEM P <sup>-</sup> 10 % (v/v) gegen 0,9 % NaCL dialysiertes fötales Kälberserum 2 mM L-Glutamin
D 10–Puromycin-Medium	D 10-Medium 1 µg Puromycin pro ml D10-Medium
D 10–Zeo/Puro-Medium	D 10- Puromycin-Medium 50 µg Zeocin pro ml D10-Medium
Glutamin-Stammlösung (100 x)	200 mM L-Glutamin Lagerung bei -20° C
MX83-Medium	MX82-Medium (CC PRO) supplementiert mit verschiedenen sterilen Lösungen (nach Hoffmann et al., 1989) frisch hinzugeben: 1 µg/ml Hydrocortison 100 ng/ml EGF (Paesel-Lorei) 10 µg/ml Insulin 10 µg/ml Transferin
PBS <sup>-</sup>	siehe 2.3, jedoch 20 Minuten autoklavieren
Pen/Strep-Stammlösung (100x) (pH 8,2)	0,6 % Penizillin G 1 % Streptomycinsulfat mit Puck`scher Saline auffüllen Lagerung bei -20° C

Puck'sche Saline	137 mM NaCl 5,4 mM KCl 5,5 mM D(+)-Glucose 4,5 mM NaHCO <sub>3</sub> Lagerung bei -20° C
Puromycin-Stammlösung	(0,5 mg/ml) in A. bidest lösen Lagerung bei -20° C
Trypsin-Lösung (pH 7,5)	0,04 % Trypsin 0,5 mM EDTA-Natriumsalz auffüllen mit Puck'scher Saline Lagerung bei -20° C

## 2.9 Zellen

### Primärzellen:

Embryonale Maushepatozyten

präpariert aus der Leber 18 Tage alter Mausembryonen (Traub et al., 1987).

### Zelllinien:

A 172 (ATCC CRL 1620)

Glioma-Zelllinie aus menschlichem Gewebe (Giard et al., 1973)

IAR20

Leberepithel-Zelllinie aus Ratte (Montesano et al., 1977).

U 87 (ATCC HTB 14)

Glioma-Zelllinie aus menschlichem Gewebe (Ponten and Macintyre, 1968).

WBF344

Leberepithel-Zelllinie aus Ratte (Tsao et al., 1984).

HeLa (ATCC CCL2)

Aneuploide, epitheloide Cervixcarcinom-Zelllinie aus menschlichem Gewebe (Gey et al., 1952).

HeLa-Transfektanten:

HeLa-Zellen, stabil transfiziert mit der cDNS verschiedener Connexine

HeLa-Cx26 (Manthey Dissertation, 1998)

HeLa-Cx32, HeLa-Cx43, HeLa-Cx45 (Elfgang et al., 1995)

HeLa-Cx43/Cx45 (Elfgang et al., 1995)

## 2.10 Antikörper

Die hier angegebenen Antikörper wurden für Immunfluoreszenzen, Immunpräzipitationen und/oder Immunoblots eingesetzt.

### Primäre Antikörper:

Antikörper	anti-Cx26
Spezifizierung	polyklonal aus Kaninchen, gegen das isolierte 21 kD Protein aus Leber
Referenz	Traub et al., 1982 und 1989
Verdünnungen	1: 500 in der indirekten Immunfluoreszenz, 2 µl / 1ml im Immunoblot

Antikörper	anti-Cx26zy
Spezifizierung	monoklonal aus Mausaszyten, affinitätsgereinigt, gegen eine Aminosäuresequenz aus der zytoplasmatischen Schleife von Ratte-Cx26
Bezugsquelle	Zymed
Verdünnungen	1: 1000 in der indirekten Immunfluoreszenz

Antikörper	anti-Cx32
Spezifizierung	polyklonal aus Kaninchen, gegen das isolierte 26 kD Protein aus Leber
Referenz	Traub et al., 1982 und 1989
Verdünnungen	1: 500 in der indirekten Immunfluoreszenz, 2 µl / 1ml im Immunoblot

Antikörper	anti-Cx43t
Spezifizierung	polyklonal aus Kaninchen, affinitätsgereinigt, peptidspezifisch, gegen Aminosäure 360 bis 382 von Ratte-Cx43
Referenz	Traub et al., 1992
Verdünnungen	1:50 in der indirekten Immunfluoreszenz, 1,5 µl / 1ml im Immunoblot

Antikörper	anti-Cx45
Spezifizierung	polyklonal aus Kaninchen, affinitätsgereinigt, gegen das Fusionsprotein aus GST und Aminosäure 258 bis 396 von Maus-Cx45
Referenz	Butterweck et al., 1994
Verdünnungen	1: 50 in der indirekten Immunfluoreszenz, 2 µl / 1ml im Immunoblot

### **Sekundäre Antikörper:**

Antikörper	Cy3-anti-Mouse IgG
Spezifizierung	polyklonal, aus Ziege, affinitätsgereinigt, gegen Maus IgG, gekoppelt mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy3
Bezugsquelle	Dianova
Verdünnungen	1: 1000 in der indirekten Immunfluoreszenz

Antikörper	Cy3-anti-Rabbit IgG
Spezifizierung	polyklonal, aus Ziege, affinitätsgereinigt, gegen Kaninchen IgG, gekoppelt mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy3
Bezugsquelle	Sigma
Verdünnungen	1: 400 in der indirekten Immunfluoreszenz

Antikörper	DTAF-anti-Rabbit IgG
Spezifizierung	polyklonal, aus Ziege, affinitätsgereinigt, gegen Kaninchen IgG, gekoppelt mit dem fluoreszierenden Farbstoff DTAF
Bezugsquelle	Sigma
Verdünnungen	1: 200 in der indirekten Immunfluoreszenz

## 2.11 Größenstandards

Als Größenstandards für Agarose-Gelelektrophorese wurde der Lambda-Standard verwendet, der durch den Verdau von Lambda-DNS mit den Enzymen *Eco RI* und *Hind III* hergestellt wurde. Der RNS-Standard wurde von der Firma Gibco-BRL bezogen.

Standard	Fragmentgröße in kb	Konzentration in ng/μl	Auftrag in μl
λ-DNS	21,2; 5,1; 5,0; 4,3; 3,5; 2,0; 1,9; 1,6;	50	5
<i>Eco RI/Hind III</i>	1,4; 0,95; 0,83; 0,56; 0,125		
RNS-Standard	9,5; 7,5; 4,4; 2,4; 1,4; 0,24	1000	4

**Tabelle 2.1:** Größenstandards in der Agarose-Gelelektrophorese

In der SDS-PAGE wurden als Proteingrößenstandards im Labor hergestellter Comassiemarker und Blaumarker sowie Farbmarker der Firma Novex eingesetzt.

Standard	Coomassie-Marker	Blaumarker	Farbmarker
Größe der	68 kDa (BSA)	250 kDa	250 kDa (Myosin)
Marker-	45 kDa (Ovalbumin)	98 kDa	148 kDa (Phosphorylase B)
Proteine	29 kDa (Carbonhydrase)	64 kDa	64 kDa (Glutamic Dehydrogenase)
	25,5 kDa (Chymotrypsinogen)	50 kDa	50 kDa (Carbonhydrase)
	14 kDa (Ribonuclease A)	36 kDa	36 kDa (Myoglobin-Blue)
	12,4 kDa (Cytochrom C)	30 kDa	30 kDa (Myoglobin-Blue)
		16 kDa	16 kDa (Lysosym)
		6 kDa	6 kDa (Aprotenin)
		4 kDa	4 kDa (Insulin)

**Tabelle 2.2:** Protein-Größenstandards.

## 2.12 Kommerzielle Reagenzien-Sätze

Folgende Kommerzielle Reagenzien-Sätze wurden im Rahmen dieser Arbeit laut Anleitung des Herstellers verwendet:

QIAquick Gel Extraktion Kit von Qiagen

Qiagen Plasmid Midi Kit von Qiagen

Bicinchonic Acid Protein Assay Kit von Sigma

Megaprime-DNA-labelling system von Amersham

### 3 Methoden

Allgemein wurden die Regeln für genaues und sauberes Arbeiten im Labor beachtet. Es wurden die Anweisungen für Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen befolgt. Sterilarbeiten erfolgten unter einem geeigneten Abzug. Gesundheitsschädliche oder umweltgefährdende Stoffe wurden den Sicherheitsbestimmungen gemäß verwendet und entsorgt. Arbeiten mit radioaktiven Materialien wurden nach einer Gesundheitsuntersuchung und Sicherheitsunterweisung mit besonderer Vorsicht im Isotopenlabor durchgeführt.

#### 3.1 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Zur Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation wurde ein Protokoll verwendet, das Transformationsraten von  $\geq 5 \cdot 10^8$  transformierte Kolonien pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNS ermöglicht (Hanahan et al., 1983).

Eine einzelne Kolonie der Wirtsbakterien wurde in 2,5 ml  $\text{YT}^{++}$ -Medium über Nacht kultiviert. Mit 50  $\mu\text{l}$  der stationären Bakterienkultur wurden 5 ml  $\text{YT}^{++}$ -Medium angeimpft (1:100 Verdünnung) und bei 37° C bis zu einer  $\text{OD}_{600}=0,8$  inkubiert (225 UpM). Diese gesamte Vorkultur wurde zu 100 ml vorgewärmten  $\text{YT}^{++}$ -Medium gegeben und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,45 bis 0,55 bei 37° C erneut kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf zwei 50 ml Röhren (Falcon) aufgeteilt, 5 Minuten auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (5000 UpM, 5 min, 4° C, Heraeus Minifuge T). Der Überstand wurde vollständig entfernt. Die Zellen wurden bei 4° C in jeweils 10 ml TFB I (4°C) resuspendiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert und erneut sedimentiert (5000 UpM, 5 min, 4° C, Heraeus Minifuge T). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Sedimente bei 4° C in je 2 ml TFB II (4° C) aufgenommen, die beiden Ansätze zusammengegeben, und jeweils 200  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspensionen in ein 1,5 ml Schraubdeckelgefäß überführt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff oder auf Trockeneis schockgefroren und sind bei -70° C mehrere Monate lagerbar.

Für die Transformation wurden die kompetenten Bakterien auf dem Eis aufgetaut. Bei einer Retransformation wurden ca. 25-50 ng Plasmid-DNS sonst der gesamte Ligationsansatz mit 50  $\mu\text{l}$  der Bakterien vermischt und 30 Minuten bei 4° C inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42° C für 70 Sekunden im Wasserbad und sofortige Abkühlung

auf dem Eis (2 min). Zu den Ansätzen wurden 450 µl LB-Medium pipettiert und diese eine Stunde inkubiert (37° C, 250 Upm). Anschließend wurden 100 µl und 400 µl der Bakteriensuspension auf zwei antibiotikahaltige LB-Agarplatten (z.B. Ampizillin oder Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

## **3.2 DNS-Präparation**

### **3.2.1 Analytische-Plasmid-Isolierung (Minipräparation)**

Die nach Wilming (1985) abgewandelte Plasmidpräparation findet Verwendung zur schnellen Durchmusterung rekombinanter Klone. Das Verfahren liefert ca. 2 bis 5 µg DNS in einem Reinheitsgrad, der für die meisten Restriktionsanalysen und auch Sequenzierungen ausreichend ist.

Eine Einzelkolonie wurde über Nacht bei 37° C im Schüttelinkubator bei 225 Upm in 2,5 ml LB-Medium (entsprechend mit oder ohne Antibiotikum) inkubiert. 1,0 ml der Kultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert (10.000 UpM, RT, 30 s, Beckman). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 250 µl Lysispuffer I resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 40 µl frisch angesetzter Lysozym-Lösung (10 mg/ml) versetzt, gemischt, 60 Sekunden in einem kochenden Wasserbad inkubiert und danach sofort 15 Minuten auf Eis abgekühlt. Die Bakterentrümmer wurden abzentrifugiert (13.000 UpM, 4° C, 15 min, Sigma) und mit Hilfe eines autoklavierten Zahnstochers aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Die Fällung der Plasmid-DNS erfolgte durch Zugabe von 500 µl Ethanol absolut (-20° C), kurzem Mischen und Inkubation auf Eis für 15 Minuten. Anschließend wurde die Plasmid-DNS sedimentiert (13.000 UpM, 4° C, 15 min, Sigma), der Überstand verworfen und das Sediment mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol (-20° C) gewaschen (13.000 UpM, 4° C, 5 min, Sigma). Der Überstands wurde verworfen, das Sediment 5 Minuten bei 65° C im Wasserbad getrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Danach wurde die Plasmid-DNS 10 Minuten bei 65° C im Wasserbad inkubiert. Die Lagerung fand bei -20° C statt.

Lysispuffer I (PH 7,5)	50 mM Tris-HCl; pH 7,5 62,5 mM EDTA ; pH 7,5 0,4 % (v/v) Triton X 100 2,5 M LiCl, Lagerung bei 4° C
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym in A.bidest Lösung immer frisch ansetzen

### **3.2.2 Präparative-Plasmid-Isolierung (Midipräparation)**

Größere Mengen an Plasmid-DNS (100 bis 200 µg) mit hohem Reinheitsgrad wurden mit dem Reagenziensatz der Firma Quiagen (Quiagen Plasmid Midi Kit ) isoliert. Die Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### **3.2.3 Isolierung von DNS aus Agarosegelen**

Zur Isolierung von DNS-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde das DNS-Fragment unter UV-Licht (302 nm) mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und ein Reagenziensatz der Firma Qiagen (QIAquick-Gel-Extraktion-Kit) nach Herstellerangaben benutzt.

### **3.2.4 Fällung von DNS mit der Natriumacetat-Methode**

Diese Fällung von DNS wurde zur Konzentrierung oder Umpufferung eingesetzt: Zur DNS-Lösung wurden 1/10 Vol. Natriumacetat (3M; pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol abs. (-20° C) gegeben. Der gut durchmischte Ansatz wurde zur Präzipitation 10 Minuten bei -70° C inkubiert. Das Präzipitat wurde sedimentiert (13.000 UpM, 4° C, 30 min, Sigma), mit 2,5-fachem Vol. 70 % (v/v) Ethanol gewaschen (13.000 UpM, 4° C, 10 min, Sigma) und im

Wasserbad bei 50° C getrocknet. Die DNS wurde dann im gewünschten Volumen TE-Puffer oder A. bidest gelöst.

Natriumacetatlösung 3 M Natriumacetat in A.bidest lösen

1 Stunde autoklavieren

pH 4,8

### 3.2.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren lässt sich durch Messen der Absorption von UV-Licht nach dem Lambert-Beer-Gesetz bestimmen, da die Purine und Pyrimidine der Nukleinsäurebasen aromatische Ringsysteme mit einem Absorptionsmaximum von 260 nm enthalten. Es wurde eine Verdünnung der zu messenden Probe (RNS, DNS oder Oligonukleotide) in A. bidest oder TE-Puffer hergestellt (Gesamtvollumen 500 µl) und die Extinction bei 260 und 280 nm gegen A. bidest bzw. TE-Puffer als Nullwert vermessen (Spektralphotometer: Beckman DU<sup>®</sup>640). Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde die Konzentration berechnet. Eine Absorptionseinheit entspricht bei einem Strahlengang von 1 cm Länge einer Konzentrationen von 50 µg/ml DNS, 20 µg/ml Oligonukleotide und 40 µg/ml RNS oder einzelsträngiger DNS.

Auch Phenol und die aromatischen Aminosäuren absorbieren im kurzwelligen Bereich (280 nm), so dass durch Bilden des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  eine Abschätzung des Reinheitsgrades der Probe möglich ist. Erfolgreich aufgereinigte Proben zeigen einen Quotienten von 1,8 bis 2,0 bei DNS und von 1,9 bis 2,0 bei RNS.

### 3.3 RNS-Präparation

Bei allen Arbeiten mit RNS müssen Schutzmaßnahmen getroffen werden, um RNase-Kontaminationen und damit RNS-Abbau zu vermeiden. Hierzu zählen:

Abwischen aller Geräte und Arbeitsflächen mit 96 % Ethanol.

Tragen von mit 96 % Ethanol desinfizierten Handschuhen.

Einstündiges Autoklavieren und lediglich kurzfristiges Öffnen aller Gefäße.

Behandlung aller Lösungen mit 0,1 % (v/v) DMPC und anschließendes Autoklavieren (1 Std). Lösungen, bei denen diese Behandlung nicht möglich ist (DMPC reagiert mit Aminen), werden mit für RNS-Arbeiten reservierten Reagenzien angesetzt und 1 Stunde autoklaviert. Lagerung von RNS bei allen Arbeiten auf Eis (soweit möglich).

### 3.3.1 RNS-Isolierung aus Kulturzellen mit TriStar<sup>TM</sup>-Reagenz

Zur RNS-Präparation wurden die konfluent gewachsenen Zellen in den Kulturschalen zweimal mit PBS<sup>-</sup> (4° C) gewaschen, das TriStar<sup>TM</sup>-Reagenz (2,5 ml für eine 6 cm Schale) hinzugegeben und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren lysiert.

Das Zellhomogenat wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und kann jetzt für einige Zeit bei -70° C gelagert werden. Bei direkter Weiterverarbeitung wurde das Zellhomogenat 5 Minuten RT inkubiert. Eingefrorene Zellhomogenate wurden nach dem Auftauen ebenfalls 5 Minuten bei RT inkubiert.

Zu dem Ansatz wurden 500 µl Chloroform gegeben, sofort 30 Sekunden gründlich geschüttelt und weitere zwei bis drei Minuten bei RT inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (12.000 UpM, 4° C, 15 min, Beckman Zentrifuge J2-21, Rotor JA20). Die obere RNS-haltige, wässrige Phase wurde in ein frisches 15 ml Röhrchen überführt. Eine Kontamination mit der mittleren Protein- und der unteren DNS-Phase wurde hierbei vermieden. Die Fällung der RNS erfolgte durch Zugabe von 1,5 ml Isopropanol und Inkubation von 30 Minuten bei -20° C. Nach einer Zentrifugation (12.000 UpM, 4° C, 15 min, Beckman Zentrifuge J2-21, Rotor JA20) wurde die RNS als weißes Sediment sichtbar. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 5 ml Ethanol 70 % gewaschen und zentrifugiert (10.000 UpM, 4° C, 5 min, Beckman Zentrifuge J2-21, Rotor JA20). Nach vollständiger Abnahme des Überstandes und Lufttrocknung wurde das Sediment in 100 µl DMPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen, in ein Schraubdeckelgefäß überführt und bei -70° C gelagert oder zu weiterer Verwendung auf Eis gestellt.

## **3.4 DNS-in-vitro Rekombination**

### **3.4.1 Restriktionsendonukleasespaltung**

Die Typ II-Restriktionsendonukleasen wurden von Amersham, Roche oder New England BioLabs bezogen und entsprechend den Herstellerangaben in den mitgelieferten Puffersystemen bei angegebener Temperatur eingesetzt. Die Verdauzeit betrug in der Regel 2 Stunden. Bei Verunreinigung der Proben mit RNS (z.B. nach analytischer Plamidisolierung) wurden pro Ansatz 0,5 µl RNase 2000 hinzugefügt.

### **3.4.2 Ligation überhängender, kohäsiver Enden**

Für die Ligationsreaktionen wurde die T4-DNS-Ligase und der mitgelieferte 10 x Ligase-Puffer von Roche verwendet.

Es wurden 25-50 ng linearisierte Vektor-DNS und im Verhältnis 1:2, 1:3, und 1:4 Insert-DNS eingesetzt. Je nach Gesamtvolumen (10 – 15 µl) wurde der Ansatz mit und 1 – 1,5 µl T4-DNS-Ligase (1 U/µl) versetzt, über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert und im Anschluss für die Transformation eingesetzt.

## **3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (engl. „Polymerase Chain Reaction“) wird ein bestimmtes DNS-Fragment in vitro exponentiell und selektiv amplifiziert (Mullis und Falona, 1987). Verwendet man als Startermoleküle Oligonukleotide, die eine im Vergleich zur Sequenz, die als Schablone eingesetzt wird, eine etwas veränderte Nukleotidfolge aufweisen, kann man Erkennungssequenzen von Endonukleasen in das Amplikon einführen. Voraussetzung dafür ist, dass das Startermolekül eine ausreichende Länge hat, um trotz der ausgetauschten Nukleotide während der Hybridisierungsphase zu binden.

Für die PCR wurde die aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus* isolierten Pfu-Polymerase (Stratagene) eingesetzt. Die eingesetzten Startermoleküle (Kapitel 2.7) hatten eine Länge von 29 Basen, es waren vier (Sinn-Starter) beziehungsweise sechs (Gegensinn-Starter) Nukleotide ausgetauscht. Ein 50 µl-Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 5 µl 10 x Pfu-PCR-Puffer
- 1 µl 10 mM CTP-, GTP-, ATP-; TTP-Mix
- 1 µl 20 pM Sinn-Starter
- 1 µl 20 pM Gegensinn-Starter
- 100 ng DNS
- 39,0 µl A. bidest
- 1 µl (2,5 U) Pfu-Polymerase

Der Ansatz wurde mit einer Positiv- und einer Negativ-Kontrolle jeweils in einem Mikroinjektionsgefäß auf Eis zusammenpipettiert und mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Temperaturen der einzelnen Zyklen wurden mit der Hilfe eines programmierbaren Thermozyklers (Hybaid Omni Gene, MWG-Biotech) folgendermaßen geregelt:

Zyklus	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	94°C	5 min	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	30 s	30 Zyklen
Hybridisierung	72°C	45 s	
Synthese	72°C	90 s	
Auffüllreaktion der partiell doppelsträngigen Moleküle	72°C	20 min	1 Zyklus

Dabei sollte die Temperatur für die Hybridisierung der Startermoleküle mit einer Länge von mehr als 14 Nukleotiden zwischen 60° C und 74° C liegen.

Nach Ablauf des PCR-Programms konnten die Ansätze bei 4° C gelagert oder weiter verwendet werden.

## **3.6 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNS und RNS**

### **3.6.1 Native Gelelektrophorese**

Die native Agarose-Gelelektrophorese dient zur analytischen und präparativen Auftrennung doppelsträngiger DNS-Fragmente. Je nach Länge der aufzutrennenden Fragmente wird das Auflösungsvermögen des Gels durch die Variation der Agarosekonzentration von 0,5 % (Fragmentgröße 500 bis 20.000 bp) bis 2,0 % (Fragmentgröße 50 bis 600 bp) angepasst.

Die entsprechende Agarosemenge wurde durch Erhitzen im Laufpuffer gelöst und Ethidiumbromid vor dem Gießen in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben, um die DNS bei Bestrahlung durch UV-Licht sichtbar zu machen. Die Proben wurden mit 1/5 Vol. 6 x DNS-Ladepuffer versetzt. Zur Bestimmung der Fragmentlänge wird parallel der DNS-Größenstandards aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in TBE-Puffer bei einer Spannung von 80 V bis 130 V.

### **3.6.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung der RNS-Moleküle erfolgt unter denaturierenden Bedingungen in formaldehydhaltigen 1,0 %igen Agarosegelen. Der Zusatz von Formaldehyd als stark denaturierendes Agens dient der Unterdrückung auftretender RNS-Trennartefakte, wie sie bei partieller Doppelstrang-Bildung entstehen.

Für ein mittleres Gel wurden 1,25 g Agarose mit 109 ml A. bidest (1 Stunden autoklaviert) aufgeköcht. Bei einer Temperatur von ca. 60° C wurden 12,5 ml 10 x MOPS-Puffer und 3,125 ml Formaldehyd (37 %) zugegeben, kurz gemischt und das Gel sofort gegossen. Je 10 µg der RNS-Proben und der 3 µg RNS-Größenstandard wurden entsprechend der Volumina mit 5 x Auftragspuffer versetzt, 3 Minuten bei 65° C denaturiert, sofort auf Eis gestellt und direkt aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V ca. 3 bis 4 Stunden. Während der Elektrophorese wurde der Puffer stündlich mit einer Plastikpipette umgewälzt. Unter UV-Licht konnte die Laufhöhe der dominierenden 28S rRNS (4,7 kb) und 18S rRNS (2,2 kb) und die des RNS-Größenstandards für die Transkriptlängenbestimmung der zu untersuchenden RNS herangezogen werden.

(5x) RNS-Auftragspuffer (v/v) 10 x MOPS Puffer (= 4ml)  
 Glycerin 87 %ig (= 2ml)  
 Formamid<sub>deion</sub> (= 3ml)  
 EDTA (= 40 µl 1 M EDTA)  
 Formaldehyd (= 720 µl Formaldehyd 37%)  
 Ethidiumbromid 50 µg/µl  
 Bromphenolblau (= 0,025 g)  
 auf 10 ml auffüllen mit DMOC-H<sub>2</sub>O, Lagerung bei 4° C

### 3.6.3 Nukleinsäuretransfer und – Hybridisierung

Zur Untersuchung von Nukleinsäuren durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden wurden elektrophoretisch aufgetrennte Nukleinsäuren durch Kapillartransfer auf eine Trägermembran übertragen (Southern, 1975). Der Transfer von RNS wird als Northern Blot bezeichnet. Die auf der Trägermembran immobilisierte DNS oder RNS kann nun mit einer radioaktiv markierten DNS-Sonde hybridisiert werden. Dabei wird die Bindungsstabilität zwischen DNS-Sonde und Matrize durch deren Homologie und durch physikalische Faktoren wie Ionenstärke, Temperatur und pH-Wert beeinflusst. Durch Variieren der Hybridisierungsbedingungen kann die Hybridstabilität (Stringenz) beeinflusst werden.

### 3.6.4 Transfer von RNS auf eine Trägermembran (Northern Blot)

Nach der Auftrennung von RNS durch Agarosegel-Elektrophorese mit Formaldehyd wird das Gel zum Kapillarblot eingesetzt. Hierbei wird die RNS auf eine Nylonmembran übertragen. Das Gel wurde zuerst 20 Minuten auf der Wippe in 20 x SSC äquilibriert. Eine Glasscheibe wurde quer über eine mit Transferpuffer (20 x SSC) gefüllte Schale gelegt. Auf diese Platte wurden zwei Streifen Whatman 3MM-Papier entsprechend der Breite des Geles gelegt, die Papierenden tauchten in die Transferlösung ein. Das Gels wurde mit den Taschen nach unten

luftblasenfrei auf das feuchte Filterpapier gelegt. Eine auf Gelgröße zurechtgeschnittene Hybond N-Membran (Amersham) wurde eine Minute mit A. bidest, dann eine Minute mit 2 x SSC vorbehandelt und luftblasenfrei auf das Gel abgerollt. Vier Lagen mit 20 x SSC befeuchtetem 3MM-Papier wurden auf die Membran aufgelegt, ein Stapel Papierhandtücher hinzugefügt und die Konstruktion beschwert. Es wurde mindestens 12 Stunden bei RT geblottet.

Nach Abbau des Blots wurde die Trägermembran 5 Minuten in 2 x SSC gewaschen. Zur Fixierung der RNS wurde die Membran 20 Minuten bei 120° C gebacken und 12 Sekunden mit UV-Licht (UV-Stratalinker) behandelt.

### **3.7 Herstellung radioaktiv markierter Sonden**

Zur radioaktiven Markierung von Doppelstrang DNS-Fragmenten wurde die Zufallsstart-Methode („random primed oligolabelling“) verwendet. Diese Methode dient der radioaktiven DNS-Markierung mit Hilfe unspezifisch bindender Hexanukleotid-Startermoleküle, an denen die Klenow-DNS-Polymerase die Zweitstrangsynthese und damit den Einbau radioaktiv markierter Nukleotide ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP) startet. Es wurde der Reagenziensatz „Megaprime-DNA-labelling system“ (Amersham) nach Herstellerangaben verwendet.

Eingesetzt wurden 50 ng linearisierter Sonden-DNS und 20  $\mu$ Ci  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham) pro Ansatz. Um die freien dNTPs abzutrennen, wurde über eine Sephadex G50-Säule zentrifugiert (5 min, RT, 1500 UpM Hettich Universal 2S).

Das Eluat wurde 3 Minuten zur Denaturierung der Sonde gekocht, auf Eis gestellt und für die Vorhybridisierung (Kapitel 3.7.3) eingesetzt.

#### **3.7.1 Hybridisierung an immobilisierter RNS**

Zunächst wird die Membran zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen vorhybridisiert. Die Nylonmembran mit den gebundenen Nukleinsäuren wurde gerollt und in eine Hybridisierungsröhre (Amersham) geschoben. Es wurden 10 ml der Hybridisierungslösung und 50  $\mu$ l Heringsperma-DNS (10 mg/ml, Roche), die zuvor

5 Minuten gekocht und dann 5 Minuten auf Eis inkubiert worden war, zugegeben. Dieser Ansatz wurde dann im Rollinkubator 2 Stunden bei 42° C inkubiert.

Danach wurde die radioaktive, hitzedenaturierte DNS-Sonde zugegeben und die Hybridisierung der Membran erfolgte bei 42° C ca. 20 Stunden im Rollinkubator. Zum Entfernen nicht spezifisch gebundener Sonde wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer (1 x SSC, 0,1 % SDS) bei 60° C im Schüttelwasserbad gewaschen (zweimal 30 und einmal 10 Minuten). Je nach gewünschter Stringenz wurde die Salzkonzentration der Waschlösungen stufenweise bis auf 0,2 x SSC herabgesetzt. Aus 20 x SSC und 20 % SDS werden durch entsprechende Verdünnungen mit A. bidest die jeweiligen Waschlösungen hergestellt.

Die Membran wurde feucht mit der zuletzt verwendeten Waschlösung in Haushaltsfolie eingeschweißt und bei -70° C autoradiographiert.

### **3.8 Kultur und stabile Transfektion höherer Zellen**

Alle Arbeiten zur Kultivierung von Zellen wurden in Steril-Bänken mit Laminar-Luftstrom (BDK) nach den gängigen Methoden der Zellkultur durchgeführt. Für die Inkubation der Zellen bei 37° C wurden Brutschränke mit wassergesättigter Atmosphäre verwendet, die mit 5 beziehungsweise 10 % CO<sub>2</sub> begast wurden (Heraeus).

#### **3.8.1 Kultivierung von adhärennten Säugerzelllinien**

Zelllinien wurden in D 10-Medium und HeLa-Transfektanten in D 10-Puromycin-Medium oder D 10-Zeo/Puro-Medium bei 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Kultivierung primärer embryonaler Maushepatozyten wurde MX83-Medium bei 5 % CO<sub>2</sub> verwendet.

### **3.8.2 Präparation und Kultivierung von Hepatozyten aus Mausembryonen**

Die Isolierung embryonaler Maushepatozyten wurde wie in Traub et al. (1987) beschrieben durchgeführt. Das Medium MX83 wurde analog Hoffmann et al. (1989) zusammengesetzt. Die Präparation von embryonalen Hepatozyten von ein bis drei schwangeren Mäusen erfolgt unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Materialien (Besteck, Lösungen, etc.).

Die schwangere Maus wurde durch Dislokation des Genicks getötet, der Bauchraum geöffnet, die Embryonen komplett mit Uterushaut herausgenommen und in eine 10 cm Petrischale gelegt. Die Embryonen wurden aus der Uterushaut und dem Embryonensack genommen, in eine frische Petrischale überführt und durch Durchschneiden des Genickes getötet. Ein Schnitt in den Oberbauch eines Embryos knapp unter den Brustwirbeln ließ die Leber hervorquellen, die mittels zweier Pinzetten entfernt und in eine 6 cm Petrischale mit 5ml Anheftmedium überführt wurde. Es wurden nacheinander aus allen Embryonen die Lebern herauspräpariert und diese anschließend mit einer Schere circa 5 Minuten in kleine Stücke zerschnitten. Das Anheftmedium wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und die Leberstücke mit 5 ml Collagenaselösung (37° C) in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit weiteren 7 ml Collagenaselösung (37° C) und einem Rührfisch gespült. Die Leberstücke wurden 12 Minuten bei 37° C unter sanften Rühren inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in eine 100 ml Glasflasche mit 12 ml Anheftmedium (4° C, auf Eis) überführt. Es folgten 3 weitere Inkubationen mit je 12 ml Collagenaselösung (37° C) für 15 Minuten bei 37° C unter sanften Rühren. Die gesammelten Überstände wurden auf zwei 50 ml Falconröhrchen (4° C, auf Eis ) verteilt und 15 Sekunden bei 2500 UpM, 4° C in einer Heraeus-Christ-Zentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, die Pellets in zusammen 5 bis 10 ml Anheftmedium resuspendiert und die Suspensionen in einem Falconröhrchen gesammelt. Die Zellzahl wurde bestimmt und circa  $1,4 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Anheftmedium in eine 3,5 cm Petrischale gegeben. Nach 3 Stunden Inkubation im Brutschrank (37° C, 10% CO<sub>2</sub>) wurde das Medium abgesaugt und je 1 ml MX83 dazugegeben. Am nächsten Morgen und falls nötig auch am darauf folgenden Tag wurden die Zellen circa 5 mal mit DMEM-Medium gewaschen, um die toten Zellen zu entfernen und anschließend mit MX83 gefüttert. Am dritten Tag nach der Präparation waren die Zellen dann circa zu 95 % konfluent .

Collagenaselösung: 56 mg Collagenase H (Boehringer)  
 gelöst in 50 ml PBS<sup>-</sup>  
 stets frisch ansetzen  
 steril filtrieren (Porengröße 0,45 µm)  
 aus 37° C erwärmen

### 3.8.3 Behandlung von Zellen mit Degradationshemmern und anderen Reagenzien

Wurden Zellen eingesetzt, um den Einfluss von Degradationshemmern auf Gap Junctions zu untersuchen, wurden die Zellen bevor sie für entsprechende Experimente, wie zum Beispiel der Mikroinjektion, verwendet wurden, zweimal mit dem entsprechenden Kulturmedium, gewaschen und erneut Medium hinzugegeben. Drei Stunden vor den entsprechenden Experimenten wurde dem Medium Chloroquin-Stammlösung (12 bis 15 µl pro 1 ml Medium, angepasst an die untersuchten Zellen) beziehungsweise vier Stunden zuvor Lactacystin-Stammlösung (2 bis 2,5 µl pro 1 ml Medium) hinzugefügt. Wurde die Änderung der Phosphorylierung von Connexinen untersucht, wurden die Zellen ebenfalls drei Stunden vor den entsprechenden Experimenten gewaschen und TPA, ein Aktivator der Proteinkinase C oder der sekundäre Botenstoff cAMP (in Form von dibutyryl cAMP (dbcAMP), einem membrangängigen Derivat) direkt nach dem Waschen dem Medium in den Endkonzentrationen 100 ng/ml (TPA) und 1 Mol/ml (cAMP) hinzugefügt.

Parallel zu solchen Experimenten wurden stets Kontrollexperimente mit Zellen, die analog gewaschen wurden, nicht aber mit Reagenzien behandelt wurden, durchgeführt.

Lactacystin- Stammlösung 200 µg Lactacystin (Calbiochem)  
 (10 mM) gelöst in 53 µl Dimethylsulfoxid  
 lagern bei -20° C, stabil für etwa drei Monate

Chloroquin-Stammlösung 5200 µg Chloroquin  
 (20 mM) gelöst in 500 µl sterilem PBS<sup>-</sup>  
 lagern bei -20° C

TPA und dbcAMP wurden vor der Zugabe zum Medium in steriler physiologischer Kochsalz-Lösung (140 mM NaCl) angesetzt, diese Lösungen konnten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 3.8.4 Metabolische Markierung von Kulturen adhärenter Zellen

Für metabolische Markierungen von Kulturzellen wurde  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat oder  $^{35}\text{S}$ -Methionin eingesetzt. Die Markierung wurde an Zellen durchgeführt, die eine Konfluenz von 85 % (HeLa-Transfektanten und Zelllinien) beziehungsweise 95 % (Maushepatozyten) erreicht hatten.

Markierungen mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin:

Die Zellen wurden zweimal mit PBS<sup>-</sup> ( $37^{\circ}\text{C}$ ), einmal mit DMEM<sup>-</sup>-Medium (methioninfrei,  $37^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen und eine Stunde mit D 10 M<sup>-</sup>-Medium (1 ml Medium für eine 6 cm-Schale, 0,5 ml Medium für eine 3,5 cm-Schale) weiterkultiviert. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{35}\text{S}$ -Methionin zum Medium erfolgte die Markierung für 4 Stunden beziehungsweise für eine Stunde (nur bei „Pulse-Chase“-Experimenten zur Halbwertszeitbestimmung) unter ständigen Schwenken auf einer Wippe im Brutschrank.

Markierungen mit  $^{32}\text{P}$ -Methionin:

Die Zellen wurden dreimal mit DMEMP<sup>-</sup>-Medium (phosphatfrei,  $37^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen und eine Stunde mit D 10 P<sup>-</sup>-Medium (1 ml Medium für eine 6 cm-Schale, 0,5 ml Medium für eine 3,5 cm-Schale) weiterkultiviert. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat zum Medium erfolgte die Markierung für 4 Stunden unter ständigen Schwenken auf einer Wippe im Brutschrank.

Chloroquin, TPA oder dbcAMP wurden drei Stunden vor Ende der vierstündigen Markierung zum Medium hinzugegeben, die Zugabe von Lactacystin erfolgte zu Beginn der Markierung. Die Konzentrationen wurden wie in Kapitel 3.8.3 beschrieben gewählt. Nach der Markierung wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert (Kapitel 3.11.1).

### 3.8.5 Stabile Transfektion mit Hilfe der Lipofektin-Methode

Bei dieser Methode wird die DNS in Liposomen verpackt, die mit der Zellmembran fusionieren. Für die Transfektion wurde Tfx-20 (Promega) verwendet.

Die HeLa-Transfektante wurde auf 10 cm-Kulturschalen so ausplattiert, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 60 % aufwies. In einem 15 ml Röhrchen wurden 10 µg Transfer-DNS im Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(+) zu 6 ml D10-Medium pipettiert, gründlich vermischt und 60 µl Tfx-20-Reagenz hinzugegeben (Ladungsverhältnis von Tfx-20 : DNS, wie 1:3). Der Ansatz wurde gründlich gemischt und 10 bis 15 Minuten bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die 10 cm-Kulturschalen mit den zu transfizierenden Zellen zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Das DNS/Tfx-20/D10-Medium-Gemisch wurde auf die mit PBS<sup>-</sup> gewaschenen Zellen gegeben und die Kulturschalen für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert (10 % CO<sub>2</sub>, 37° C). Nach Zugabe von weiteren 6ml D10-Medium wurden die Zellen weitere 14 bis 18 Stunden im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und für ca. 30 Stunden in D10-Medium weiterkultiviert (10 % CO<sub>2</sub>, 37° C).

Nun wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS<sup>-</sup> trypsiniert und in Verdünnungen von 1:3 bis 1:10 mit D 10-Zeo/Puro-Medium auf neue 10 cm-Schalen ausplattiert und auf Zeocin-Resistenz zu selektioniert. Die weitere Kultivierung der Zellen fand mit D 10-Zeo/Puro-Medium, dabei wurde das Medium alle 3-4 Tage gewechselt.

Nach ein bis zwei Wochen konnten resistente Klone isoliert werden. Die Kulturschalen wurden zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und die Klone in eine Vertiefung einer 48-Well-Kulturschale (Falcon) überführt, in die 500 µl Selektionsmedium (D 10-Zeo/Puro-Medium) vorgelegt waren. Dazu wurden die Zellen eines Klons mit einer gelben Spitze von der Kulturschale vorsichtig abgeschabt, aufgesaugt und vorsichtig durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in den 500 µl Selektionsmedium vereinzelt. Die Isolierung der Zell-Klone mit der gelben Spitze erfolgte halbsteril unter Beobachtung mit einem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung. Die Zellen wurden in D 10-Zeo/Puro-Medium vermehrt.

### 3.9 Mikroinjektion in adhärent wachsenden Kulturzellen

Die Mikroinjektion und daraufhin folgende Beobachtung der Ausbreitung von Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. Lucifer Yellow) oder Indikatormolekülen (z.B. Neurobiotin) in

Zellen, dient zum Nachweis funktioneller Gap Junction Kanäle und zu ihrer Charakterisierung über die Bestimmung der Anzahl der gekoppelten Zellen (Zellen, in die sich der Farbstoff oder das Indikatorreagenz ausgehend von der injizierten Zelle, ausbreitet).

Für die Mikroinjektion mittels Iontophorese wurden Kapillaren aus Borsilikatglas mit massiven Innenfilament verwendet (GB 100-F8P, Science Products GmbH). Die Injektionskapillaren (GB 100-F8P, Science Products GmbH) wurden mit Hilfe eines horizontalen Kapillarenziehgerät (PD-5, Narishige, Tokio) zu einem Spitzendurchmesser von 1-2  $\mu\text{m}$  ausgezogen. Die Kapillare wurde mit dem stumpfen Ende in die Farblösung gestellt, so dass die gezogene Spitze durch die Kapillarkräfte mit Farblösung gefüllt wurde. Anschließend wurde die Kapillare luftblasenfrei mit 1 M KCl gefüllt und in den mit 1 M KCl gefüllten Mikroelektrodenhalter aus Plexiglas mit AgCl-Übergang (EH-1S, Sachs) eingesetzt. Der Mikroelektrodenhalter wurde dann an einen steuerbaren Mikromanipulator angebracht und konnte über das Steuergerät bewegt werden. Die Injektion des Farbstoffes erfolgte durch Anlegen eines positiven Stroms von 20 nA für 10 bis 15 Sekunden. Die Mikroinjektion wurde mit dem inversen Mikroskop IM 35 von ZEISS (Fluoreszenzeinrichtung HBO 100 W) beobachtet. Die zu untersuchenden Zellen wurden zwei Tage (HeLa-Transfektanten und Zelllinien) oder drei Tage (Maushepatozyten) vor der Kopplungsmessung in 6 cm- oder 3,5 cm-Schalen ausplattiert und hatten zum Zeitpunkt der Messung einen Konfluenzgrad von etwa 80 % bis 95 % (Maushepatozyten) erreicht.

Wurde der Farbstoff Lucifer Yellow injiziert, konnte die Ausbreitung des Farbstoffs direkt verfolgt werden. Die Zellen, in die sich der Farbstoff innerhalb von 90 Sekunden ausgebreitet hatte, wurden gezählt und dienten als Maß für die Kopplung. Hierbei wurde zwischen koppelnden Zellen 1. Ordnung, also Zellen, die der injizierten Zelle unmittelbar benachbart waren und solchen 2. Ordnung, die den Zellen 1. Ordnung unmittelbar benachbart waren, unterschieden.

Lucifer Yellow	4 % (w/v) in 1 M LiCl lösen
	zentrifugieren (Sigma, 13000 UpM, 15 min, 4° C)
	Überstand bei 4° C lichtgeschützt aufbewahren

Damit der Injektionserfolg mit Neurobiotin beobachtet werden konnte, wurde der Neurobiotin-Lösung zusätzlich Rhodamin-3-Isothiocyanat Dextran zugegeben. Nach den Injektionen (10 bis 20 Injektionen pro Kulturschale innerhalb von 15 Minuten) wurden die Kulturschalen zweimal mit PBS<sup>-</sup> (RT) gewaschen und die Zellen in Glutaraldehyd-Lösung

(2ml auf eine 6 cm-Schale, 1ml auf eine 3,5 cm Schale) fixiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS<sup>-</sup> (RT) wurden sie in Triton X-100-Lösung (2ml auf eine 6 cm-Schale, 1ml auf eine 3,5 cm Schale) 2 Stunden unter ständigem Schwenken permeabilisiert, zweimal mit PBS<sup>-</sup> (RT) gewaschen und für 90 min mit 2 ml Meerrettich-PO-Lösung bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS<sup>-</sup> (RT) erfolgte die Farbreaktion durch Inkubation von 30 Sekunden in Diaminobenzidin-Lösung (2ml auf eine 6 cm-Schale, 1ml auf eine 3,5 cm Schale). Die Farbreaktion wurde durch Absaugen der Diaminobenzidin-Lösung und dreimaliges Waschen mit PBS<sup>-</sup> gestoppt. Die Zellen wurden mit PBS<sup>-</sup> überschichtet und die Anzahl der gefärbten Zellen pro Injektion konnte unter einem Mikroskop ausgezählt werden.

Neurobiotin-Lösung	6 % (w/v) Neurobiotin 0,4 % (w/v) Rhodamin-3-Isothiocyanat Dextran 0,1 M Tris pH 7,6; Lagerung lichtgeschützt bei 4° C
Glutaraldehyd-Lösung	1% Glutaraldehyd mit PBS <sup>-</sup> auffüllen Lösung immer frisch ansetzen
Triton X-100-Lösung	2 % Triton X-100 mit PBS <sup>-</sup> auffüllen Lagerung bei 4° C
Diaminobenzidin-Lösung	1 Tablette Diaminobenzidin in 15 ml TBS lösen sterilfiltrieren; Lagerung bei -20° C um Diaminobenzidin-Färbelösung zu erhalten 0,003 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> frisch hinzufügen
Meerrettich-PO-Lösung	0,1 % Meerrettich Peroxidase Avidin D mit TBS auffüllen, sterilfiltrieren; Lagerung bei -20° C

### 3.10 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 85 bis 95 % auf angeätzten Deckgläschen kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS<sup>+</sup> wurden der Zellen mit Ethanol abs. (-20° C) für 5 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wurde einmal mit PBS<sup>+</sup> (4° C) und zweimal mit PBS<sup>+</sup>/0,1 % BSA (4° C) gewaschen. Nun wurde die erste Antikörperlösung auf die Zellen gegeben (20 µl bei Verwendung von 10 mm-Deckgläschen) und 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS<sup>+</sup>/0,1 % BSA (4°C) wurde die Lösung des zweiten, fluoreszenzgekoppelten Antikörpers auf die Deckgläschen pipettiert und 1 Stunde lichtgeschützt bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS<sup>+</sup> (4° C) und zweimal mit A. bidest (RT) gewaschen und auf den vorbereiteten Objektträgern in einem Tropfen para-Phenylendiamin eingebettet. Nach einem Abdichten der Deckgläser durch Entellan wurden die Objektträger bei 4° C im Dunkeln gelagert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiophot, Zeiss).

Die Antikörper wurden entsprechend wie in 2.10 beschrieben in 0,5 % Caseinlösung verdünnt (frisch hergestellt durch Mischen des Antikörpers mit Caseinlösung und PBS<sup>-</sup>).

Casein-Lösung	1 % Casein 0,1 % Natriumacid (NaN <sub>3</sub> ), sterilfiltrieren; Lagerung bei 4° C
Deckgläschen	mit Aceton waschen 3 bis 4 Stunden mit 2 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> bei RT inkubieren mehrmals mit A.bidest waschen trocknen, autoklavieren
para-Phenylendiamin	10 ml PBS- 100 mg p-Phenylendiamin 90 ml Glycerol pH 8 mit 0,5 M Carbonat-/Bicarbonatpuffer (3,7 g NaHCO <sub>3</sub> und 0,6 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ad 100 ml)einstellen

## 3.11 Proteinpräparation

### 3.11.1 Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen wurden bis zu Konfluenz von 85 % - 95 % kultiviert und je nach Experiment entsprechend 3.8.3 mit Reagenzien behandelt. Wurden die Zelllysate anschließend für die SDS-PAGE verwendet, wurden sie entweder direkt in 1x SDS-Probenpuffer oder in Tris-SDS-Puffer (unvollständiger Probenpuffer, lässt Proteinbestimmung zu) lysiert. War, wie zum Beispiel nach allen metabolischen Markierungen, eine Immunpräzipitation als anschließendes Experiment geplant, wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert.

(1x) Sample buffer	62,5 M Tris-HCl, pH 6,8 3 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerin 5 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 0,001 % (w/v) Bromphenolblau
Tris-SDS-Puffer	0,06 M Tris-HCl, pH 6,8 3 % SDS

#### Lyse von Zellen in RIPA-Puffer

Vor der Lysierung wurden die Zellen zweimal mit PBS<sup>-</sup> (RT) gewaschen, auf Eis gestellt und nochmals mit PBS<sup>-</sup> (4°C) gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurden die Zellen sorgfältig trockengesaugt und entsprechend der Schalengröße 250  $\mu$ l (3,5 cm-Schale) oder 500  $\mu$ l (6 cm-Schale) Lysispuffer auf den Zellrasen gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit Hilfe eines Gummischabers und in ein 1,5 ml Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt. Nun wurde dieser Ansatz weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert und während dieser Zeit alle 5 Minuten mit dem Strudelmischer sorgfältig gemischt. Das Lysat wurde anschließend 30 Minuten bei 4°C (13000 UpM, Sigma) zentrifugiert und der Überstand entweder sofort für eine Immunpräzipitation eingesetzt oder bei -20°C (radioaktive Proben) oder -70°C (nicht radioaktive Proben) gelagert. Zur Lyse von mit <sup>32</sup>P-ortho-Phosphat

markierten Zellen wurde dem Lysispuffer zusätzlich Na-ortho.Vanadat in der Endkonzentration 10 mM zugegeben.

RIPA-Puffer	10 mM Phosphatpuffer pH 7,2 0,1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Triton-X-100 0,1 % (w/v) Natriumdesoxycholat (DOC) 40 mM NaF vor Verwendung 1*Complete <sup>TM</sup> (Stock: 25*, Boehringer Mannheim) hinzufügen
Phosphatpuffer pH 7,2	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 9,16) mit 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 4,7) auf pH 7,2 einstellen

### 3.11.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten wurde mit Hilfe des Reagenziensatz Bicinchonic Acid Protein Assay Kit von Sigma durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Fähigkeit der Proteine zur Reduktion von Kupfersulfat. Dabei ist die photometrische Absorption der zu untersuchenden Kupfersulfatlösungen bei 562 nm proportional zur Proteinkonzentration. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 3.11.3 Immunpräzipitation

Mit Hilfe von Protein A, das in Protein A-Sepharose (Pharmacia) kovalent gebunden an eine Sepharose-Matrix vorliegt, wird die konstante Region von zum Beispiel Kaninchen Antikörpern gebunden und damit immobilisiert. So können spezifische Proteine aus einem Zelllysate in Form von Antikörper-Antigen-Komplexen isoliert werden.

250 µl RIPA-Zelllysate (Kapitel 3.11.1) wurden mit 40 µl Sepharose CL-4B (in TBS, Pharmacia) versetzt und zwei Stunden bei 4°C drehend inkubiert. Der Ansatz wird anschließend zentrifugiert (Sigma, 6000 UpM, 4°C, 2 min) und der Überstand zu einem

vorbereiteten Gemisch aus 10 µl Protein A-Sepharose (in TBS, Pharmacia) und Antikörper pipettiert und 12 bis 14 Stunden bei 4°C drehend inkubiert. Die entstandenen Komplexe aus Antigen, Antikörper und Protein A-Sepharose wurden in einem Zentrifugationsschritt sedimentiert (Sigma, 6000 UpM, 4°C, 2 min). Das Pellet wurde dann dreimal mit je 500 µl Waschpuffer und einmal mit A.bidest gewaschen, zwischen Waschsritten wurde das Pellet durch Zentrifugation erneut sedimentiert (Sigma, 6000 UpM, 4°C, 2 min).

Zur Vorbereitung der Auftrennung der immunpräzipitierten Proteine in der SDS-PAGE (Kapitel 3.12) wurden die möglichst trockenen Pellets mit 15 µl 1\*SDS-Probenpuffer versetzt und nach kräftigen Mischen 5 Minuten bei 60°C im Wasserbad erhitzt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (Sigma, 13000 UpM, RT, 2 min) und der Überstand wurde einer SDS-PAGE unterzogen.

Sollten die Proben vor der elektrophoretischen Auftrennung mit alkalischer Phosphatase behandelt werden, wurde das Pellet nach dem dritten Waschsritt in 500 µl A.bidest resuspendiert und gleichmäßig auf zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Die eine Hälfte wurde als Kontrollprobe ohne alkalisch Phosphatase-Behandlung auf Eis aufbewahrt, die zweite Hälfte wurde zentrifugiert (Sigma, 6000 UpM, 4°C, 2 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl Verdünnungspuffer gewaschen, zentrifugiert (Sigma, 6000 UpM, 4°C, 2 min) und der Überstand verworfen. Zu dem Pellet wurden dann 15 µl Verdünnungspuffer und 5 U alkalische Phosphatase (Boehringer Mannheim) hinzugegeben und 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden beide Proben, mit und ohne alkalische Phosphatase zentrifugiert (Sigma, 6000 UpM, 4°C, 2 min) und der Überstand in der SDS-PAGE eingesetzt. Zur Immunpräzipitation von mit <sup>32</sup>P-ortho-Phosphat markierten Proteinen wurde dem Waschpuffer zusätzlich Na-ortho-Vanadat in der Endkonzentration 10 mM zugegeben.

TBS für Sepharose	50 mM Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM NaCl
	0,02 % (w/v) NaN <sub>3</sub>

Waschpuffer (pH 7,0)	10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0
	1 M NaCl
	10 mM EDTA
	40 mM NaF
	0,2 % (v/v) Triton-X-100

Verdünnungspuffer(pH 9,7) 1 mM Tris-HCl, pH 9,5  
0,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,4 µM ZnCl<sub>2</sub>

### **3.12 „Pulse-Chase“-Experimente**

Zur Bestimmung der Halbwertszeit wurden Zellen für eine Stunde (Pulse) mit <sup>35</sup>S-Methionin markiert und anschließend nicht direkt lysiert, sondern zuerst für verschiedene Zeiten in Kulturmedium mit doppelter Methioninkonzentration weiterkultiviert (Chase).

Eine Schale (0 Stunden Chasezeit) wurde nach der Markierung sofort lysiert, die restlichen Zellen wurden nach der einstündigen Markierung mit <sup>35</sup>S-Methionin zweimal mit Kulturmedium mit doppelter Methioninkonzentration gewaschen und sofort weiterkultiviert. Wurde der Einfluß von Degradationshemmern untersucht, so wurden dem Medium direkt zu Anfang der Chasezeit Lactacystin und Chloroquin in den in Kapitel 3.8.3 aufgeführten Konzentrationen hinzugefügt.

Nach verschiedenen Chasezeiten wurden die Zellen wie in Kapitel 3.11.1 beschrieben mit RIPA-Puffer lysiert und anschließend eine Immunpräzipitation durchgeführt.

### **3.13 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) angewandt. Es wurden Trenngel mit einem Gehalt an Polyacrylamid von 10 beziehungsweise 12,5 % und einer Dicke von 1,5 mm verwendet.

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit 0,1 prozentiger SDS-Lösung überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde die SDS-Lösung entfernt und das Sammelgel mit eingesetztem Kamm gegossen. Die fertig polymerisierten Gele wurden in die Elektrophoreseapparatur eingespannt.

Zu Proben, die in Tris-SDS-Puffer lysiert wurden, wurde im Verhältnis 3:1 4 x SDS.Probenpuffer gegeben, in SDS-Probenpuffer lysierte Proben konnten direkt aufgetragen werden. Parallel zu den Proben wurde ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte anfangs bei 20 mA (Sammelgel) und später bei

25 mA (Trenngel). Nachdem die Proben aus den Taschen in das Sammelgel gelaufen waren wurde eine Wasserkühlung (10°C) angeschlossen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit nicht radioaktiv markierten Proben direkt für den Elektrotransfer (Kapitel 3.13) verwendet. Gele mit radioaktiven Proben wurden zunächst fixiert (50 % Methanol, 15 % Eisessig, 35 % A.bidest) und entweder direkt getrocknet oder zuerst mit Amplify-Lösung (Amersham) inkubiert und dann getrocknet. Anschließend wurden die getrockneten Gele in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm (<sup>35</sup>S: BioMax MR oder <sup>32</sup>P: X omat AR von Kodak) bei -70°C autoradiographiert.

Lösung A	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) N,N'-Methylen-bis-acrylsäureamid
Lösung B	1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8 mit konz. HCl
Lösung D	0,5 M Tris 0,4 % SDS (w/v) pH 6,8 mit konz. HCl
0,4% Sammelgel (pH 6,8)	1,00 ml Acrylamid-Stammlsg. 1,88 ml Lösung D 4,50 ml A. bidest 10,0 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamid) 45,0 µl APS (Ammoniumperoxodisulfat)
Trenngel (pH 8,8) 12,5 %	6,72 ml Acrylamid-Stammlsg. 5,04 ml Lösung B 8,12 ml A. bidest 18,8 µl TEMED 96,6 µl APS

Trenngel (pH 8,8) 10 %	8,30 ml Acrylamid-Stammlsg. 5,04 ml Lösung B 8,12 ml A. bidest 15,13 µl TEMED 96,6 µl APS
Elektrophorese-Puffer (10 x)	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1%SDS
(4 x) Sample buffer	250 M Tris-HCl 12 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerin 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,004 % (w/v) Bromphenolblau

### 3.14 Proteintransfer und immunologischer Nachweis

#### 3.14.1 Elektroblot

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf Nitrozellulose erfolgte mit Hilfe eines Elektroblots in Elektrotransfer-Puffer (Sambrook et al., 1989). Die durch SDS-Anlagerung negativ geladenen Proteine wurden durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf die proteinbindende Nitrozellulose (0,45 µm, Schleicher und Schüll) übertragen. Dazu wurden die am Transfer beteiligten Komponenten mit Elektrotransfer-Puffer durchtränkt und in folgender Reihenfolge luftblasenfrei übereinandergelegt: ein Schaumstofflappen, eine Lage 3MM-Papier, das Gel, die mit A. bidest befeuchtete Nitrozellulose, eine weitere Lage 3MM-Papier und zum Schluss ein zweiter Schaumstofflappen. Dieser Sandwich-Aufbau wurde in die mit Elektrotransfer-Puffer gefüllte Elektroblotkammer eingesetzt und der Transfer erfolgte 2 Stunden bei einer angelegten Spannung von 100 V bei 4°C.

Nach Beendigung des Transfers wurde der Molekulargewichtsmarker von der Nitrozellulose-Membran abgetrennt, in Ponceau S gefärbt und getrocknet. Die restliche Membran wurde entweder direkt für den immunologischen Nachweis eingesetzt oder zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Das Polyacrylamidgel wurde für 2 Stunden in Coomassie-

Färbelösung gefärbt und die Proteinbanden durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung sichtbar gemacht.

Elektrotransfer-Puffer	20 mM Tris 150 mM Glycin 20 % Methanol
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 10 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Methanol Filtrieren durch Faltenfilter; Lagerung lichtgeschützt bei RT
Coomassie-Entfärber	10 % (v/v) Essigsäure 30 % (v/v) Methanol
Ponceau S Färbelösung	0,2 % (w/v) Ponceau S 3 % (v/v) Trichloressigsäure

### 3.14.2 Immunologischer Proteinnachweis

Die Membran mit den transferierten Proteinen wurde, direkt nach dem Elektroblob oder getrocknet nach einer 5-minütigen Inkubation in A. bidest, zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 2 Stunden unter Schwenken bei RT in Roti-Block inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper über Nacht bei RT.

Am folgenden Tag wurden die nicht gebundenen Antikörper durch zweimaliges Waschen (20 min, 30 min) mit Blotto entfernt und die Membran anschließend mit  $^{125}\text{I}$ -Protein A (0,5  $\mu\text{Ci/ml}$ , Amersham) für 2 Stunden unter Schwenken inkubiert. Unspezifisch gebundenes  $^{125}\text{I}$ -Protein A wurde durch viermaliges Waschen mit Roti-Block (je 30 min) entfernt. Die Membran wurde dann kurz in  $\text{PBS}^-$  gewaschen und anschließend getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm (X omat AR von Kodak) bei  $-70^\circ\text{C}$ .

Roti-Block 1 x	10 x Roti-Block (Roth) mit A. bidest frisch herstellen
----------------	---

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Halbwertszeit von Connexin43 ist abhängig von der exprimierenden Zelle

Connexin43 ist eines der meistuntersuchtesten Connexine, auch Halbwertszeitbestimmungen wurden schon mehrmals durchgeführt. So ergab die Untersuchung der Halbwertszeit von Cx43 zum Beispiel in primären Rattenherzmuskelzellen 1-2 Stunden (Laird et al., 1991) beziehungsweise 1,4 Stunden (Laing et al., 1998) und in mit Cx43 transfizierten E36-Zellen 2,5 Stunden (Laing, 1995). Die exakte Bestimmung einer Halbwertszeit ist experimentell schwierig und es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Ergebnisse unterschiedlicher Experimentatoren stark unterscheiden können. Die Bestimmung der Halbwertszeit von Cx43, parallel unter den gleichen Laborbedingungen durchgeführt in verschiedenen Zellsystemen, sollte zeigen, ob die Halbwertszeit von Connexinen eine proteintypische Konstante ist oder ob sie von der Zelle, die das Connexin exprimiert, abhängig ist.

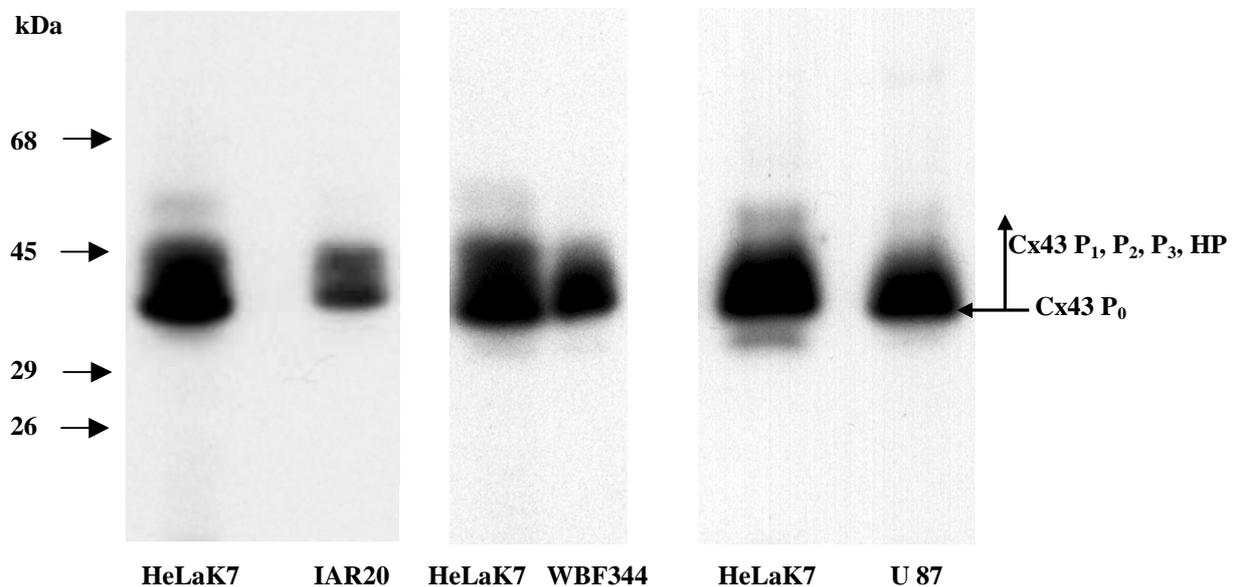
Zelllinie	Referenz
<b>IAR20</b>	eine Leberepithel-Zelllinie aus Ratte (Montesano et al., 1977)
<b>WBF344</b>	eine Leberepithel-Zelllinie aus Ratte (Tsao et al., 1984)
<b>HeLaK7</b>	eine Cervixcarcinom-Zelllinie aus menschlichem Gewebe (Gey et al., 1952), die mit rCx43 stabil transfiziert wurde (Elfgang et al., 1995)
<b>U 87</b>	eine Glioma-Zelllinie aus menschlichem Gewebe (Ponten und Macintyre, 1968)

**Tabelle 4 – 1: Untersuchte Zellen und Referenzen**

Es ist bekannt, dass die in der Tabelle 4 – 1 aufgeführten Zellen Connexin43 exprimieren. Cx43 wurde mittels RNS-Blot und Immunoblot nachgewiesen (WBF344: Ren et al., 1994; IAR20: Bex et al., 1995, 19; HeLaK7: Elfgang et al., 1995; U 87: Shinoura et al., 1996). In der Literatur werden WBF344-, IAR20- und HeLaK7-Zellen als gut koppelnd charakterisiert und weisen in der Immunfluoreszenz-Analyse die für Connexine typischen Signale an den Kontaktmembranen auf.

#### 4.1.1 Nachweis von Cx43 in den verschiedenen Zellsystemen

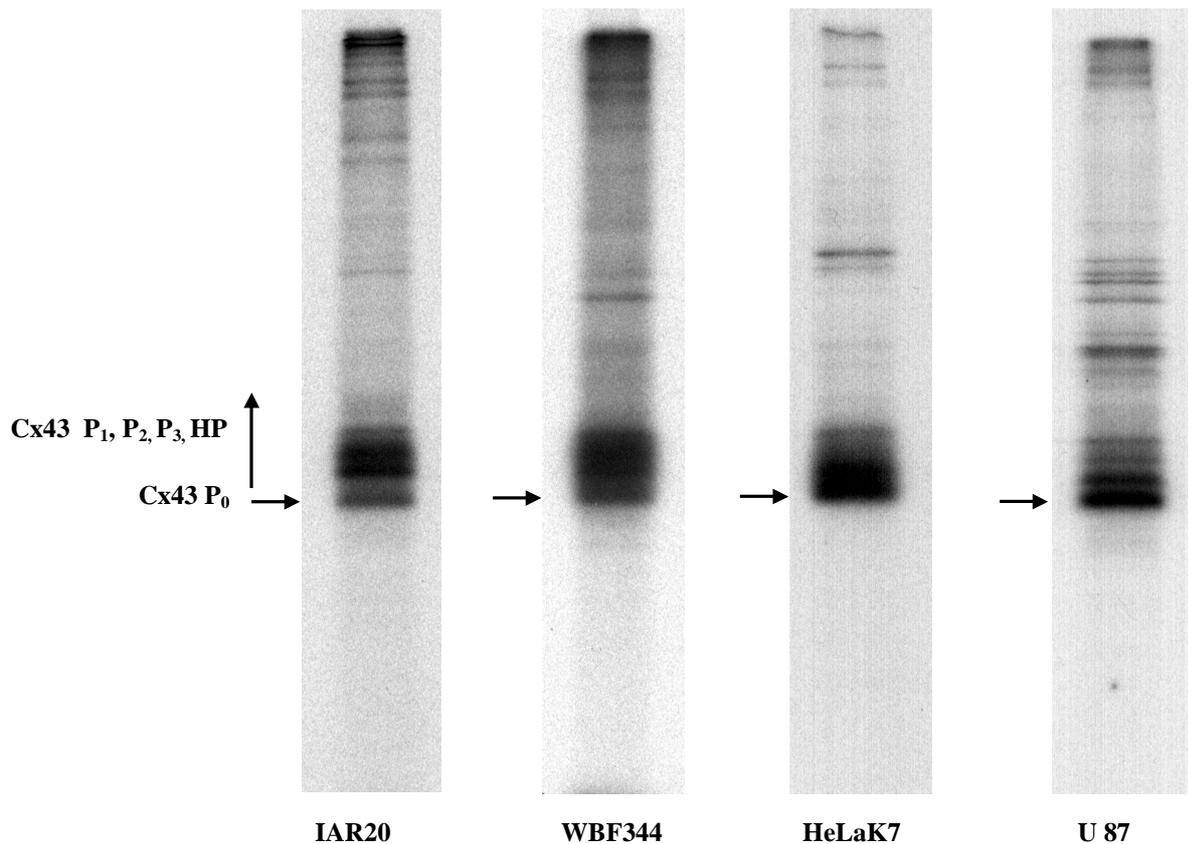
Eine Immunoblot-Analyse der Zelllysate sollte zeigen, in welchem Maße die verschiedenen Zellen Cx43 exprimieren. In allen Zelllysaten konnte ein deutliches Signal bei ca. 43 kDa (nichtphosphoryliertes Cx43: P<sub>0</sub> oder NP) und oberhalb 43 kDa bis 46 kDa (phosphoryliertes Cx43: P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> und hochphosphoryliertes Cx43 HP) detektiert werden, die Signalintensitäten der IAR20-, WBF344- und U 87-Zelllysate waren etwas schwächer aber in vergleichbarer Größenordnung wie die Intensität des Signals der HeLaK7-Transfektanten (Abb. 4 - 1).



**Abbildung 4 - 1: Immunoblotanalysen von IAR 20-, WBF 344-,U 87 und HeLaK7-Zelllysaten**

Jeweils paarweise wurden die gleichen Mengen an Gesamtprotein der Lysate von HeLaK7 und IAR20 beziehungsweise WBF344 oder U 87 aufgetragen. Die Detektion der Signale erfolgte durch Markierung mit <sup>125</sup>J-Protein A und anschließende Autoradiographie.

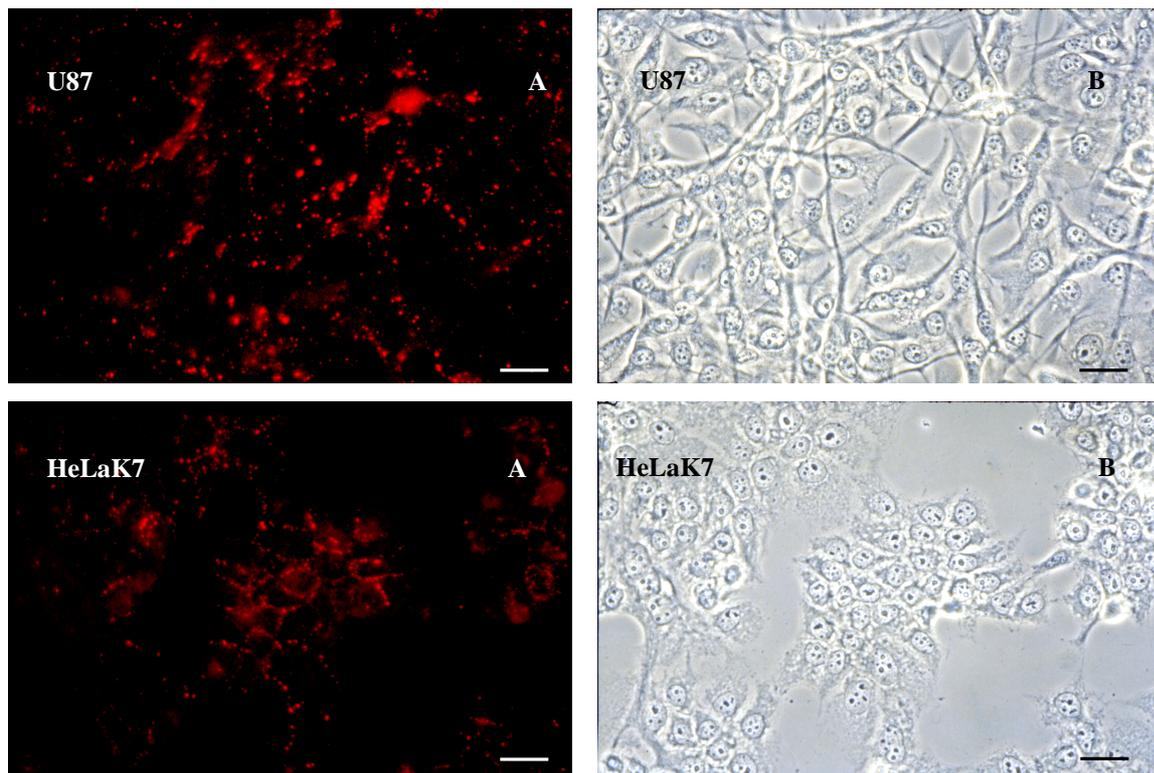
Zur weiteren Untersuchung der Expression wurde Cx43 mit affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpern aus den verschiedenen metabolisch mit <sup>35</sup>S-Methionin markierten Zelllysaten immunpräzipitiert. Die Analyse des isolierten Cx43-Proteins mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie ergab ebenfalls deutliche, positive Signale bei ca. 43 kDa (nichtphosphoryliertes Cx43: P<sub>0</sub>) und oberhalb 43 kDa (phosphoryliertes Cx43) (Abb. 4 - 1).



**Abbildung 4 – 2: Immunpräzipitationen von Cx43 aus IAR20-, WBF344-, U 87 und HeLaK7- Zelllysaten**

Die Zellen wurden vorher mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin metabolisch markiert und das immunpräzipitierte Cx43 nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie detektiert.

In der Literatur wurde zwar beschrieben, dass U 87-Zellen Cx43 exprimieren, aber im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zellen wurden keine Aussagen über die Kopplung der Zellen und die Lokalisation des Connexins gemacht, so dass nicht sicher ist, ob Cx43 in diesen Zellen funktionelle Gap Junctions bildet. Ein Vergleich der Halbwertszeiten von Cx43 in verschiedenen Zellen ist aber nur dann sinnvoll, wenn in Cx43 in allen untersuchten Zellen funktionierende Gap Junction Kanäle bildet. Anhand einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse von U 87- im Vergleich zu HeLaK7-Zellen konnte gezeigt werden, dass Cx43 auch in diesen Zellen an den Kontaktmembranen lokalisiert ist (Abb. 4 - 3) .

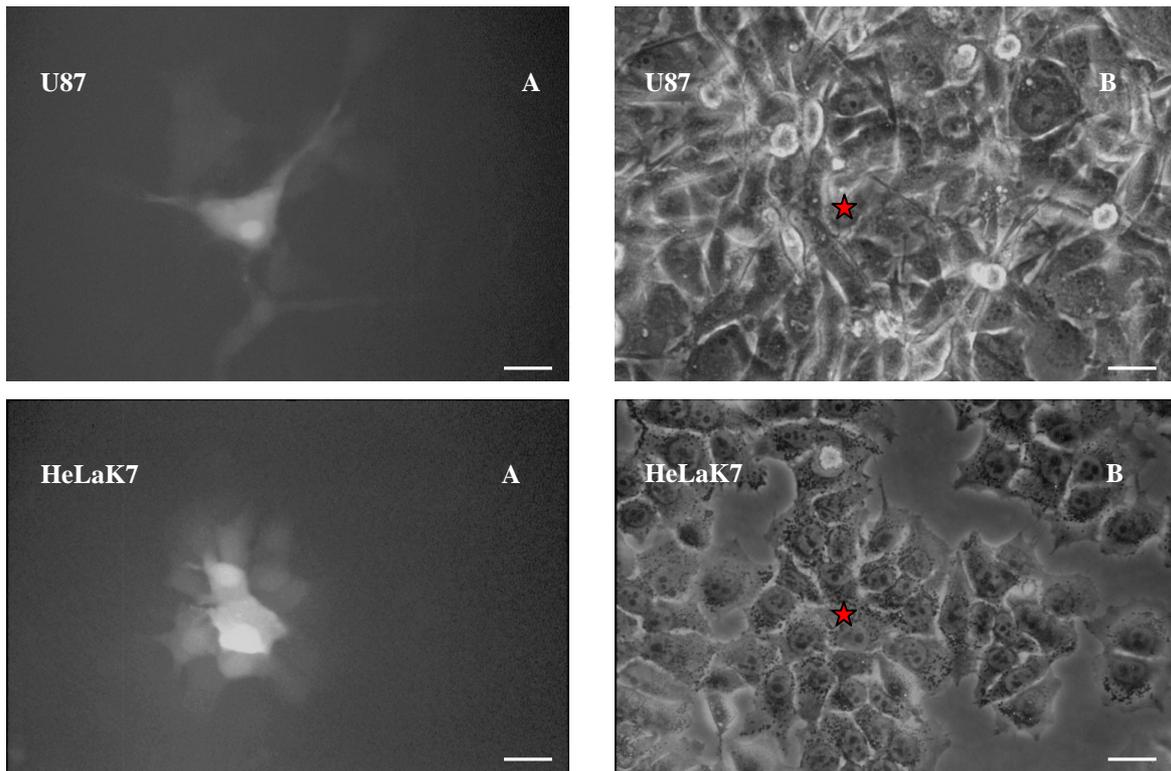


**Abbildung 4 – 3: Immunfluoreszenzanalysen von U87- und HeLaK7- Zellen.**

Die für Connexine typischen Signale an den Kontaktmembranen konnten sowohl bei U87- Zellen als auch bei den HeLaK7-Transfektanten nachgewiesen werden. Cx43 wurde durch den spezifischen Antikörper erkannt und durch Cy3-konjugierten zweiten Antikörper nachgewiesen. Der Balken entspricht ca. 20 µm.

A: Fluoreszenzaufnahmen, B: Phasenkontrastaufnahmen.

Die Funktionalität der Gap Junction Kanäle zwischen U 87-Zellen wurde durch die Ausbreitung von Lucifer Yellow, einem fluoreszierenden Farbstoff, der in eine einzelne Zelle injiziert wurde, nachgewiesen. Die Anzahl benachbarte Zellen erster und zweiter Ordnung, in die der Farbstoffes aus der injizierten Zelle durch Gap Junction Kanäle innerhalb einer bestimmten Zeit gelangt, dient als ein Maß für die Kopplung der Zellen. Mikroinjektion von Lucifer Yellow in U 87-Zellen zeigte, dass auch diese Zellen funktionierende Gap Junction Kanäle besitzen, durch die sich der Farbstoff in die Nachbarzellen der injizierten Zelle ausbreitet (Abb. 4 - 4).



**Abbildung 4 – 4: Mikroinjektionsexperimente mit U87- und HeLaK7- Zellen.**

In eine einzelne U87- oder HeLaK7-Zelle wurde der Farbstoff Lucifer Yellow injiziert und das Ausmaß der Kopplung nach 90 Sekunden beobachtet. Die mit Farbstoff injizierte Zelle ist mit einem roten Stern ★ gekennzeichnet, der Balken entspricht ca. 12 µm.

A: Fluoreszenzaufnahmen, B: Phasenkontrastaufnahmen.

Ein Vergleich von Injektionsexperimenten mit HeLaK7- und U 87-Zellen (Abb. 4 - 4) ergab eine geringere Kopplung für U87-Zellen. Die quantitative Auswertung ist in Tabelle 4 - 2 dargestellt. Die Auszählung der Zellen in die sich der Farbstoff ausgebreitet hatte, erfolgte 90 Sekunden nach Injektion der Zellen mit Lucifer Yellow. Unterschieden wurde zwischen koppelnden Zellen 1. Ordnung, also Zellen, die der injizierten Zelle unmittelbar benachbart waren und solchen 2. Ordnung, die den Zellen 1. Ordnung unmittelbar benachbart waren. Die Angabe koppelnde Zellen 1. Ordnung erfolgt in % der Anzahl der Zellen 1. Ordnung insgesamt, gleiches gilt für die Zellen 2. Ordnung. Die Bestimmung der Ordnung bei U87-Zellen ist relativ schwierig, da die Zellen nicht nur in einer einzelnen Schicht, sondern teilweise auch übereinander wachsen und die Zellen außerdem lange, dünne Ausläufer bilden, die unmittelbaren Kontakt ermöglichen, der nicht unbedingt offensichtlich ist. U 87-Zellen

koppeln etwas schwächer als die HeLa-Cx43-Transfektanten, der injizierte Farbstoff konnte sich aber in den überwiegenden Teil der Nachbarzellen (70 %) ausbreiten.

	<b>Anzahl der Injektionen</b>	<b>Anzahl der gefärbten Zellen insgesamt</b>	<b>koppelnde Zellen 1. Ordnung</b>	<b>koppelnde Zellen 2. Ordnung</b>
<b>U87</b>	20	8 ± 2,8	70 ± 10,5 %	85 ± 13,7 %
<b>HeLaK7</b>	20	13 ± 1,7	96 ± 11,9 %	84 ± 12,7 %

**Tabelle 4 – 2: Mikroinjektionsexperimente mit U 87- und HeLaK7- Zellen.**

In eine einzelne U 87- oder HeLaK7-Zelle wurde der Farbstoff Lucifer Yellow injiziert und das Ausmaß der Kopplung nach 90 Sekunden beobachtet. Die Angaben **Anzahl der Injektionen** und **Anzahl der gefärbten Zellen insgesamt** sind in absoluten Werten angegeben, die **Anzahl der gefärbten Zellen insgesamt** wurde über alle Injektionen gemittelt. Die Angaben **koppelnde Zellen 1. und 2. Ordnung** sind, bezogen auf die Gesamtanzahl der Zellen, die der injizierten Zelle jeweils in 1. und 2. Ordnung benachbart waren, in Prozent angegeben. Alle Werte sind mit Standardabweichung angegeben.

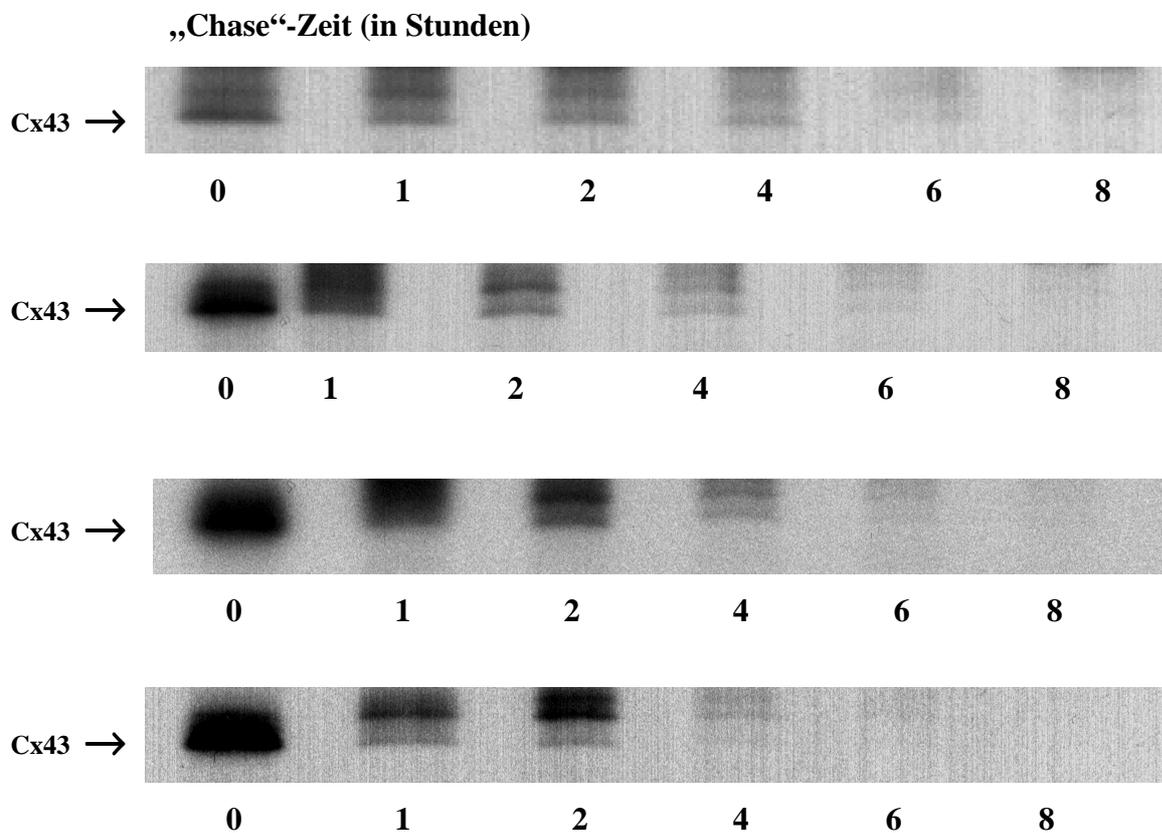
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das in den untersuchten vier Zelllinien exprimierte Cx43-Protein zum Aufbau von funktionellen Gap Junction Kanälen verwendet wird und die Zellen eine gute Kopplung aufweisen.

#### **4.1.2 Bestimmung der Halbwertszeit von Connexin43 in den verschiedenen Zellsystemen**

Proteine werden in der Zelle ständig aus Aminosäurebausteinen synthetisiert und wieder zu diesen abgebaut. Als Maß für die Geschwindigkeit der Degradation dient hierbei die Halbwertszeit der Proteine, also die Zeit nachdem die Hälfte der ursprünglich vorhandenen Menge des Proteins abgebaut wurde. Die Abbaukinetik der Connexine entspricht einem negativen exponentiellen Wachstum.

Die Bestimmung der Halbwertszeit erfolgte mittels „Pulse-Chase“- Experimenten. Hierbei werden die verschiedenen zu 90 bis 95 % konfluenten Zellen zwei Tage nach dem

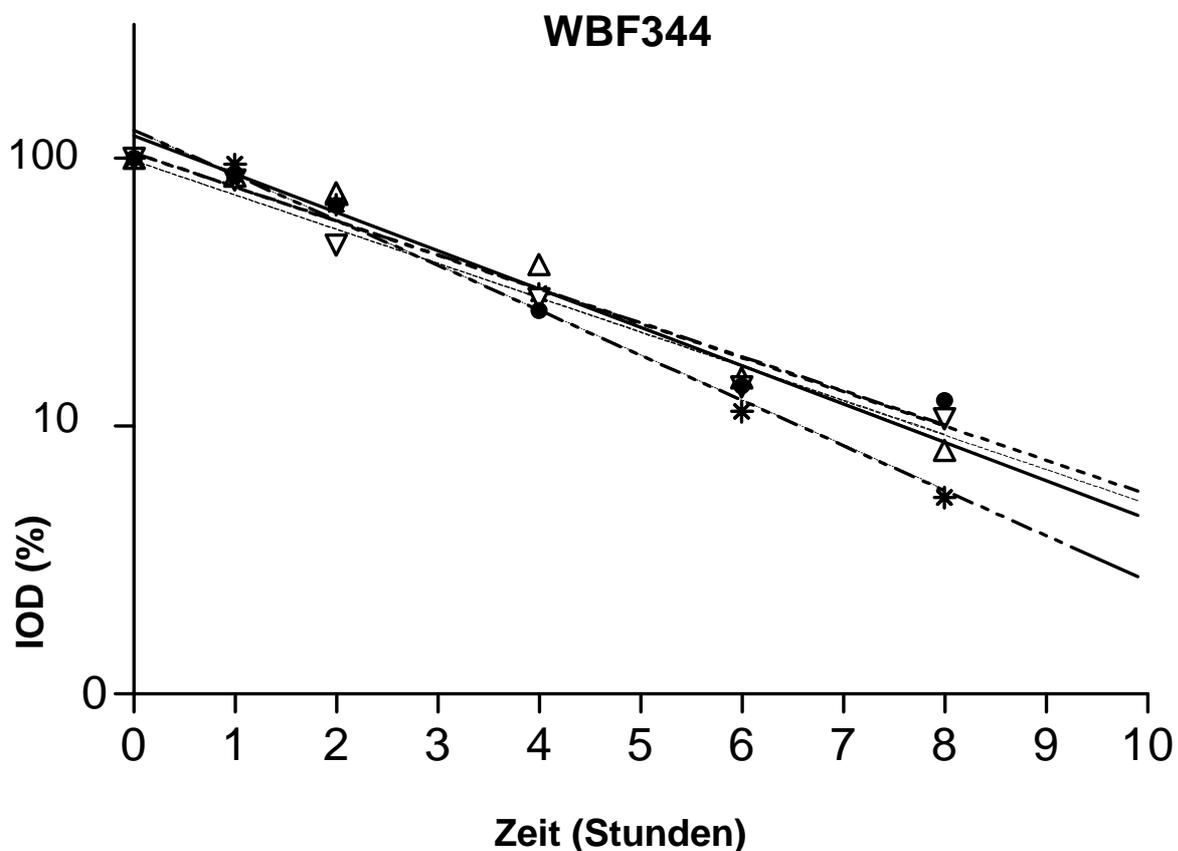
Ausplattieren zuerst für die Dauer einer Stunde mit einem methioninfreien Medium kultiviert (Hungern), dann metabolisch in Gegenwart von  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert („Pulse“). Für die in dieser Zeit von den Zellen synthetisierten Proteine wird auch radioaktiv markiertes Methionin als Baustein genutzt. Anschließend werden die Zellen für verschiedene Zeiten mit Medium, das die doppelte nicht radioaktive Methioninkonzentration enthält, kultiviert („Chase“). Ab jetzt kann der Abbau der radioaktiv markierten Proteine verfolgt werden. Schließlich werden die Zellen lysiert, Cx43 wird immunpräzipitiert und aufgetrennt. Die Autoradiogramme zeigen Signale abnehmender Intensität, die dem geringer werdenden Gehalt an radioaktiv markiertem Protein mit zunehmender „Chase“-Zeit entsprechen (Abbildung 4 – 5 und 4 - 7).



**Abbildung 4 – 5: Beispiel einer „Pulse-Chase“-Experimentreihe von WBF344-Zellen**

Die Zellen wurden für eine Stunde mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert (Pulse), anschließend für verschiedene Zeiten (0, 1, 2, 4, 6, und 8 Stunden) mit nicht radioaktivem Medium kultiviert (Chase) und lysiert. Das aus den Zellysaten immunpräzipitierte Cx43 wurde nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie detektiert. Dargestellt sind die Cx43-Signale der kürzer exponierten Autoradiogrammen von vier unterschiedlichen Experimenten. In die Auswertung miteinbezogen wurden die abnehmenden Signale von Cx43  $\text{P}_0$  und von den phosphorylierten Formen.

Für die verschiedenen Zelllinien wurden meist vier „Pulse-Chase“-Experimente durchgeführt, die Signale nach Autoradiographie (Abbildung 4 – 5 und 4 - 7) mit Hilfe des Programms Imagemaster ausgewertet und mit den Ergebnissen der Proteinbestimmung der Zellysate verrechnet. Von jedem Experiment wurden hierbei verschiedenen lang exponierte Autoradiogramme ausgewertet. Die so erhaltenen prozentualen IOD-Werte (Intensität optischer Dichte der Signale, der zu der „Chase“-Zeit null Stunden gehörige Wert wurde als 100 Prozent gesetzt) wurden unter Verwendung des Programms Graph Pad Prism als Gerade der Form  $\ln y = mx + n$  dargestellt (Abbildung 4 – 6).

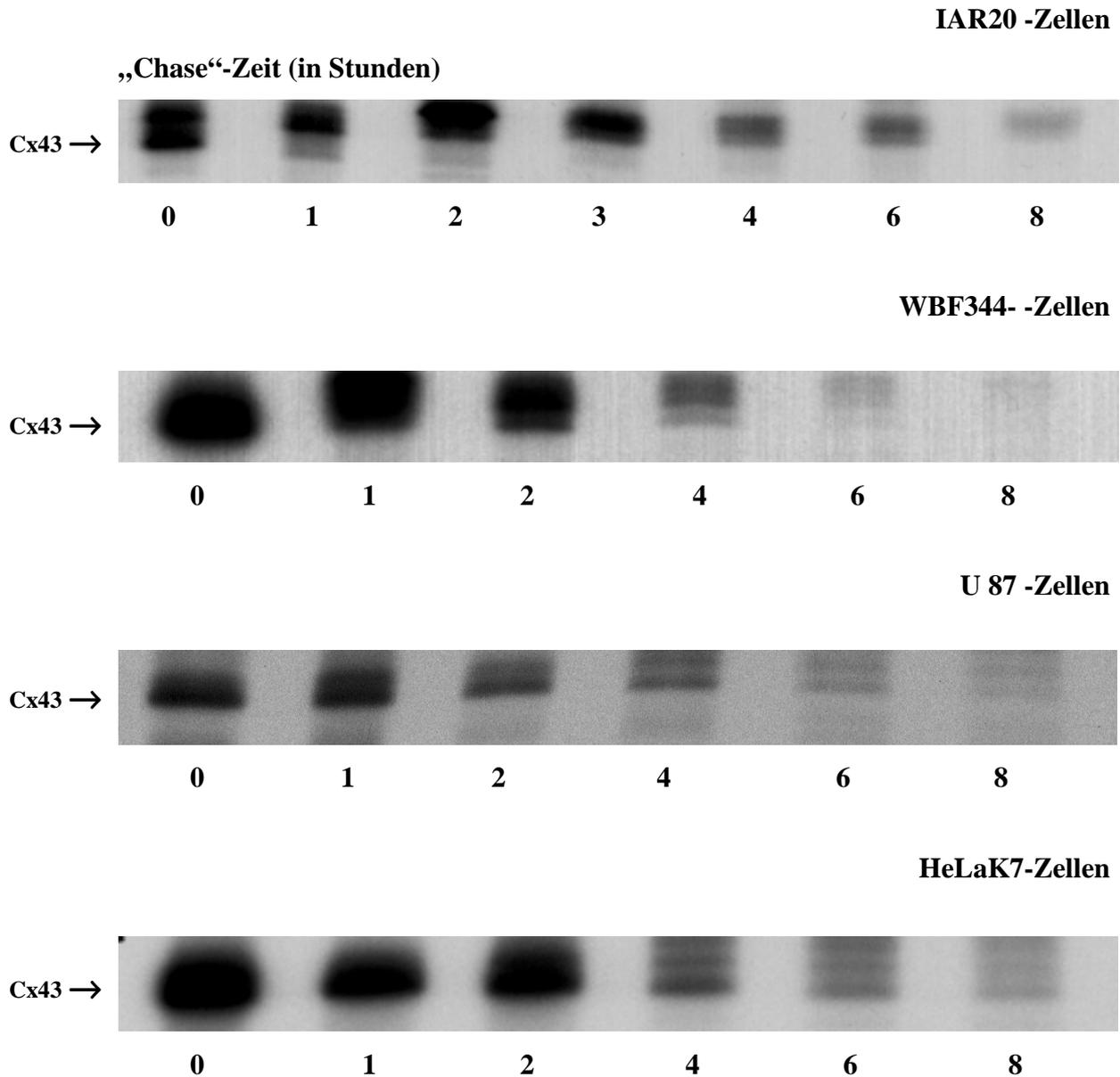


**Abbildung 4 – 6: Beispiel einer Auswertung: „Pulse-Chase“-Experimentreihe von WBF344-Zellen**

Die prozentualen IOD-Werte (y-Achse; der Wert, der zur „Chase“-Zeit null Stunden gehört wurde als 100 Prozent gesetzt) aus vier unterschiedliche Experimenten wurden halblogarithmisch gegen die Zeit (x-Achse) aufgetragen und unter Verwendung des Programms Graph Pad Prism als Gerade der Form  $\ln y = mx + n$  dargestellt.

Die experimentell ermittelten Werte ließen sich alle in guter Näherung als eine Regressionsgerade in dieser Form darstellen (die Korrelationskoeffizienten  $r$  waren stets größer als 0,93, was für fünf oder mehr Werte bedeutet, dass zwischen den Werten mit mindestens 98 % Sicherheit eine lineare Beziehung besteht). Die Funktionsparameter der Geraden wurden durch das Programm Graph Pad Prism berechnet und die Halbwertszeit  $t_{1/2}$

wurde nach der Formel  $t_{1/2} = (\ln 50 - n) / m$  aus der Geradengleichung für den Funktionswert 50 Prozent bestimmt, die Wachstumskonstante der Exponentialfunktion  $k$  ergibt sich aus der Formel  $k = \ln 2 / t_{1/2}$ .



**Abbildung 4 – 7: „Pulse-Chase“-Experimente von IAR20-, WBF344-, U 87 und HeLaK7-Zellen**

Dargestellt sind Autoradiogramme von „Pulse-Chase“-Experimenten zur Halbwertszeitbestimmung von Cx43 in IAR20-, WBF344-, U 87 und HeLaK7-Zellen (abgebildet in dieser Reihenfolge von oben nach unten). Die Zellen wurden für eine Stunde mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin metabolisch markiert (Pulse) anschließend für verschiedene Zeiten (0, 1, 2, 3, 4, 6, und 8 Stunden) mit nicht radioaktivem Medium kultiviert (Chase) und lysiert. Das aus den Zelllysaten immunpräzipitierte Cx43 wurde nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie detektiert. Dargestellt sind stellvertretend die Signale von jeweils einem Experiment der verschiedenen Zelllinien. In die Auswertung miteinbezogen wurden die abnehmenden Signale von Cx43  $P_0$  und von den phosphorylierten Formen.

Die für eine Zelllinie ermittelten Werte stimmten meist sehr gut überein (Tabelle 4 – 3), die Bestimmungen erfolgten insgesamt mit einer guten Reproduzierbarkeit.

Die Auswertung der „Pulse-Chase“-Experimente, die mit den verschiedenen Zelllinien durchgeführt wurden (Abbildung 4 – 7) zeigte, dass die Halbwertszeit von Connexinen keine vom Zelltyp unabhängige Größe ist, sondern von Zelllinie zu Zelllinie variieren kann.

Die Halbwertszeit von Cx43 in den beiden Leberepithelzelllinien, 2,5 Stunden in WBF344- und 2,6 Stunden in IAR20-Zellen, sind sehr ähnlich. Auch die Halbwertszeit in HeLaK7-Zellen weicht mit 2,4 Stunden von diesen Werten kaum ab. Die Halbwertszeit in den Gliomazellen U 87 ist mit 1,9 Stunden aber deutlich kürzer. Die Ergebnisse der Halbwertszeitbestimmungen sind in Tabelle 4 – 3 zusammengefasst.

<b>Zelllinien</b>	<b>Halbwertszeit</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>IAR20</b>	2,5 Stunden	0,1 Stunden
<b>WBF344</b>	2,6 Stunden	0,1 Stunden
<b>U 87</b>	1,9 Stunden	0,1 Stunden
<b>HeLaK7</b>	2,4 Stunden	0,1 Stunden

**Tabelle 4 – 3: Halbwertszeiten.**

Die Halbwertszeiten von Cx43 in IAR20-, WBF344-, U 87- und HeLaK7-Zellen wurden durch Auswertung von „Pulse-Chase“-Experimenten bestimmt. Der angegebene Wert in Stunden ist der Mittelwert aus mehreren durchgeführten Experimenten. Die Werte sind mit Standardabweichung angegeben.

Halbwertszeitbestimmungen eines Connexins können nur dann direkt miteinander verglichen werden, wenn die Bestimmungen in den gleichen Zellen oder zumindest in ähnlichen Zelllinien (wie z.B. WBF344- und IAR20-Zellen) durchgeführt worden sind, da die Halbwertszeiten in verschiedenen Zelllinien deutlich voneinander abweichen können.

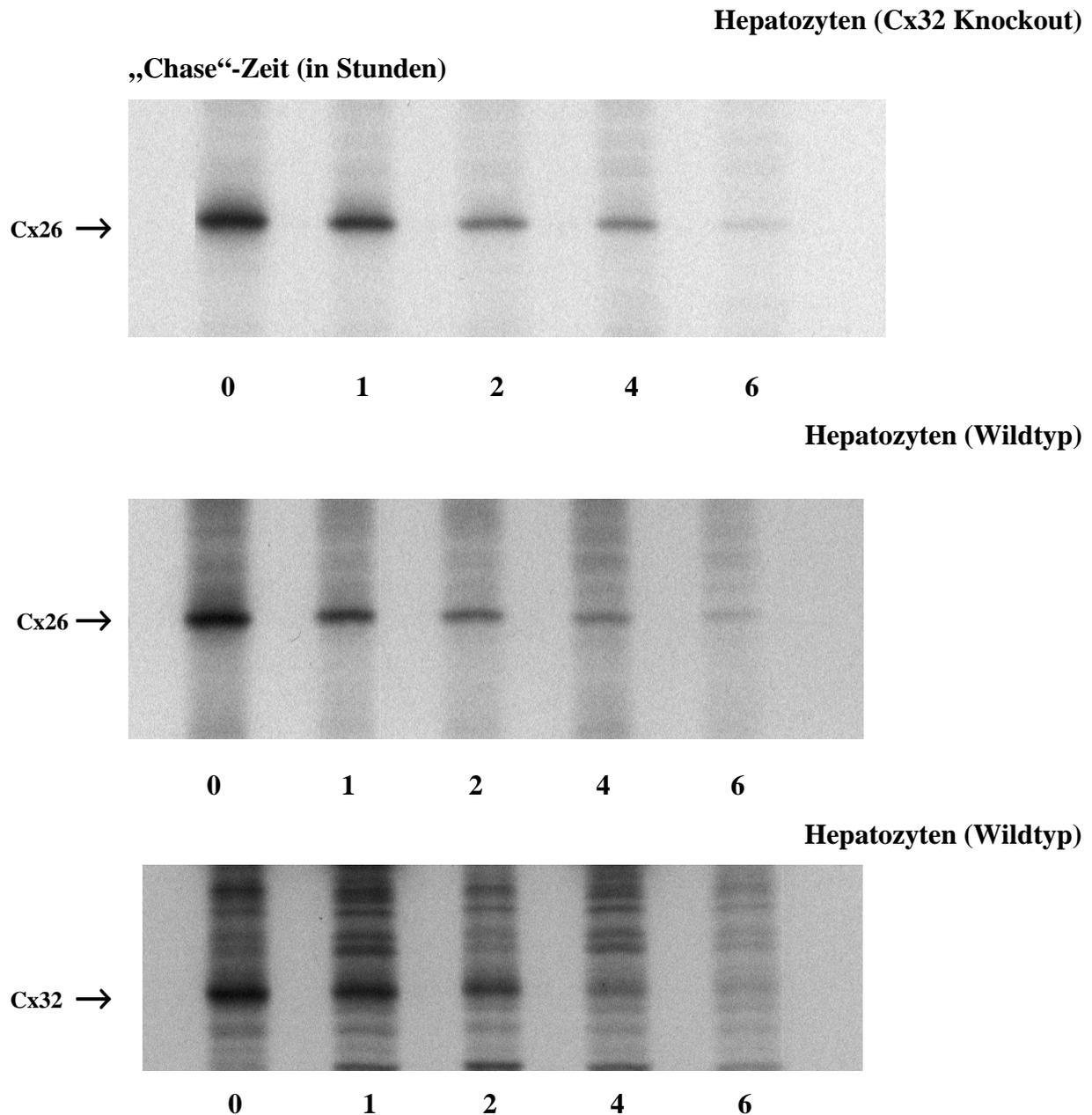
## 4.2 Connexin26 wird in primären Hepatozyten durch die Expression von Cx32 stabilisiert

Die Degradation von Connexinproteinen ist ein möglicher Regulationsmechanismus der Zell-Zell-Kommunikation. Bisher konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit von Connexinen keine zelltypunabhängige, konstante Größe ist, sondern von Zelle zu Zelle variieren kann. Damit es möglich ist, die Kommunikation über den Abbau von Connexinen gezielt zu regulieren, muss es in der Zelle Möglichkeiten zur Modulation der Halbwertszeit geben.

Die Expression von Connexinen erfolgt gewebe- und zelltypspezifisch, wobei die meisten Zelltypen zwei oder mehr verschiedene Connexine aufweisen. Das komplexe Expressionsmuster und insbesondere die gemeinsame Expression von verschiedenen Connexinen in einer Zelle könnte eine Möglichkeit zur Modulation der Degradation darstellen. So ist die exprimierte Menge von Cx26 in Cx32-defizienten primären Maushepatozyten (exprimieren nur Cx26) im Vergleich zu normalen primären Maushepatozyten (exprimieren Cx26 und Cx32) auf circa 50 % reduziert, obwohl die Menge an mRNA in beiden Zellen gleich ist (Nelles et al., 1996). Dieses Ergebnis ist überraschend, da man eher erwarten würde, dass die Menge an Cx26 ansteigt, um den Verlust von Cx32 in der Zelle auszugleichen.

Um festzustellen, ob die molekulare Ursache der Reduktion der Proteinmenge von Cx26 in primären Maushepatozyten eine schnellere Degradationsrate ist, wurde die Halbwertszeit von Cx26 mittels „Pulse-Chase“- Experimenten, analog wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, bestimmt.

Die primären Hepatozyten wurden aus den Lebern von 19 Tage alten Cx32-defizienten und normalen (F1-Generation) Mausembryonen präpariert und drei Tage nach dem Ausplattieren für die „Pulse-Chase“-Experimente eingesetzt. Die Kulturen waren zu diesen Zeitpunkt zu etwa 95 % konfluent. Die Qualität der Präparationen wurde parallel zu jedem „Pulse-Chase“-Experiment durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern spezifisch gegen Cx26 und Cx32 überprüft. Solche Hepatozytenkulturen, die die für funktionell aktive Connexinkanäle typischen, an den Kontaktmembranen lokalisierten Signale aufwiesen, wurden für die Experimente verwendet.



**Abbildung 4 – 8: „Pulse-Chase“-Experimente von primären Hepatozyten der Maus**

Dargestellt sind Autoradiogramme von „Pulse-Chase“-Experimenten zur Halbwertszeitbestimmung von Cx26 in Cx32-defizienten Maushepatozyten, von Cx26 in normalen Maushepatozyten sowie von Cx32 in normalen Maushepatozyten (abgebildet in dieser Reihenfolge von oben nach unten). Die Zellen wurden für eine Stunde mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin metabolisch markiert (Pulse) anschließend für verschiedene Zeiten (0, 1, 2, 4 und 6 Stunden) mit nicht radioaktivem Medium kultiviert (Chase) und lysiert. Das aus den Zelllysaten immunpräzipitierte Cx26 und Cx32 wurde nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie detektiert. Dargestellt sind stellvertretend die Signale von jeweils einem Experiment.

Die Abbildung 4 – 8 zeigt Autoradiogramme von je einem „Pulse-Chase“-Experiment nach Immunpräzipitation und Auftrennung durch SDS-Gelelektrophorese. Die Autoradiogramme zeigen Signale abnehmender Intensität, die dem geringer werdenden Gehalt an radioaktiv markiertem Protein mit zunehmender „Chase“-Zeit entsprechen. Zusätzlich zur Halbwertszeit von Cx26 in Cx32-defizienten und normalen primären Hepatozyten wurde auch die Halbwertszeit von Cx32 in normalen primären Hepatozyten bestimmt.

Die Auswertung der „Pulse-Chase“-Experimente, die mit primären Maushepatozyten durchgeführt wurden (Abbildung 4 – 8) zeigte, dass die Halbwertszeit von Cx26 in Abwesenheit von Cx32 deutlich reduziert ist. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 4 –4 zusammengefasst.

Zellen	Halbwertszeit	Standardabweichung
Normale Hepatozyten	1,8 Stunden (Cx32)	0,1 Stunden
	1,5 Stunden (Cx26)	0,2 Stunden
Cx32-defiziente Hepatozyten	0,9 Stunden (Cx26)	0,1 Stunden

**Tabelle 4 – 4: Halbwertszeiten von Connexinen in Maushepatozyten.**

Die Halbwertszeiten von Cx26 und Cx32 in primären Hepatozyten der Maus wurden durch Auswertung von „Pulse-Chase“-Experimenten bestimmt. Der angegebene Wert in Stunden ist der Mittelwert aus mehreren durchgeführten Experimenten. Die Werte sind mit Standardabweichung angegeben.

In Wildtyphepatozyten beträgt die Halbwertszeit von Cx26 1,5 Stunden, in Cx32-defizienten Zellen hingegen 0,9 Stunden. Dies entspricht einer Verkürzung der Halbwertszeit auf 60 % in Abwesenheit von Cx32. Mit der Verkürzung der Halbwertszeit auf 60 % geht die Reduzierung der Proteinmenge auf ca. 50 % einher. Connexinproteine können sich also gegenseitig gegen Abbau stabilisieren. Die Connexinmenge in den Maushepatozyten wird durch den Abbau, ersichtlich in der veränderten Halbwertszeit, reguliert.

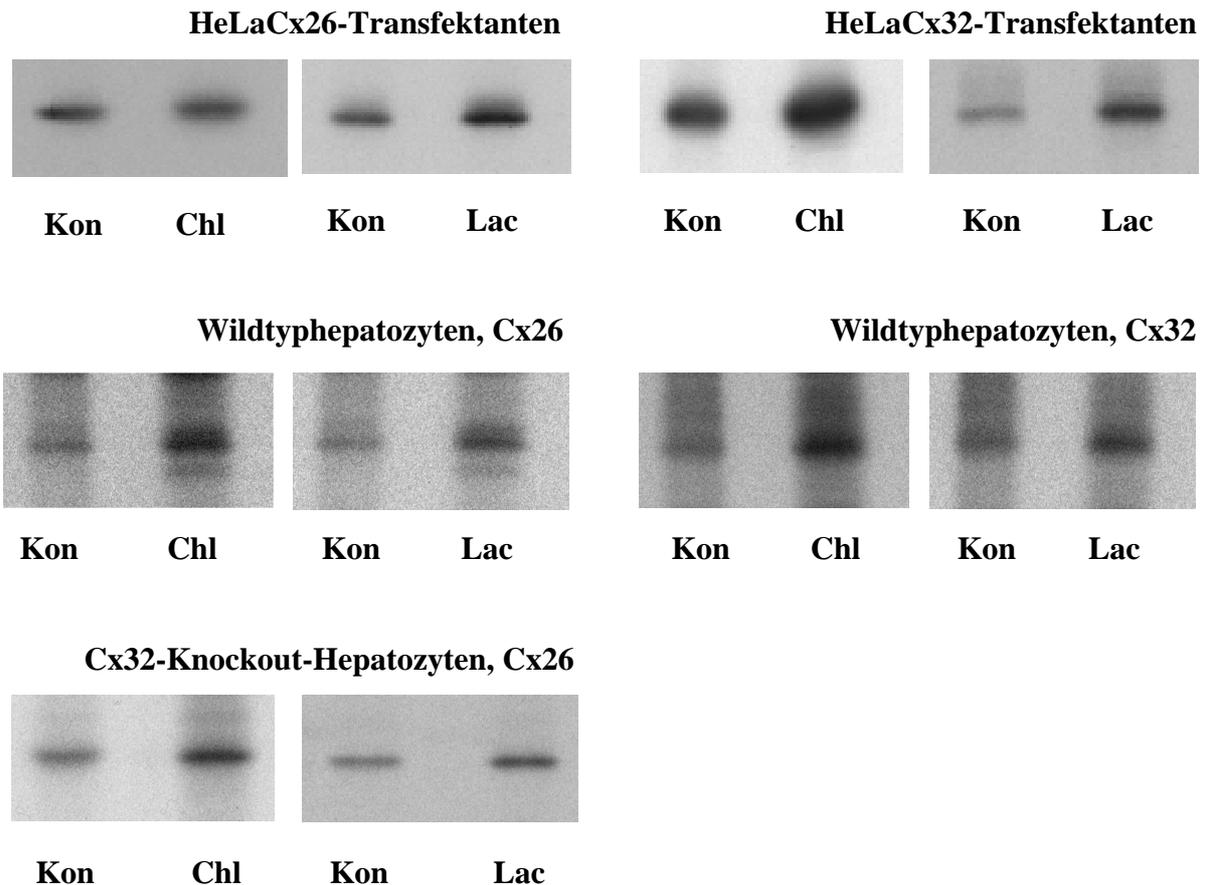
### **4.3 An der Degradation von Connexin26 und 32 sind sowohl Lysosomen als auch Proteasomen beteiligt**

Die meisten Membranproteine werden in den Lysosomen abgebaut (Steinman et al., 1983, Hare, 1990). In jüngster Zeit konnte aber auch für die Degradation einiger Membranproteine eine Beteiligung der Proteasomen nachgewiesen werden (Hicke, 1997). So zeigten Laing et al. (1995, 1997 und 1998), dass beim Abbau des Proteins Cx43 beide Degradationswege, lysosomaler und proteasomaler Abbau, eine Rolle spielen, wobei der proteasomale Abbau für die Zellen größere Bedeutung zu haben scheint. Die Untersuchung der Degradationsmechanismen von Cx26 und Cx32 sollte zeigen, ob dies auch für Cx26 und Cx32 zutrifft. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die Destabilisierung von Cx26 in Cx32-defizienten primären Maushepatozyten sich auf deutliche Unterschiede der Abbaumechanismen von Cx26 in Abwesenheit von Cx32 und koexprimiert mit Cx32 zurückführen lässt.

Neben primären Maushepatozyten aus normalen und Cx32-defizienten Lebern wurden auch HeLa-Transfektanten, die Cx26 (Manthey, Dissertation, 1998) beziehungsweise Cx32 (Elfgang et al., 1995) exprimieren, für die Experimente herangezogen, um allgemeingültigere Aussagen über die Abbaumechanismen der beiden Connexinproteine treffen zu können.

#### **4.3.1 Die Hemmung des lysosomalen und des proteasomalen Abbauweges führen zu einer Steigerung der Proteinmenge von Cx26 und Cx32**

Um festzustellen, ob lysosomaler und/oder proteasomaler Abbau an der Degradation von Cx26 und Cx32 beteiligt sind, wurden Kulturen von primären Maushepatozyten und HeLa-Transfektanten mit spezifischen Hemmern für beide Abbauwege behandelt. Ist einer der beiden Abbauwege an der Degradation der untersuchten Connexine beteiligt, ist eine Steigerung der Menge an Connexinprotein in Anwesenheit des spezifischen Inhibitors zu erwarten.



**Abbildung 4 – 9: Immunpräzipitationen von Cx26 und Cx32 aus mit Lactacystin und Chloroquin inkubierten embryonalen Hepatozyten und HeLa-Transfektanten**

Die Zellen wurden vorher mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin metabolisch markiert und zu einem Teil der Zellen wurde während dieser Zeit Lactacystin oder Chloroquin in das Markierungsmedium gegeben. Cx26 beziehungsweise Cx32 wurde aus dem Lysat immunpräzipitiert. Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Signale mittels Autoradiographie detektiert. Zu jedem Experiment mit Einsatz der Inhibitoren Lactacystin (Lac) oder Chloroquin (Chl) wurde parallel eine Kontrolle (Kon) ohne Inhibitoren durchgeführt und auf das gleiche Gel aufgetragen. Dargestellt sind stellvertretend die Signale von jeweils einem Experiment.

Als Inhibitor des lysosomalen Abbauweges wurde Chloroquin, eine schwache Base, die den pH-Wert in den Lysosomen und späten Endosomen anhebt und so die lysosomalen Enzyme hemmt, verwendet. Lactacystin, das mit einer Untereinheit des Proteasoms reagiert und es so spezifisch inhibiert (Fenteany et al., 1995) wurde zur Hemmung des proteasomalen Abbauweges eingesetzt.

Die Experimente wurden unter ähnlichen Bedingungen (Inkubationszeiten und Konzentrationen der Inhibitoren) durchgeführt, wie die publizierten Experimente zum Abbau von anderen Membranproteinen insbesondere von Cx43 (Laing et al., 1998) und dem epithelialen Natrium-Kanal ENaC (Staub et al., 1997). Die Konzentrationen der Inhibitoren

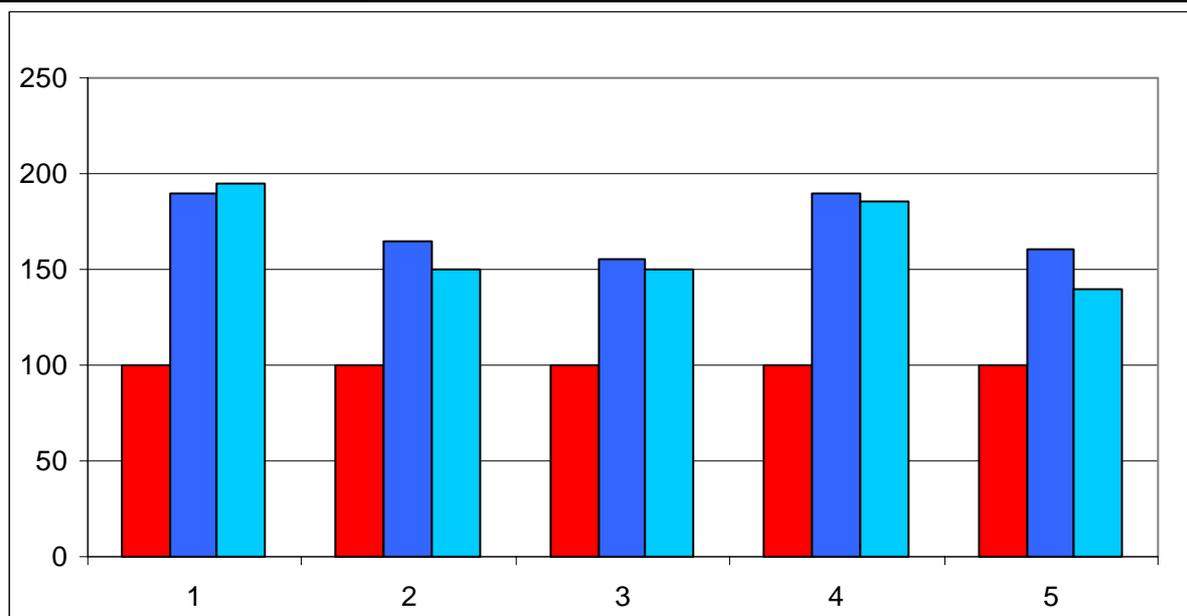
wurden hierbei von Zelltyp zu Zelltyp etwas variiert, um einen maximalen Effekt zu erzielen. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte vergleichende Experimente mit verschiedenen Konzentrationen von Lactacystin und Chloroquin ergaben für HeLa-Transfektanten die wirksamen Konzentrationen von 20  $\mu\text{Mol}$  (Lactacystin) beziehungsweise 240  $\mu\text{Mol}$  (Chloroquin) und für primäre Hepatozyten die wirksamen Konzentrationen von 25  $\mu\text{Mol}$  (Lactacystin) beziehungsweise 300  $\mu\text{Mol}$  (Chloroquin).

Die zu 90 bis 95 % konfluenten Zellen wurden zwei Tage (HeLa-Transfektanten) beziehungsweise drei Tage (primäre Maushepatozyten) nach dem Ausplattieren zuerst für die Dauer einer Stunde mit einem methioninfreien Medium kultiviert, dann *in vivo* mit einem  $^{35}\text{S}$ -haltigen Medium für vier Stunden inkubiert („Pulse“). Während dieser vier Stunden wurde zu den Zellen in Dimethylsulfoxid gelöstes Lactacystin oder als Kontrolle reines Dimethylsulfoxid in das Medium gegeben. Chloroquin, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, beziehungsweise reine Kochsalzlösung als Kontrolle, wurde dem „Pulse“-Medium für die letzten drei Stunden hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und Cx26 beziehungsweise Cx32 wurde aus dem Lysat immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Autoradiogramme (Abbildung 4 – 9) zeigen Signale unterschiedlicher Intensität, die der Menge an Connexinprotein in den Lysaten der verschieden behandelten Zellen entsprechen. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet (Imagemaster), die IOD-Werte der jeweils parallel zu den einzelnen Experimenten durchgeführten Kontrollexperimente (Zugabe von Dimethylsulfoxid oder Kochsalzlösung) als 100 % gesetzt und mit den Werten der Lactacystin- oder Chloroquin-Inkubation verglichen. Die Experimente, Chloroquin/Lactacystin-Inkubation versus Kontrolle, wurden für jeden Zelltyp mindestens dreimal durchgeführt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der einzelnen Experimente ist in Tabelle 4 – 5 zu finden.

Eine Steigerung der Proteinmenge der beiden Connexine konnte sowohl bei Behandlung mit Lactacystin (auf 155 % bis 190 %, verglichen mit der Kontrolle) als auch mit Chloroquin (auf 140 % bis 195 %, verglichen mit der Kontrolle) beobachtet werden. Dies ist ein Hinweis dafür, dass beide Abbauege an der Degradation der beiden Connexine Cx26 und Cx32 beteiligt sind. Die Wirkung von Chloroquin auf die Menge der beiden untersuchten Connexine war bei Hepatozyten und HeLa-Transfektanten meist etwas stärker. Insgesamt ist die Steigerung der Connexinmenge in Anwesenheit von Degradationshemmern in HeLa-Transfektanten (auf 185% bis 195%, verglichen mit der Kontrolle) höher als in Hepatozyten (auf 140 % bis 165 %, verglichen mit der Kontrolle), dies könnte auf die Überexpression von

Cx26 und Cx32 unter der Kontrolle starker Promotoren des verwendeten Expressionsvektors zurückzuführen sein.

Zelltypen	Kontrolle	Chloroquin	Lactacystin
HeLa Cx26 (1)	100 %	190 ± 30 %	195 ± 30 %
Wt Hepatocyten, Cx26 (2)	100 %	165 ± 25 %	150 ± 20 %
Hepatocyten Cx32 ko (3)	100 %	155 ± 10 %	150 ± 20 %
HeLa Cx32 (4)	100 %	190 ± 10 %	185 ± 15 %
Wt Hepatocyten, Cx32 (5)	100 %	160 ± 20 %	140 ± 10 %



**Tabelle 4 – 5: Auswirkung von Lactacystin und Chloroquin auf die Menge an detektierten Cx26 oder Cx32 in Wildtyp(Wt) Hepatozyten, Cx32 Knockout(Ko) Hepatozyten beziehungsweise in HeLa-Transfektanten.**

Metabolisch mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierte Zellen, in An- und Abwesenheit von Degradationshemmern, wurden lysiert und Cx26 beziehungsweise Cx32 immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Intensitäten der durch Autoradiographie detektierten Signale entsprechen der Menge an Connexinprotein in den Lysaten der verschiedenen behandelten Zellen. Die IOD-Werte der jeweils parallel zu den einzelnen Experimenten durchgeführten Kontrolleexperimente wurden als 100 % gesetzt und mit den Werten der Lactacystin- oder Chloroquin-Inkubation verglichen. Die Werte sind mit Standardabweichung angegeben. Zur besseren Übersicht sind die Werte zusätzlich graphisch dargestellt.

Beim Vergleich der Resultate von Cx26, als einzigem Connexin in Cx32-defizienten Hepatozyten und koexprimiert mit Cx32 in normalen Hepatozyten, sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Die Degradationsinhibitoren zeigen weitgehend gleiche Wirkung in den untersuchten Zellen. Sowohl in Cx32-defizienten Hepatozyten als auch in normalen Hepatozyten steigt die Menge an Cx26 in Anwesenheit von Lactacystin auf 155 % an. In Anwesenheit von Chloroquin steigt die Menge an Cx26 in Cx32-defizienten Hepatozyten auf 155 % und in normalen Hepatozyten auf 165 % an, das heißt auch hier wird etwa der gleiche Effekt erzielt. Der Degradationsmechanismus scheint in beiden Zellen der gleiche zu sein und Cx32 kann also Cx26 gegen lysosomal und proteasomal vermittelten Abbau gleichermaßen schützen.

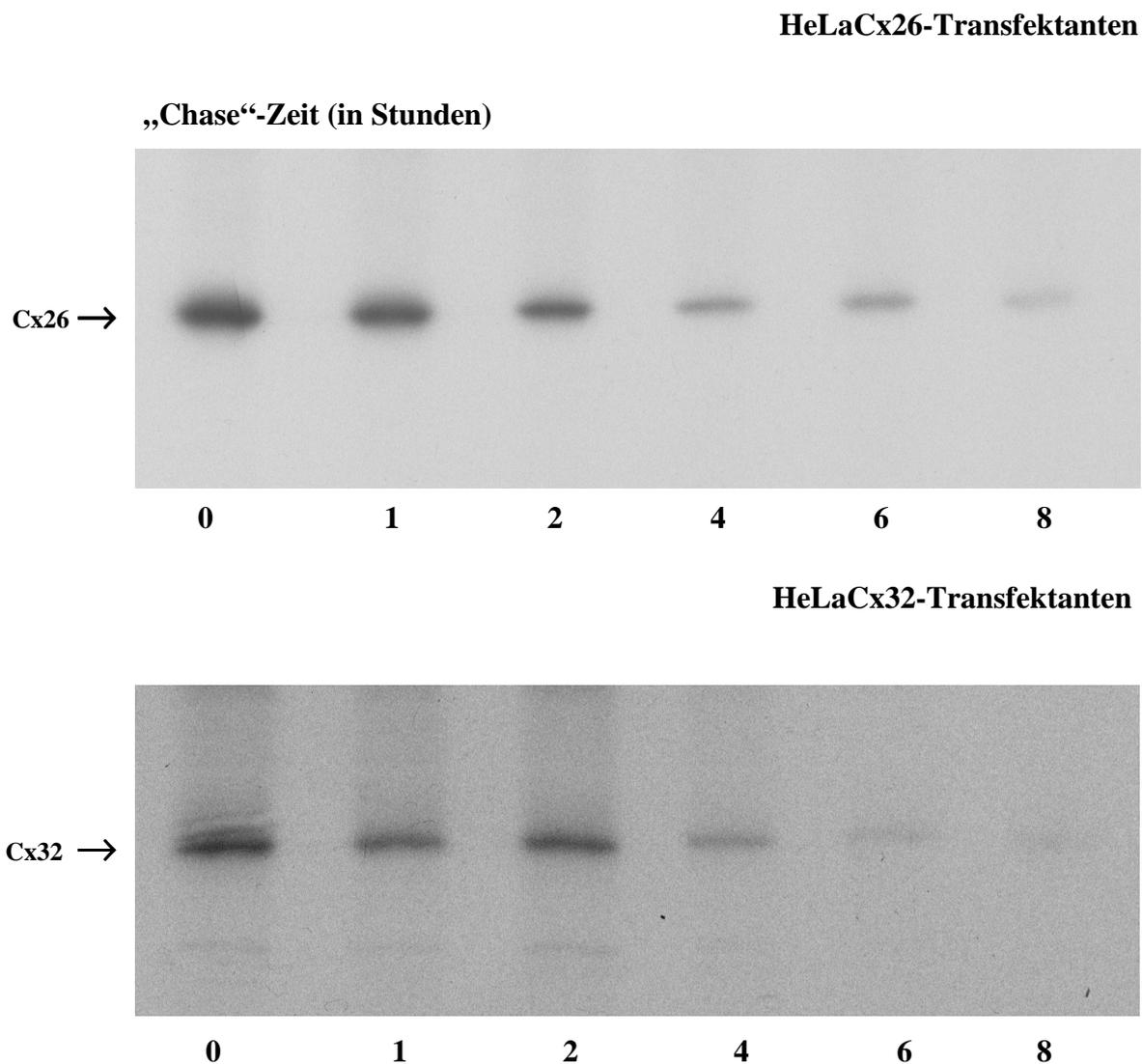
Generell scheinen Proteasomen und Lysosomen in einem etwa gleichen Maße an der Degradation von Cx32 und Cx26 in Hepatozyten und HeLa-Transfektanten beteiligt und der Abbaumechanismus identisch zu sein.

#### **4.3.2 Die Hemmung des lysosomalen und des proteasomalen Abbauweges führt zu einer Verlängerung der Halbwertszeit von Cx26 und Cx32**

Die Steigerung der Menge eines Proteins in Anwesenheit von spezifischen Inhibitoren der lysosomalen Enzym- oder der Proteasomaktivität ist ein Hinweis dafür, dass dieses Protein über diese Wege abgebaut wird. Um auszuschließen, dass die Steigerung der Connexinmenge in den untersuchten Zellen durch einen unbekanntem Sekundäreffekt der eingesetzten Inhibitoren verursacht wird, muss aber dennoch gezeigt werden, dass diese Inhibitoren tatsächlich den Abbau von Cx26 und Cx32 hemmen, sich also die Halbwertszeit durch Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren im Vergleich zur Halbwertszeit, die in Zellkulturen in Abwesenheit von Hemmern bestimmt worden ist, verlängert.

Zunächst wurden die Halbwertszeiten von Cx26 und Cx32 in HeLa-Transfektanten analog wie in Kapitel 4.1.2 und 4.2 beschrieben bestimmt. Die Halbwertszeiten von Cx26 und Cx32 in normalen und Cx32-defizienten Hepatozyten wurden im Kapitel 4.2 bestimmt. Die „Pulse-Chase“-Experimente (Abbildung 4 – 10) ergaben für Cx26 in HeLa-Transfektanten eine Halbwertszeit von 1,9 Stunden und für Cx32 ebenfalls 1,9 Stunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 – 6 zusammengefasst. Ein Vergleich der Halbwertszeiten von Cx26 zeigt, dass die

Degradation von Cx26 in Cx32-defizienten Hepatozyten (Halbwertszeit 0,9 Stunden) ungefähr doppelt so schnell wie in HeLa-Transfektanten (Halbwertszeit 1,9 Stunden) erfolgt. Dagegen ist der Unterschied der Degradationsrate von Cx26 in HeLa-Transfektanten (Halbwertszeit 1,9 Stunden) zu Cx26 in normalen Hepatozyten (Halbwertszeit 1,9 Stunden) wesentlich geringer, obwohl Cx26 in den Hepatozyten, im Gegensatz zu Cx26 exprimiert in HeLa-Transfektanten, durch Cx32 stabilisiert wird. Dies zeigt erneut, dass ein Vergleich der Halbwertszeiten von Connexinen nur in gleichen oder sehr ähnlichen Zellen möglich ist.



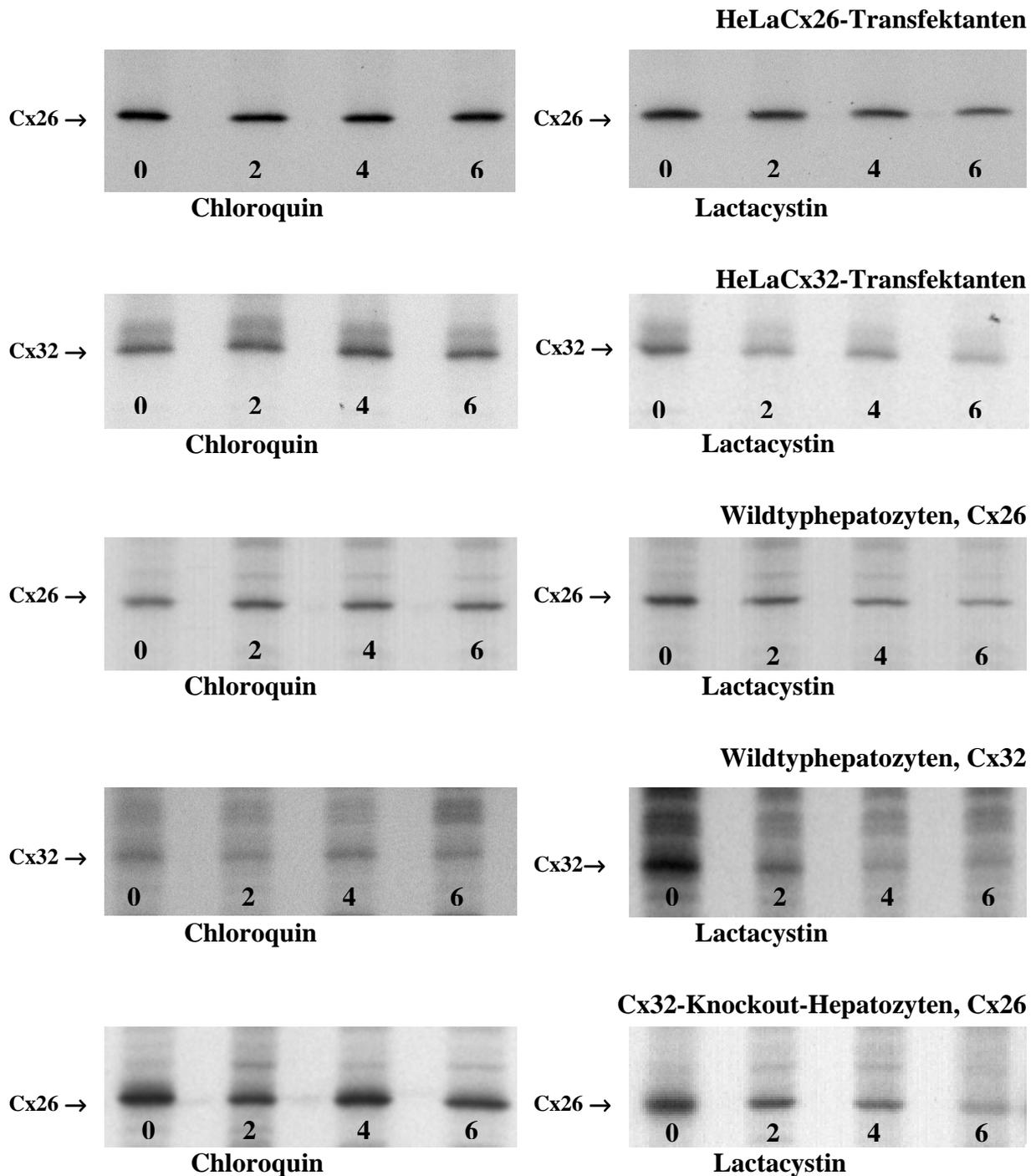
**Abbildung 4 – 10: „Pulse-Chase“-Experimente von HeLaCx26- und HeLaCx32-Transfektanten**

Dargestellt sind Autoradiogramme von „Pulse-Chase“-Experimenten zur Halbwertszeitbestimmung von Cx26 und Cx32 in HeLa-Transfektanten. Die Zellen wurden für eine Stunde mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin metabolisch markiert (Pulse), anschließend für verschiedene Zeiten (0, 1, 2, 3, 4, 6 und 8 Stunden) mit nicht radioaktivem Medium kultiviert (Chase) und lysiert. Das aus den Zelllysaten immunpräzipitierte Cx26 und Cx32 wurde nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie detektiert. Dargestellt sind stellvertretend die Signale von jeweils einem Experiment.

Die „Pulse-Chase“-Experimente zum Nachweis des Einflusses der Inhibitoren Lactacystin und Chloroquin auf die Halbwertszeit von Cx26 und Cx32 in Hepatozyten und HeLa-Transfektanten (Abbildung 4 – 11) wurden unter ähnlichen Bedingungen (Inkubationszeiten der Inhibitoren und „Chase“-Zeiten) wie die publizierten Experimente zum Abbau von Cx43 (Laing et al., 1998) durchgeführt. Die Konzentrationen der Inhibitoren wurden wie in Kapitel 4.3.1 gewählt. Lactacystin und Chloroquin wurden für HeLa-Transfektanten in den Konzentrationen 20  $\mu\text{Mol}$  (Lactacystin) beziehungsweise 240  $\mu\text{Mol}$  (Chloroquin) und für primäre Hepatozyten in den Konzentrationen von 25  $\mu\text{Mol}$  (Lactacystin) beziehungsweise 300  $\mu\text{Mol}$  (Chloroquin) eingesetzt.

Die Halbwertszeitenbestimmungen von Cx26 und Cx32 in HeLa-Transfektanten und primären Maushepatozyten erfolgten mit folgenden Änderungen analog wie in Kapitel 4.1.2 und 4.2 beschrieben: Während des „Chase“ wurde zu den Zellen in Dimethylsulfoxid gelöstes Lactacystin oder Chloroquin, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, hinzugefügt. Die „Chase“-Zeiten betragen 0, 2, 4 und 6 Stunden. Die Autoradiogramme (Abbildung 4 – 11) zeigen Signale, die deutlich langsamer in ihrer Intensität abnehmen als in den Experimenten ohne Zugabe von Inhibitoren (Abbildung 4 – 8 und 4 – 10) beziehungsweise fast gar nicht abnehmen. In Tabelle 4 – 6 sind die Ergebnisse der Halbwertszeitbestimmungen in Anwesenheit der Degradationsinhibitoren zusammengefasst und auch die Werte in Abwesenheit der Inhibitoren erneut aufgeführt.

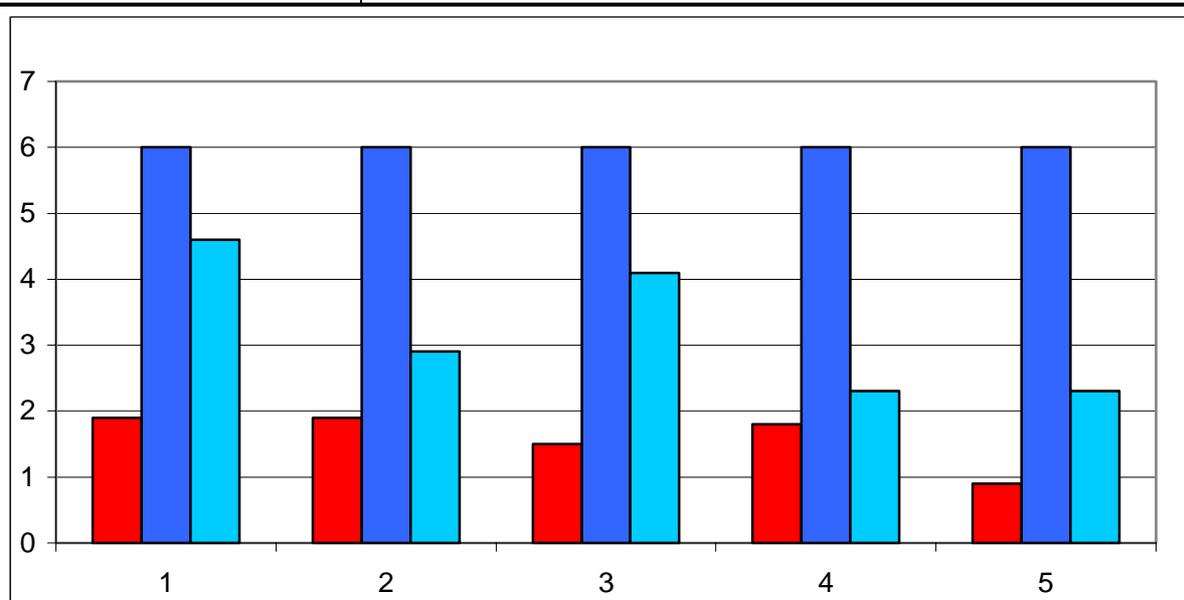
Unter dem Einfluss von Chloroquin verlängern sich die Halbwertszeiten von Cx26 und Cx32 in allen untersuchten Zellen auf über sechs Stunden beziehungsweise es ist während der sechs Stunden „Chase“-Zeit keine Degradation festzustellen. Diese Ergebnisse sind in der Tabelle mit  $> 6$  Stunden eingetragen. Die Veränderungen der Halbwertszeit in Anwesenheit von Lactacystin sind geringer. Dennoch lassen diese Ergebnisse keine Aussage darüber zu, ob der Anteil lysosomaler oder proteosomaler Degradation größer oder wichtiger für den Abbau der Connexine Cx26 und Cx32 ist, da die Wirkungsmechanismen von Lactacystin und Chloroquin unterschiedlich sind. Chloroquin ist eine membrangängige Base, die relativ schnell von Zellen aufgenommen werden kann und schnell zu einer Erhöhung des pH-Werts in den sauren Kompartimenten der Zelle, wie den späten Endosomen und den Lysosomen, führt und dadurch die Reaktionsfähigkeit der Enzyme in den Lysosomen hemmt. Auch Lactacystin kann die Zellmembran durchdringen und reagiert mit den im Zytosol lokalisierten Multienzymkomplex, dem Proteasom. Durch die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Lactacystinmolekül und einem Teil des Proteasoms wird dieses inaktiviert.



**Abbildung 4 – 11: Halbwertszeitbestimmungen von Cx26 und Cx32 aus mit Lactacystin und Chloroquin inkubierten embryonalen Hepatozyten und HeLa-Transfektanten**

Untersucht wurde die Halbwertszeit von Cx26 und Cx32 exprimiert in HeLa-Transfektanten, von Cx26 und Cx32 exprimiert in normalen Hepatozyten und von Cx26 in Cx32 defizienten Hepatozyten (abgebildet in dieser Reihenfolge von oben nach unten) in Anwesenheit von Chloroquin (linke Spalte) und Lactacystin (rechte Spalte). Die Zellen ließ man zunächst eine Stunde hungern, dann wurden sie mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin metabolisch für eine Stunde markiert (Pulse), anschließend für verschiedene Zeiten (0, 2, 4 und 6 Stunden) mit nicht radioaktivem Medium kultiviert (Chase) und lysiert. Während des „Chase“ wurde dem Medium entweder Lactacystin oder Chloroquin beigefügt. Das aus den Zelllysaten immunpräzipitierte Cx26 und Cx32 wurde nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie detektiert. Dargestellt sind stellvertretend die Signale von jeweils einem Experiment.

Zelltypen	Kontrolle <span style="color: red;">■</span>	Chloroquin <span style="color: blue;">■</span>	Lactacystin <span style="color: cyan;">■</span>
HeLa Cx26 (1)	1,9 ± 0,1 Std	> 6 Std	4,6 ± 0,8 Std
HeLa Cx32 (2)	1,9 ± 0,2 Std	> 6 Std	2,9 ± 0,2 Std
Wt Hepatocyten, Cx26 (3)	1,5 ± 0,2 Std	> 6 Std	4,1 ± 0,23 Std
Wt Hepatocyten, Cx32 (4)	1,8 ± 0,1 Std	> 6 Std	2,3 ± 0,3 Std
Hepatocyten Cx32 ko (5)	0,9 ± 0,1 Std	> 6 Std	2,3 ± 0,2 Std



**Tabelle 4 – 6: Auswirkung von Lactacystin und Chloroquin auf die Halbwertszeit von Cx26 oder Cx32 in Wildtyp (Wt) Hepatozyten, Cx32 Knockout (Ko) Hepatozyten und in HeLa-Transfektanten.**

Die Halbwertszeiten von Cx26 und Cx32 in HeLa-Transfektanten, in normalen und Cx32-defizienten Hepatozyten wurden durch Auswertung von „Pulse-Chase“-Experimenten in Anwesenheit von Chloroquin und Lactacystin bestimmt und den Werten ohne Einsatz von Inhibitoren gegenübergestellt. Der angegebene Wert in Stunden ist der Mittelwert aus mehreren durchgeführten Experimenten. Die Werte sind mit Standardabweichung angegeben. Zur besseren Übersicht sind die Werte zusätzlich graphisch dargestellt.

In der Literatur gibt es keine vergleichenden Daten über die Zeitspanne, die die beiden Inhibitoren bis zu ihrer vollen Wirksamkeit brauchen oder das Ausmaß der Inhibition der Degradationsenzyme. Werden Lactacystin und Chloroquin dem „Chase“-Medium von Zellen hinzugefügt, kann also nicht unbedingt davon ausgegangen werden, dass die Wirkung beider Inhibitoren zum gleichen Zeitpunkt und in gleichem Ausmaß einsetzt. Die Ergebnisse der Halbwertszeitverlängerungen in Anwesenheit von Lactacystin oder Chloroquin können also nicht direkt quantitativ miteinander verglichen werden.

Auch unter Einfluss von Lactacystin verlängert sich die Halbwertszeit. Der Einfluss auf die Halbwertszeit von Cx26 ist in Hepatozyten und HeLa-Transfektanten stärker als auf die Halbwertszeit von Cx32: In den HeLa-Transfektanten verlängert sich die Halbwertszeit von Cx26 um den Faktor 2,4, von Cx32 um den Faktor 1,5. In Hepatozyten verlängert sich die Halbwertszeit von Cx26 um den Faktor 2,7 (normale Hepatozyten) beziehungsweise 2,6 (Cx32-defiziente Hepatozyten) und von Cx32 um den Faktor 1,3. Es ist nicht auszuschließen, dass der Anteil an proteasomalem Abbau von Cx26 größer ist als von Cx32. Auch hier zeigt sich, ebenso wie bei der Steigerung der Proteinmenge, dass der Einfluss von Lactacystin auf die Halbwertszeit von Cx26 und Cx32 in den überexprimierenden HeLa-Transfektanten größer ist als in den Hepatozyten, die die Connexine zelltypspezifisch exprimieren. Eine unterschiedliche Auswirkung von Lactacystin auf Cx32 und Cx26 in Hepatozyten ist auch in den HeLa-Zellen zu beobachten, so dass sich die Transfektanten als Modellsystem zur Untersuchung der Degradation ebenfalls eignen.

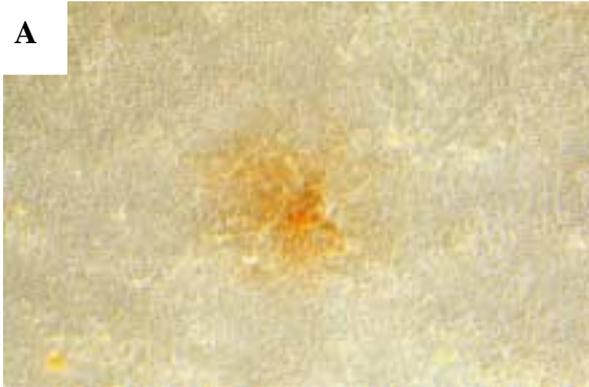
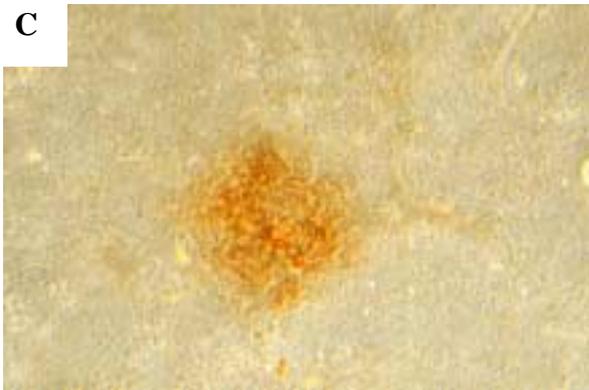
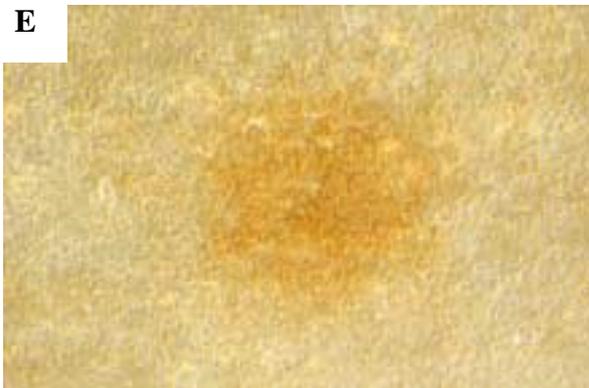
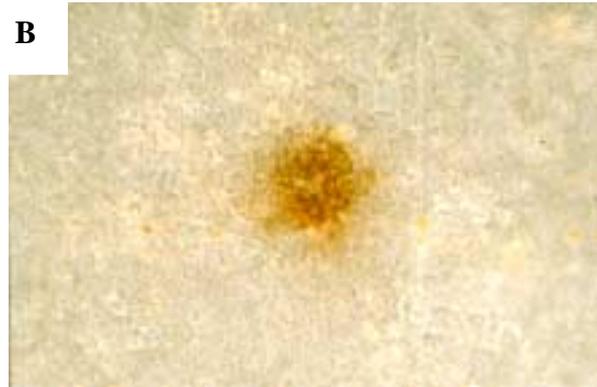
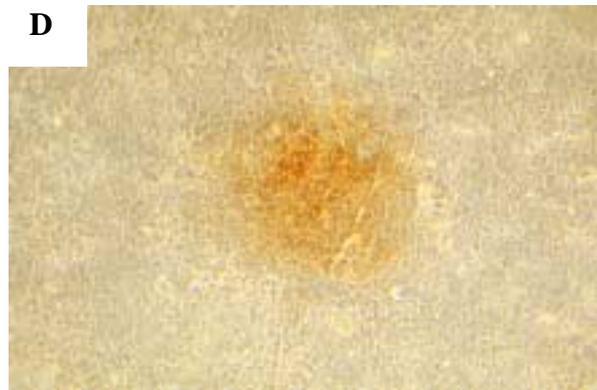
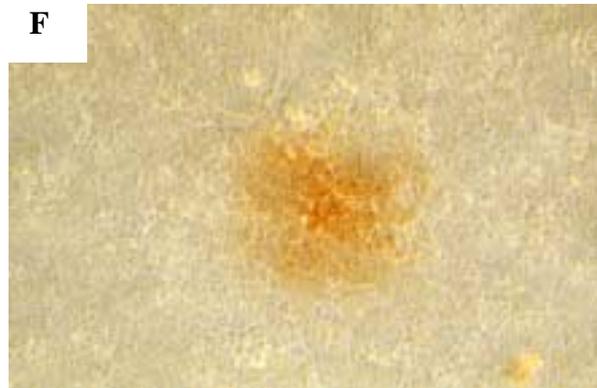
Ein Vergleich der Daten zeigt keine Unterschiede in der Wirkung der Inhibitoren auf Cx26 in normalen oder Cx32-defizienten Hepatozyten. In beiden Zellen wird die Degradation von Cx26 in Anwesenheit von Chloroquin fast vollständig inhibiert und auch in Anwesenheit von Lactacystin verlängert sich die Halbwertszeit um ungefähr den gleichen Faktor. Cx32 scheint Cx26 also gleichermaßen vor durch Lysosomen und Proteasomen vermittelten Abbau schützen zu können.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass sowohl Lactacystin als auch Chloroquin die Halbwertszeit von Cx26 und Cx32 in den untersuchten Zellen verlängert, das heißt beide Inhibitoren vermindern die Degradation der Connexine in den Zellen. Zusammen mit den Daten über die Steigerung der Proteinmenge in Anwesenheit der Inhibitoren weisen die Ergebnisse auf eine Beteiligung der Lysosomen und der Proteasomen am Abbau von Cx26 und Cx32 hin.

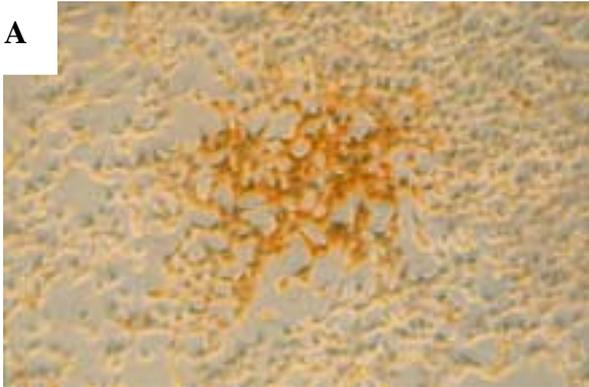
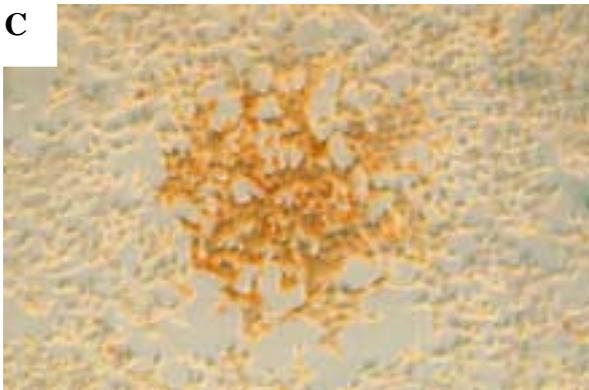
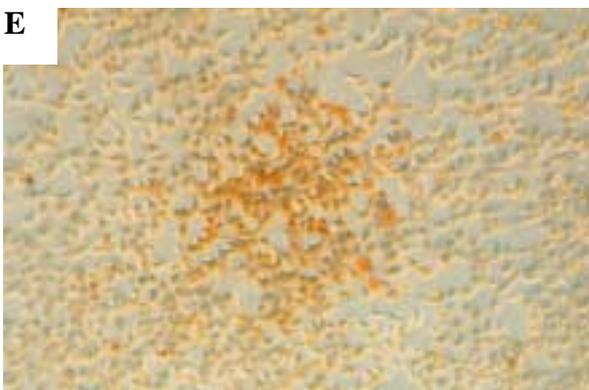
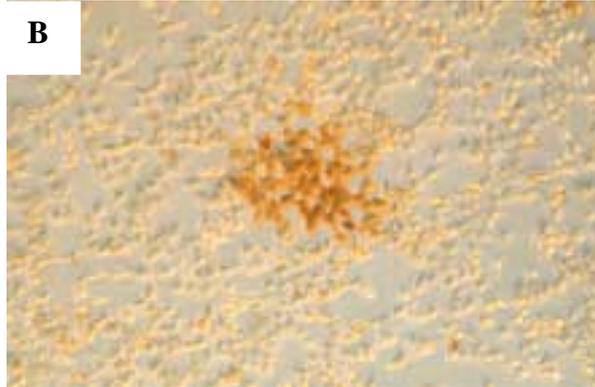
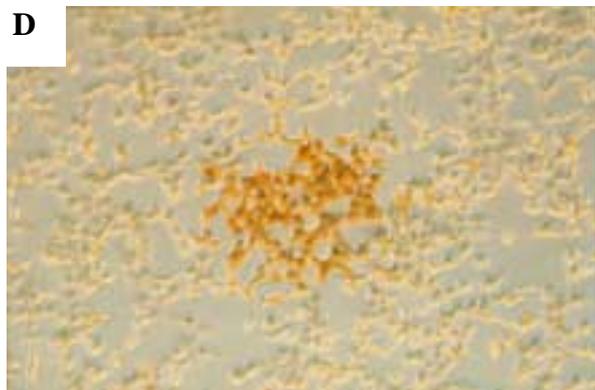
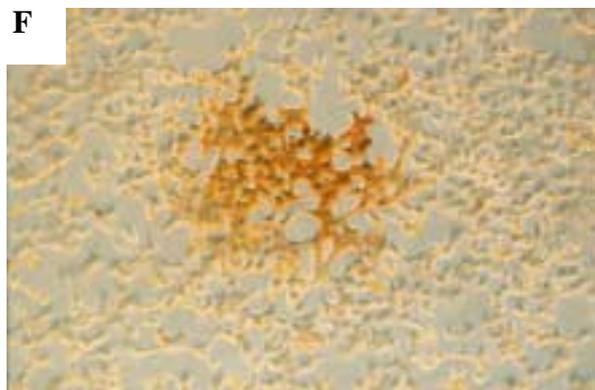
### **4.3.3 Die Hemmung des lysosomalen und des proteasomalen Abbauweges führt zu einer Steigerung der Kopplung**

In den vorangegangenen Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 wurde gezeigt, dass die Degradationsrate, also die Halbwertszeit, die Menge an Cx26 und Cx32 in der Zelle reguliert. Die Verlängerung der Halbwertszeit durch Degradationsinhibitoren führte zu einer Steigerung der Proteinmenge in den untersuchten Zellen. Um einen Zusammenhang zwischen der Funktion der Connexine und der Regulierung der Proteinmenge durch Degradation herzustellen, wurde die Kopplung von Cx26 beziehungsweise Cx32 exprimierenden HeLa-Transfektanten und normalen und Cx32-defizienten embryonalen Maushepatozyten in An- und Abwesenheit von den Inhibitoren Lactacystin und Chloroquin bestimmt. Die Konzentrationen der Inhibitoren wurden wie in Kapitel 4.3.1 gewählt. Lactacystin und Chloroquin wurden für HeLa-Transfektanten in den Konzentrationen 20  $\mu\text{Mol}$  (Lactacystin) beziehungsweise 240  $\mu\text{Mol}$  (Chloroquin) und für primäre Hepatozyten in den Konzentrationen von 25  $\mu\text{Mol}$  (Lactacystin) beziehungsweise 300  $\mu\text{Mol}$  (Chloroquin) eingesetzt.

Die Funktionalität der Gap Junction Kanäle zwischen den untersuchten Zellen wurde durch die Ausbreitung von Neurobiotin, das in eine einzelne Zelle durch Mikroinjektion eingebracht wurde, bestimmt. Die Anzahl der Zellen, in die sich das Vitamin aus der injizierten Zelle durch Gap Junction Kanäle innerhalb einer bestimmten Zeit ausbreitet, dient als ein Maß für die Kopplung der Zellen. Neurobiotin wurde entweder direkt in die Zellen oder nach vierstündiger Inkubation mit Lactacystin beziehungsweise dreistündiger Inkubation mit Chloroquin mikroinjiziert. Nach der Mikroinjektion wurden die Zellen fixiert, Neurobiotin durch eine Farbreaktion (Kapitel 3.9) nachgewiesen und anschließend die braungefärbten Zellen, in die sich Neurobiotin ausgebreitet hatte, ausgezählt. Insgesamt wurden für eine Auswertung mindestens 20 Injektionen durchgeführt, ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Abbildungen 4 – 12 und 4 – 13 zeigen die Ausbreitung von Neurobiotin in normalen und Cx32-defizienten Hepatozyten sowie in HeLa-Transfektanten, die Cx26 beziehungsweise Cx32 exprimieren. Mikroinjektionsexperimente in Anwesenheit von Inhibitoren wurden stets parallel zu einem Kontrollexperiment an einem Tag durchgeführt (Kapitel 3.8.3). Die Kontrollexperimente wurden stets mit Hepatozyten aus der gleichen Präparation oder mit HeLa-Transfektanten, die aus dem gleichen Kulturgefäß beim Splitten ausplattiert wurden, durchgeführt.

**normale Hepatozyten****A****Kontrolle****C****Chloroquin****E****Lactacystin****Cx32-defiziente Hepatozyten****B****Kontrolle****D****Chloroquin****F****Lactacystin****Abbildung 4 - 12: Mikroinjektionsexperimente mit embryonalen Maushepatozyten.**

In normale (linke Spalte) und Cx32-defiziente (rechte Spalte) Hepatozyten wurde Neurobiotin injiziert und das Ausmaß der Kopplung durch die Ausbreitung des Moleküls beobachtet. Dargestellt sind unbehandelte Zellkulturen (Kontrolle, oberste Zeile: A und B) in Vergleich zu mit Chloroquin (Chloroquin, mittlere Zeile: C und D) und Lactacystin (Lactacystin, unterste Zeile: E und F) inkubierten Zellen.

**HeLa-Cx26-Transfektanten****A****Kontrolle****C****Chloroquin****E****Lactacystin****HeLa-Cx32-Transfektanten****B****Kontrolle****D****Chloroquin****F****Lactacystin****Abbildung 4 - 13: Mikroinjektionsexperimente mit HeLa-Transfektanten.**

In mit Cx26 (linke Spalte) und Cx32-transfizierte (rechte Spalte) HeLa-Zellen wurde Neurobiotin injiziert und das Ausmaß der Kopplung durch die Ausbreitung des Moleküls beobachtet. Dargestellt sind unbehandelte Zellkulturen (Kontrolle, oberste Zeile: A und B) in Vergleich zu mit Chloroquin (Chloroquin, mittlere Zeile: C und D) und Lactacystin (Lactacystin, unterste Zeile: E und F) inkubierten Zellen.

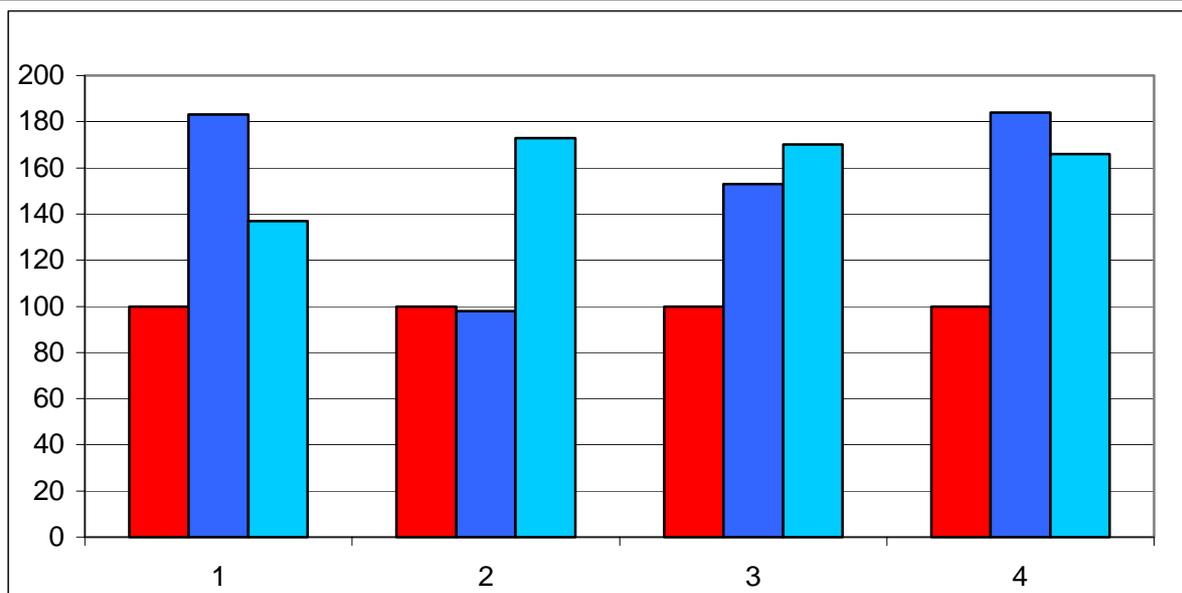
Die durchschnittliche Anzahl koppelnder Zellen des Kontrollexperimentes wurde mit 100 % gleichgesetzt und die Durchschnittswerte der Experimente in Anwesenheit der Inhibitoren entsprechend berechnet. Zur Bestimmung der prozentualen Veränderung der Kopplung wurden mindestens zwei Experimentreihen, bestehend aus einem parallel durchgeführten Kontrollexperiment und einem Experiment in Anwesenheit eines Inhibitors, ausgewertet, für jede Reihe die Kopplungsänderung in Prozent bestimmt und ein Mittelwert der prozentualen Werte mit Standardabweichung berechnet. Die Ergebnisse der Mikroinjektionen sind in Tabelle 4 – 7 zusammengefasst, die durchschnittliche Anzahl koppelnder Zellen aller Kontrollexperimente für einen Zelltyp ist in Klammern angegeben.

In Anwesenheit von Lactacystin stieg die Kopplung insgesamt auf 137 % bis 173 % der Kontrolle an. Die geringste Steigerung (133 %) war bei den mit Cx26 transfizierten HeLa-Zellen zu beobachten. Bei den anderen Zelltypen konnten eine fast gleiche Steigerung der Kopplung um etwa den Faktor 1,7 festgestellt werden. In Kapitel 4.3.2 wurde gezeigt, dass die Auswirkung von Lactacystin auf die Halbwertszeit bei den Hepatozyten größer war als bei den HeLa-Transfektanten. Dies konnte hier zwar auch für die ausschließlich Cx26 exprimierenden Cx32-defizienten Hepatozyten (Steigerung der Kopplung auf 166 %) und HeLa-Cx26-Transfektanten (Steigerung der Kopplung auf 137 %) beobachtet werden, die Kopplung von Cx32-Transfektanten und Wildtyp Hepatozyten jedoch steigt in Anwesenheit von Lactacystin auf etwa den gleichen Wert (173 beziehungsweise 170 %) an. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Lactacystin in allen untersuchten Zellen einen deutlichen Anstieg der Kopplung bewirkte. Die Hemmung der proteasomal vermittelten Degradation durch Lactacystin führt somit zu einer Steigerung der Menge an funktionellem Cx26- und Cx32-Protein.

Auch Chloroquin verursacht in drei der untersuchten Zelltypen eine Steigerung der Kopplung. In Anwesenheit von Chloroquin ist in HeLa-Cx26-Transfektanten und in Cx32-defizienten Hepatozyten ein Anstieg der Kopplung in etwa gleicher Größenordnung (183 % beziehungsweise 184 %, zusammengefasst in Tabelle 4 – 7) zu beobachten. Die Zunahme der Kopplung von normalen Hepatozyten ist hingegen deutlich geringer (153 %) und in HeLa-Cx32-Transfektanten ist kein Anstieg der Kopplung mehr festzustellen. Die Kopplung in diesen Zellen wurde als 98 % der Kopplung von Kontrollkulturen bestimmt. Dies scheint im Widerspruch zu der deutlich erhöhten Menge an Cx32-Protein (siehe Kapitel 4.3.1) und der stark verlängerten Halbwertszeit von Cx32 (siehe Kapitel 4.3.2) in HeLa-Transfektanten zu stehen. Während die Hemmung des lysosomalen Abbaus durch Chloroquin scheinbar keinen Effekt auf die Kopplung von Zellen, die ausschließlich Cx32 exprimieren, hat, ist ein

deutlicher Effekt bei Zellen, die zusätzlich Cx26 exprimieren, zu beobachten. Die Auswirkung auf die Kopplung von Cx32-defiziente Hepatozyten und HeLa-Cx26-Transfektanten ist nochmals größer.

Zelltypen	Kontrolle	Chloroquin	Lactacystin
HeLa Cx26 (1)	100 % (137)	183 % ± 6 %	137 % ± 8 %
HeLa Cx32 (2)	100 % (70)	98 % ± 11 %	173 % ± 15 %
Wt Hepatozyten (3)	100 % (85)	153 % ± 18 %	170 % ± 1 %
Hepatozyten Cx32 ko (4)	100 % (47)	184 % ± 27 %	166 % ± 14 %



**Tabelle 4 – 7: Auswirkung von Lactacystin und Chloroquin auf die Kopplung vermittelt von Cx26- und oder Cx32-Kanälen in Wildtyp (Wt) Hepatozyten, Cx32 Knockout (Ko) Hepatozyten beziehungsweise in HeLa-Transfektanten.**

Die durchschnittliche Anzahl der koppelnden Zellen (HeLaCx26-, Cx32-Transfektanten, normale und Cx32-defizienten Hepatozyten) wurden durch Auswertung von Neurobiotin-Mikroinjektion und anschließender Farbreaktion bestimmt. Die Werte in Anwesenheit von Chloroquin oder Lactacystin wurden mit den Werten der Kontrolle experimente ohne Einsatz von Inhibitoren verglichen. Die Werte der Kontrolle experimente wurden 100 % gesetzt und die anderen Werte entsprechend in prozentuale Werte umgerechnet. Die angegebenen Werte in % sind die Mittelwerte der prozentualen Werte, die sich aus den verschiedenen Experimentenreihen ergaben. Diese Werte sind mit Standardabweichung angegeben. Zur besseren Übersicht sind die Werte zusätzlich graphisch dargestellt.

In Anwesenheit von Chloroquin scheint sich funktionell aktives Cx26-Protein in Zellen anzureichern. Dieses angereicherte Protein führt in HeLa-Cx26-Transfektanten, Cx32-defizienten Hepatozyten und auch in normalen Hepatozyten zu einer deutlichen Steigerung der Kopplung, wobei in normalen Hepatozyten die Steigerung der Kopplung zwischen den Werten für Cx26 allein-exprimierenden Zellen und den HeLa-Cx32-Transfektanten liegt, die Kopplungssteigerung also durchaus nur durch Cx26 vermittelt sein kann. Cx32-Protein, welches sich in mit Chloroquin inkubierten Zellen anreichert, erscheint funktionell inaktiv zu sein beziehungsweise weniger zur Kopplung beitragen zu können.

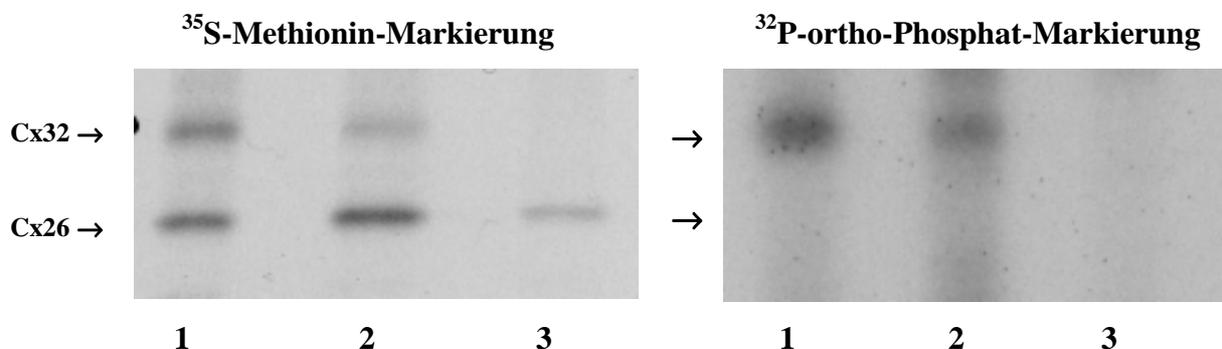
Die Hemmung der lysosomalen Degradation durch Chloroquin hat auf Cx26 und Cx32 verschiedene Auswirkungen. Es könnte also entweder einen unterschiedlichen Mechanismus des lysosomal vermittelten Abbaus für Cx26 und Cx32 geben oder der Mechanismus ist für beide Proteine gleich, so dass die unterschiedlichen Eigenschaften der Proteine den Unterschied in der Auswirkung der Hemmung der lysosomalen Degradation bedingen. Ein unterschiedlicher Mechanismus dürfte, da die beiden Proteine sehr ähnlich sind, eher unwahrscheinlich sein. Ein Unterschied der beiden Proteine, der möglicherweise das unterschiedliche Verhalten erklären könnte, ist der Phosphorylierungszustand. Cx32 ist phosphoryliert, während Cx26 keine Phosphorylierung aufweist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der letzten drei Kapitel, dass die Modulation der Degradation ein möglicher Mechanismus zur Regulation der Kopplung in der Zelle ist. Eine Inhibition lysosomal und proteasomal vermittelter Degradation erhöht durch eine Verlängerung der Halbwertszeit der Proteine die Menge an Connexin in der Zelle. Ist diese Erhöhung der Proteinmenge durch Inkubation mit Lactacystin verursacht, ist stets auch eine erhöhte Kopplung zu beobachten. Das in diesem Fall in den Zellen angereicherte Protein ist also funktionell aktiv und trägt zur Kopplung zwischen den Zellen bei. Ein solcher Zusammenhang konnte auch für mit Chloroquin inkubierte Zellen, die Cx26 exprimieren, gezeigt werden. Für HeLa-Cx32-Transfektanten konnte aber in Anwesenheit von Chloroquin keine Steigerung der Kopplung nachgewiesen werden. Es liegt nahe, dass das in den Zellen angereicherte Cx32 in einer Form vorliegt, die funktionell inaktiv ist.

#### 4.3.4 Die Hemmung des lysosomal vermittelten Abbaus durch Chloroquin führt zu einer Anreicherung von Cx32 in dephosphorylierter Form

Bei allen bisher untersuchten Connexinen, mit Ausnahme von Cx26, konnte eine posttranslationale Phosphorylierung nachgewiesen werden. So konnte zum Beispiel die Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation unter anderem für Cx32, Cx40, Cx43 (Traub et al., 1994), Cx31 (Traub et al., 1995) und Cx45 (Butterweck et al., 1994a) gezeigt werden. In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten embryonalen normalen und Cx32-defizienten Maushepatozyten und HeLa-Transfektanten konnte ebenfalls phosphoryliertes Cx32 nachgewiesen werden, nicht aber phosphorylierte Formen von Cx26.

Die Abbildungen 4 – 14 und 4 – 15 zeigen den Nachweis von phosphoryliertem Cx32 mittels Immunpräzipitation des Proteins aus Lysaten von mit  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat radioaktiv markierten Hepatozyten und HeLa-Transfektanten. Die Markierungen wurden wie in vorigen Kapiteln und in Kapitel 3.8.4 beschrieben durchgeführt. Die Markierungen mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin und  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat wurden stets parallel am gleichen Tag durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit der Signalintensitäten zu gewährleisten.

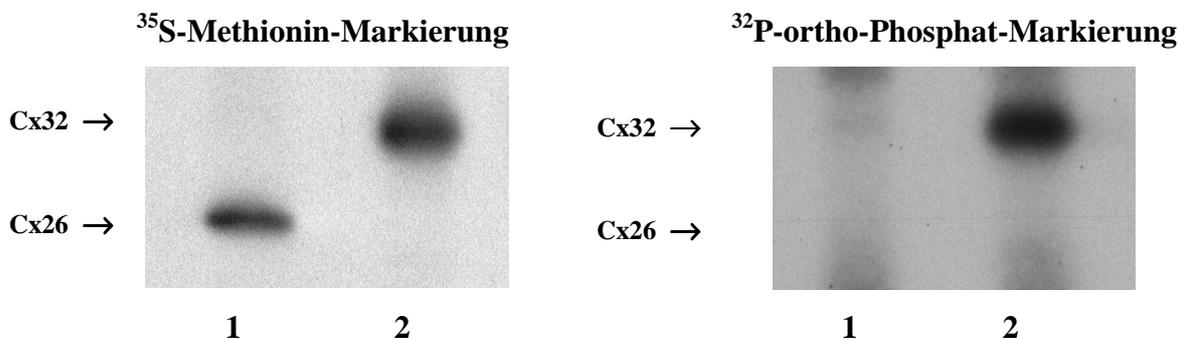


**Abbildung 4 - 14: Immunpräzipitationen von Cx32 und Cx26 aus Zelllysaten von normalen und Cx32-defizienten Hepatozyten**

Die Zellen wurden vorher mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin (linke Spalte) oder  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat (rechte Spalte) metabolisch markiert und Cx32 (1) beziehungsweise Cx26 (2 und 3) aus den Lysaten der normalen (1 und 2) und Cx32-defizienten (3) Hepatozyten immunpräzipitiert. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Connexine mittels Autoradiographie detektiert.

Bei Immunpräzipitationen aus dem Lysat normaler Hepatozyten von Cx32 oder Cx26 mit spezifischen Antikörpern wird das jeweils andere Connexin ko-immunpräzipitiert. So sind in der in Abbildung 4 – 14 gezeigten Immunpräzipitation aus  $^{35}\text{S}$ -markierten normalen

Hepatozyten jeweils zwei Banden, Cx32 und Cx26, zu sehen. Entsprechend zeigen beide Immunpräzipitate, mit Antikörper gegen Cx26 und Cx32, der mit radioaktivem  $^{31}\text{P}$ -ortho-Phosphat markierten normalen Hepatozyten die Bande des phosphorylierten Cx32. Die Lysate der Cx32-defizienten Zellen weisen diese Cx32-Bande nicht auf. Die Immunpräzipitation der mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierten Cx32-defizienten Hepatozyten zeigt nur die Cx26-Banden. Die Immunpräzipitation der  $^{32}\text{P}$ -markierten Cx32-defizienten Hepatozyten zeigt keine Bande. Weder aus dem Lysat normaler noch Cx32-defizienter Hepatozyten konnte phosphoryliertes Cx26 immunpräzipitiert werden, obwohl durch die Immunpräzipitation der  $^{35}\text{S}$ -markierten Lysate Cx26-Protein eindeutig nachgewiesen werden konnte. Die Abwesenheit der Cx26 Bande in den mit  $^{32}\text{P}$ -markierten Zellen lässt darauf schließen, dass Cx26 sowohl in normalen als auch in Cx32-defizienten Hepatozyten nicht phosphoryliert wird.

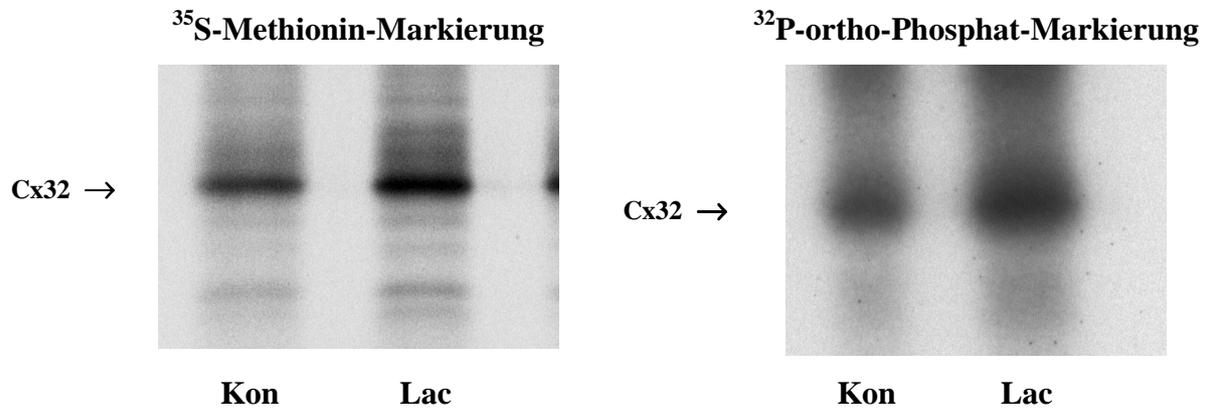


**Abbildung 4 - 15: Immunpräzipitationen von Cx32 und Cx26 aus Zelllysaten von Cx26 und Cx32 exprimierenden HeLa-Transfektanten**

Die Zellen wurden vorher mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin (linke Spalte) oder  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat (rechte Spalte) metabolisch markiert und Cx26 (Spur 1) beziehungsweise Cx32 (Spur 2) aus den Lysaten von mit Cx26 (1) oder Cx32 (2) transfizierten HeLa-Zellen immunpräzipitiert. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Connexine mittels Autoradiographie detektiert.

Auch in dem Lysat der Cx26 exprimierenden HeLa-Zellen (siehe Abbildung 4 – 15) ließ sich kein phosphoryliertes Cx26 nachweisen. Eine für Cx32 spezifische Bande konnte in dem Lysat nach  $^{35}\text{S}$ -Methionin-Markierung und  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat-Markierung nachgewiesen werden. Cx32 liegt also in HeLa-Transfektanten und in normalen Hepatozyten in phosphorylierter Form vor. Die beiden etwa gleich starken Banden des mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin oder mit  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat markierten Proteins in den mit Cx32 transfizierten HeLa-Zellen sind beide schon nach relativ kurzer Expositionszeit von zwei Tagen deutlich im Autoradiogramm zu erkennen. Insgesamt sind die Intensitäten der Connexin-Banden in den Lysaten der überexprimierenden HeLa-Transfektanten wesentlich stärker als die Intensitäten

der Banden in den Hepatozytenlysaten. Die Untersuchungen zur Auswirkung der Hemmung der Degradation durch Inkubation mit Chloroquin und Lactacystin wurde deshalb mit HeLa-Cx32-Transfektanten durchgeführt. Die Inkubation von Cx32-HeLa-Transfektanten mit Lactacystin führt zu einer deutlichen Steigerung der Proteinmenge an Cx32.

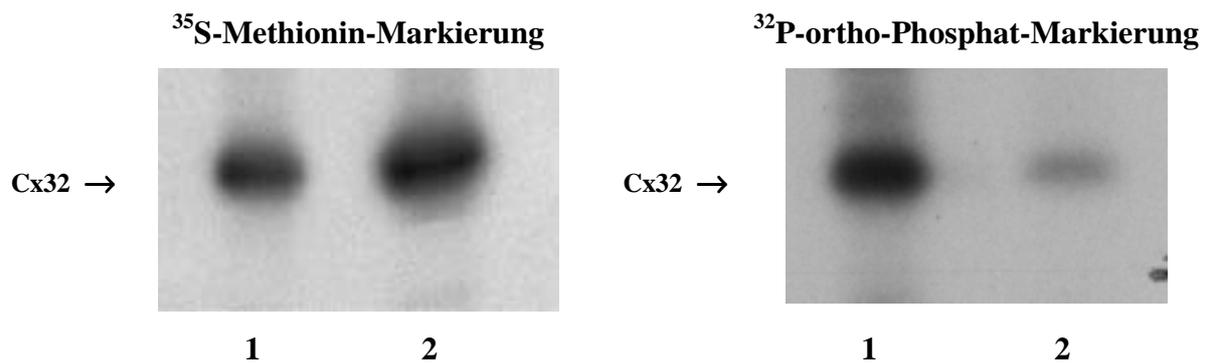


**Abbildung 4 - 16: Immunpräzitationen von Cx32 aus Zelllysaten von Cx32 exprimierenden HeLa-Transfektanten in An- und Abwesenheit von Lactacystin**

Die Zellen wurden mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin (linke Spalte) oder  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat (rechte Spalte) metabolisch markiert. Während des „Pulse“ wurde die eine Hälfte der Zellen mit Lactacystin inkubiert (Lac), die anderen Zellen dienen als Kontrolle (Kon). Cx32 wurde aus den Lysaten immunpräzipitiert und nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie detektiert.

Abbildung 4 – 16 zeigt eine Zunahme der Signalintensität des aus den Lysaten von HeLa-Transfektanten immunpräzipitierten Cx32 in Anwesenheit von Lactacystin im Vergleich zur Kontrolle der mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin und mit  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat markierten Zellen. Mit der Zunahme der Menge an Cx32-Protein in mit Lactacystin behandelten Zellen, repräsentiert durch die Steigerung der Signalintensität nach  $^{35}\text{S}$ -Methionin-Markierung, geht eine Zunahme des phosphorylierten Cx32-Proteins, repräsentiert durch die Steigerung der Signalintensität nach  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat-Markierung, einher. Es scheint, dass das Cx32, welches sich bei der Hemmung des proteasomal vermittelten Abbaus durch Lactacystin in der Zelle anreichert, ebenso phosphoryliert vorliegt, wie Cx32 in unbehandelten Zellen. Dafür spricht zusätzlich, dass außer der Steigerung der Proteinmenge auch eine Steigerung der Kopplung in Lactacystin-behandelten Zellen erreicht wird (siehe Kapitel 4.3.3).

Im Gegensatz zu diesem Ergebnis führt die Steigerung der Proteinmenge an Cx32 nicht zu einer Steigerung von phosphoryliertem Cx32. In Abbildung 4 – 17 sind die Signale von Immunpräzitationen aus Lysaten von mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin und  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat markierten HeLa-Cx32-Transfektanten in An- und Abwesenheit von Chloroquin dargestellt.



**Abbildung 4 - 17: Immunpräzipitationen von Cx32 aus Zelllysaten von Cx32 exprimierenden HeLa-Transfektanten in An- und Abwesenheit von Chloroquin**

Die Zellen wurden mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin (linke Spalte) oder  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat (rechte Spalte) metabolisch markiert. Während der letzten drei Stunden des „Pulse“ wurde die eine Hälfte der Zellen mit Chloroquin inkubiert (Chl), die anderen Zellen dienten als Kontrolle (Kon). Cx32 wurde aus den Lysaten immunpräzipitiert und Connexin32 nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie detektiert.

Das Autoradiogramm nach  $^{35}\text{S}$ -Methionin-Markierung weist ein deutlich stärkeres Cx32-Signal nach der Immunpräzipitation aus den Lysaten in Anwesenheit von Chloroquin kultivierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle auf. Dies zeigt, dass sich in Anwesenheit von Chloroquin Cx32-Protein anreichert. Das Autoradiogramm nach  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat-Markierung zeigt ein umgekehrtes Bild: Das Signal der Kontrolle ist wesentlich stärker als das des Experimentes mit Chloroquin. Eine größere Menge an Cx32-Protein führt zu einem deutlich schwächeren Signal. In Zellen, die zur Hemmung des lysosomal vermittelten Abbaus mit Chloroquin behandelt worden sind, ist Cx32 in wesentlich geringerem Ausmaß phosphoryliert als in Kontrollzellen. Diese geringere Phosphorylierung könnte der Grund für die unveränderte Kopplung der HeLa-Cx32-Transfektanten trotz größerer Proteinmenge sein.

Insgesamt zeigt ein Vergleich des mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin oder  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat markierten Cx32 in An- und Abwesenheit der Inhibitoren Lactacystin und Chloroquin (siehe Abbildung 4 - 16 und 4 - 17) deutliche Unterschiede in der Intensität der Banden der verschiedenen Lysate. Während das in den mit Lactacystin inkubierten Zellen angereicherte Cx32 zu einem etwa gleichen Anteil wie in Kontrollzellen phosphoryliert ist, führt die Inkubation mit Chloroquin zu einer Anreicherung von Cx32, das weniger phosphoryliert ist als im Kontrollexperiment ohne Chloroquininkubation.

#### **4.4 Connexin26 wird auch in HeLa-Zellen durch die Expression von Cx32 stabilisiert**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Hepatozyten die Degradationsrate von Cx26 durch die Koexpression von Cx32 beeinflusst wird. In diesem Zellsystem wird die Proteinmenge an Cx26 und damit auch die durch dieses Connexin vermittelte Kopplung durch die Expression von Cx32 moduliert. Die Expression von Cx32 stellt also einen Regulationsmechanismus der Halbwertszeit von Cx26 in Maushepatozyten dar. Um nachzuweisen, dass die Verlängerung der Halbwertszeit von Cx26 durch Koexpression von Cx32 ein nicht nur auf Hepatozyten begrenzter Mechanismus ist, wurden die in dieser Arbeit untersuchten Cx26 exprimierenden HeLa-Zellen zusätzlich mit Cx32 stabil transfiziert. Die Koexpression von Cx32 und Cx26 sollte, wenn die Stabilisierung von Cx26 eine generelle, zelltypunabhängige Eigenschaft von Cx32 ist, zu einer deutlichen Verlängerung der Halbwertszeit von Cx26 führen.

##### **4.4.1 Stabile Transfektion von HeLa-Cx26-Zellen mit Cx32**

Für die Transfektion der Puromycin-resistenten HeLa-Cx26-Transfektanten wurde die codierende Region von Maus-Cx32 in den eukaryontische Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo (+) von Invitrogen, der ein Zeocin-Resistenzgen enthält, kloniert. Der Vektor pBS/cod.cx32NaeSac, der die kodierende Region von Maus-Cx32 enthält (Eva Thönnisen, unveröffentlichte Ergebnisse) wurde für die Klonierung als Ausgangsbasis verwendet. Durch PCR mit den spezifisch abgeleiteten Startermolekülen (Primer) Cx32hin und Cx32rueck2 konnten Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI, die auch in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pcDNA3.1/Zeo vorhanden sind, vor und hinter der kodierenden Region von Cx32 eingeführt werden. Das durch die PCR amplifizierte Fragment wurde auf ein Gel aufgetragen, nach der Elektrophorese eluiert und anschließend mit *Bam*HI und *Eco*RI verdaut. Das nach einer weiteren Gelelektrophorese und Elution aufgereinigte Fragment wurde direkt für die Ligation mit dem ebenfalls mit *Bam*HI und *Eco*RI gespalten und anschließend aufgereinigten Vektor pcDNA3.1/Zeo eingesetzt. Nach Transformation und Plasmid-Präparation wurde die Sequenz der codierenden Region durch

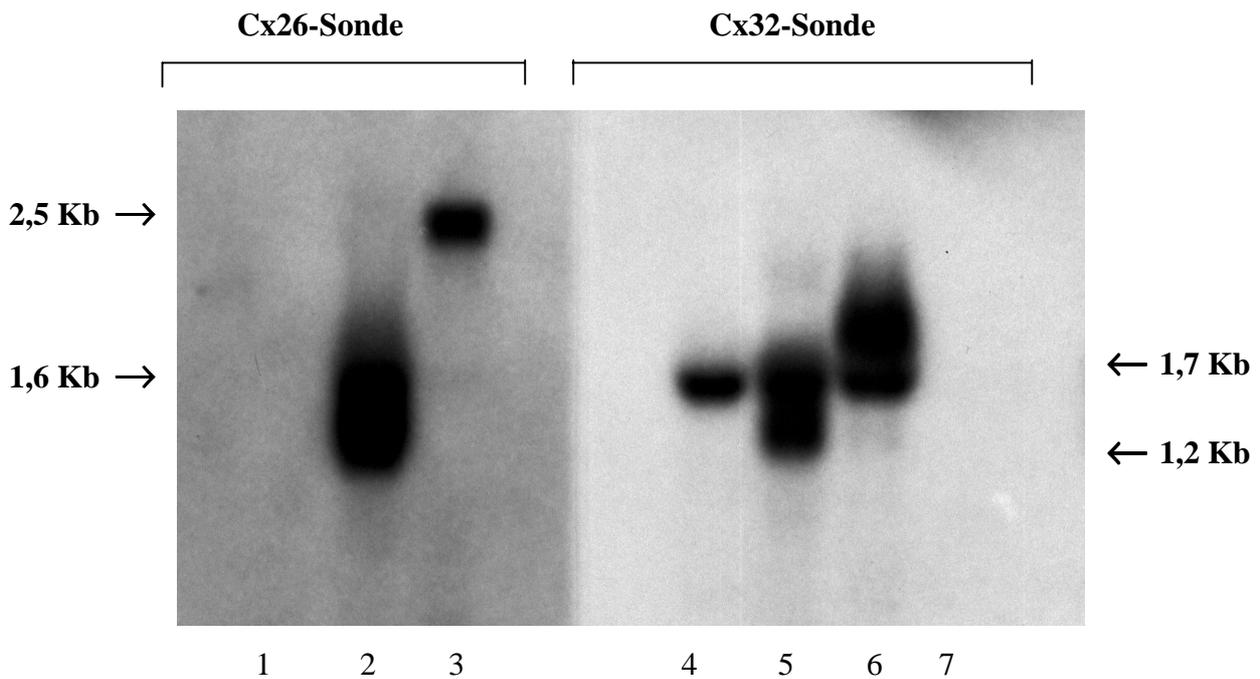
eine Sequenzierung von der Firma SeqLab überprüft. Von dem klonierten eukaryontische Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(+)/CX32 wurden 10 µg Plasmid-DNS für die stabile Transfektion von HeLa-Cx26-Zellen mit Hilfe der Lipofektin-Methode eingesetzt. Positive Klone wurden mit Zeozin und Puromycin selektioniert und die Expression von Cx26 und Cx32 durch Immunfluoreszenzexperimente überprüft. Der Klon VI F5, der in der indirekten Immunfluoreszenzanalyse Ähnlichkeiten mit embryonalen Maushepatozyten im Verhältnis von Cx26- und Cx32-Signalen aufwies, wurde näher analysiert.

#### **4.4.2 Charakterisierung der HeLa-Cx26/ Cx32-Doppeltransfektanten**

Durch die Northern Blot Analyse sollte gezeigt werden, dass der durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse als positiv erkannte Klon, auch das Transkript für Cx26 und Cx32 enthält.

Das Autoradiogramm (Abbildung 4 – 18) zeigte die für Hepatozyten bereits publizierten Signale der Transkripte von Cx26 (2,5 Kb, Spur 3) und Cx32 (1,6 Kb, Spur 4) (Nelles et al., 1996). Auch die RNS der Cx26/Cx32-Doppeltransfektanten enthielt wie erwartet das Cx26-Transkript (Spur 2, das Signal entsprach dem der HeLa-Cx26-Transfektanten, gezeigt in der Doktorarbeit von Dieter Manthey, 1998) und das Cx32-Transkript (Spur 5, das erwartete Signal bei 1,2 Kb und ein weiteres Signal bei 1,7 Kb). Als Positivkontrolle für das Signal des Cx32-Transkript wurde RNS aus HeLa-Cx32-Transfektanten (Spur 6, Elfgang et al., 1995) verwandt. RNS aus HeLa Wildtyp wies keine Signale auf.

Die Signalintensitäten der Cx26- und Cx32-Transkripte der Hepatozyten-RNS haben etwa die gleich Größenordnung, die Intensität des Cx32-Signals ist jeweils etwas geringer. Das Verhältnis der Transkriptmenge von Cx26 und Cx32 in RNS aus VI F5 entspricht weitgehend dem Verhältnis in Hepatozyten.

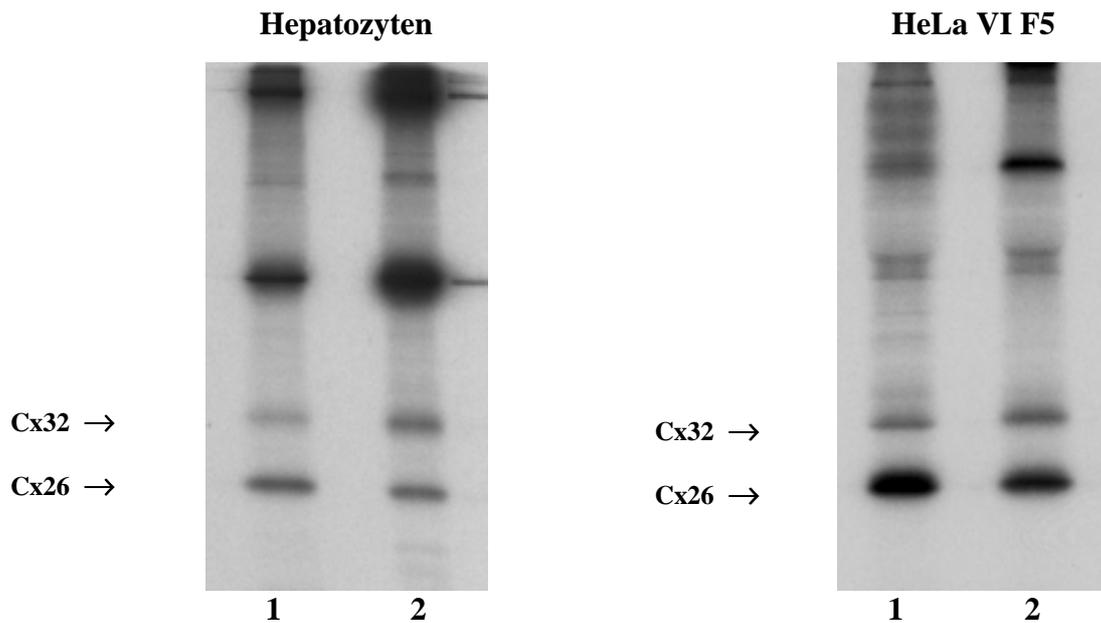


**Abbildung 4 - 18: Northern Blot Hybridisierung von RNS aus Hepatozyten, HeLa Wildtyp,**

**HeLaCx32- und Cx26/Cx32-Transfektanten mit Cx32- und Cx26-DNS-Sonden**

RNS aus VI F 5 (Spur 2 und 5) und Hepatozyten (Spur 3 und 4) wurden untersucht. HeLa-Wildtyp-RNS (Spur 1 und 7) wurde als Negativkontrolle und HeLa-Cx32-RNS als Positivkontrolle (Spur 6) verwendet. Pro Spur wurden 20µg Gesamt-RNS aufgetragen. Die Spuren 1, 2 und 3 wurden mit Cx26-DNS-Sonde (Kapitel 2.7) und die Spuren 4, 5, 6 und 7 mit Cx32-DNS-Sonde (Kapitel 2.7) hybridisiert.

Die Expression von Cx26- und Cx32-Protein in VI F5-Zellen wurde durch Immunpräzipitationsexperimente nachgewiesen. Abbildung 4 - 19 zeigt ein ähnliches Expressionsmuster für Cx26 und Cx32 in Hepatozyten und VI F5-Zellen. Bei der Immunpräzipitation eines Connexins aus den Lysaten beider Zellen wird das jeweils andere Connexin kopräzipitiert. Bei der Immunpräzipitation von Cx26 ist außer einer deutlichen Cx26-Bande eine schwächere Cx32-Bande zu sehen. Wird umgekehrt Cx32 immunpräzipitiert, weist das Autoradiogramm außer dem Cx32-Signal noch ein Cx26-Signal auf, welches bei Hepatozyten etwa gleiche Intensität wie das Cx32-Signal hat und bei VI F5 etwas stärker ist als das Cx32-Signal. Anhand der Signalstärke der Immunpräzipitationsexperimente kann keine Aussage über das Expressionsniveau von Cx26 im Vergleich zu Cx32 getroffen werden, da die Affinität der beiden verschiedenen Antikörper zu den jeweiligen Antigen (Cx26 oder Cx32) unterschiedlich sind. Ein Vergleich der Mengenverhältnisse von Cx26 zu Cx32 in beiden Zelltypen ist jedoch möglich.



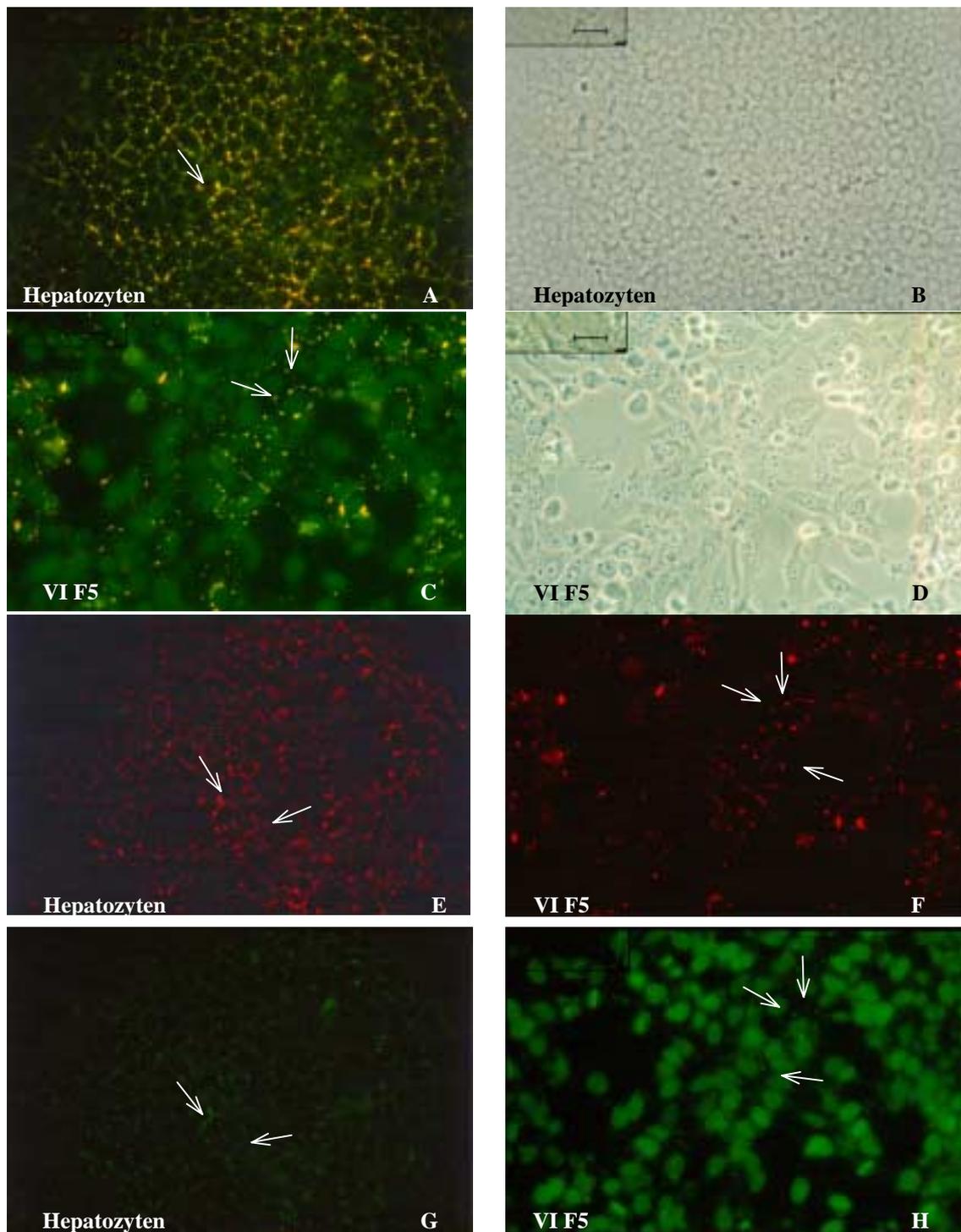
**Abbildung 4 - 19: Immunpräzipitationen von Cx32 und Cx26 aus Zellysatenen von Hepatozyten und HeLa-Cx26/Cx32-Transfektanten VI F5.**

Die metabolisch mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierten Zellen wurden lysiert und Cx26 (Spur 1) oder Cx32 (Spur 2) aus den Lysaten von normalen Hepatozyten und HeLa-Doppeltransfektanten VI F5 immunpräzipitiert. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Connexine mittels Autoradiographie detektiert.

Anhand indirekter Immunfluoreszenzanalyse konnte die Lokalisation der Connexin-Proteine in den VI F5-Zellen im Vergleich zu Hepatozyten (Abbildung 4 – 20) gezeigt werden.

Sowohl in den Hepatozyten als auch den VI F5-Zellen sind Cx32 und Cx26 hauptsächlich in den Kontaktmembranen der Zellen lokalisiert. Ein Vergleich des Expressionsmusters von Cx32 und Cx26 (Abbildung 4 – 20) zeigt, dass die beiden Connexine sowohl in Hepatozyten als auch in VI F5-Zellen nachweisbar sind. Zur Verdeutlichung weisen in Abbildung 4 – 20 Pfeile auf einzelne Zellen hin, an denen die Kolo-kalisation in der Kontaktmembran besonders gut zu beobachten ist.

Insgesamt ist die Expression und Lokalisation von VI F5-Zellen der von Hepatozyten sehr ähnlich, so dass die HeLa-Doppeltransfektante in manchen Aspekten als Modell zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Cx26 und Cx32 dienen kann.



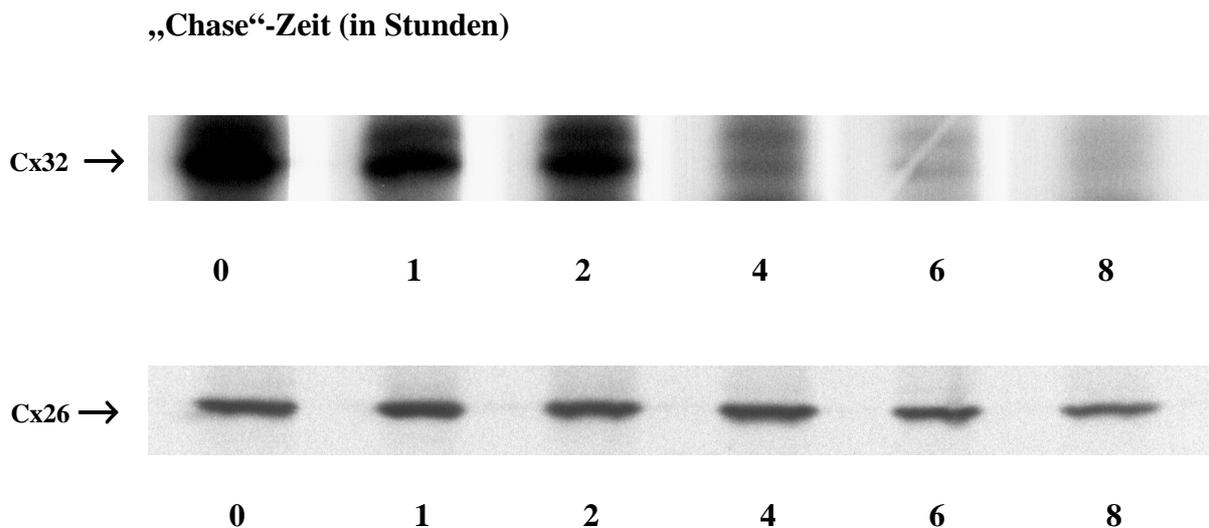
**Abbildung 4 – 20: Immunfluoreszenzanalysen von VI F5-Zellen im Vergleich zu Hepatozyten**

Die für Connexine typischen Signale an den Kontaktmembranen konnten sowohl bei VI F5-Zellen als auch bei den Hepatozyten nachgewiesen werden. Cx26 und Cx32 wurden durch spezifische Antikörper erkannt und durch Cy3-konjugierten (Cx26) oder DTAF-konjugierten (Cx32) zweiten Antikörper nachgewiesen. Die Überlagerung der Cx.26-Signale (rot, Cy3-konjugierter zweiter Antikörper, Bilder E und F) und Cx32-Signale (grün, DTAF-konjugierter zweiter Antikörper, Bilder G und H) zeigt die Kollokalisierung der beiden Connexine an. In der Doppelbelichtung (Bilder A und C) entstehen die gelben Signale durch die Überlagerung der Signale von Cx26 und Cx32. Der Balken entspricht ca. 17 µm.

A, C: doppelbelichtete Fluoreszenzaufnahmen ; E bis H: einfachbelichtete Fluoreszenzaufnahmen  
B, D: Phasenkontrastaufnahmen

#### 4.4.3 In VI F5-Zellen ist die Halbwertszeit von Cx26 im Vergleich zu HeLa-Cx26-Zellen stark verlängert

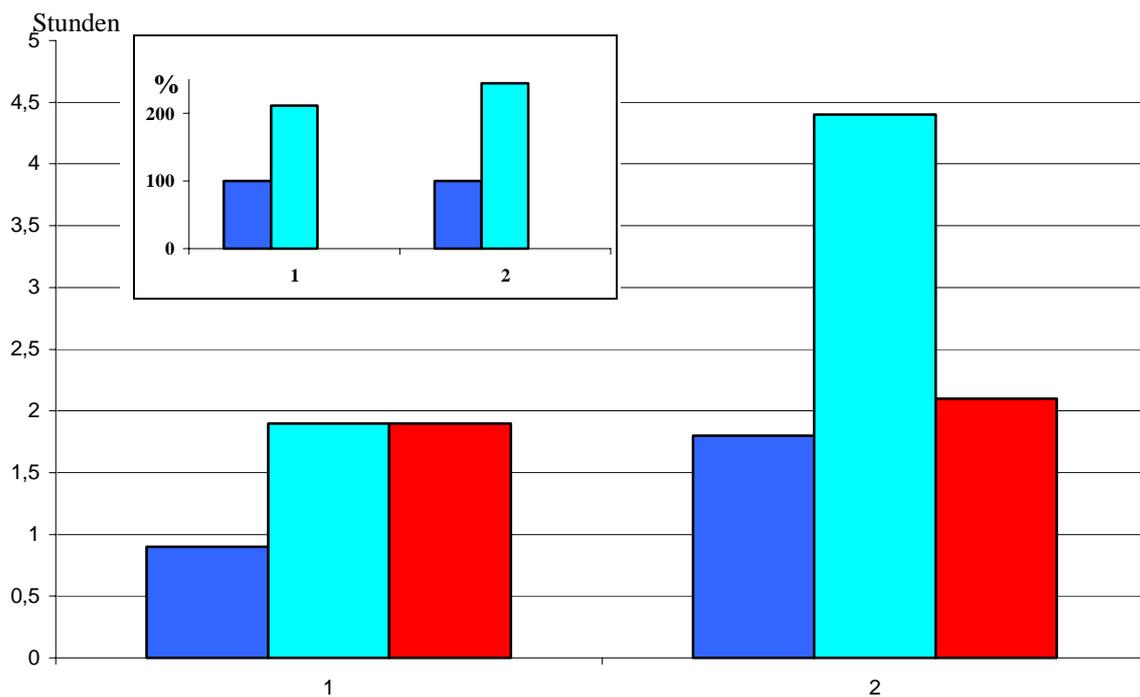
Die Halbwertszeit von Cx26 und Cx32 in VI F5-Zellen wurde, analog wie bereits in Kapitel 4.1.2 beschrieben, bestimmt und mit den in Hepatozyten (siehe Kapitel 4.2) und in anderen HeLa-Transfektanten (siehe Kapitel 4.3.2) ermittelten Werten verglichen. Die Auswertung der Autoradiogramme (Abbildung 4 - 21) ergab für Cx32 die Halbwertszeit von 2,1 Stunden. Dieser Wert unterscheidet sich kaum von dem in HeLa-Cx32-Transfektanten bestimmten Wert von 1,9 Stunden. Für Cx26 ergab sich in den Doppeltransfektanten VI F5 eine Halbwertszeit von 4,4 Stunden, eine im Vergleich zu den HeLa-Cx26-Transfektanten um den Faktor 2,3 verlängerten Wert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 – 8 zusammengefasst.



**Abbildung 4 – 21: „Pulse-Chase“-Experimente von VI F5-Zellen**

Dargestellt sind Autoradiogramme von „Pulse-Chase“-Experimenten zur Halbwertszeitbestimmung von Cx26 und Cx32 in VI F5-Zellen. Die Zellen wurden für eine Stunde mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin metabolisch markiert (Pulse) anschließend für verschiedene Zeiten (0, 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden) mit nicht radioaktivem Medium kultiviert (Chase) und lysiert. Das aus den Zelllysaten immunpräzipitierte Cx26 und Cx32 wurde nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie detektiert. Dargestellt sind stellvertretend die Signale von jeweils einem Experiment.

Connexine	Hepatozyten (1)	HeLa-Transfektanten (2)
Cx26 allein exprimiert	0,9 ± 0,1 Std	1,8 ± 0,1 Std
Cx26 in Anwesenheit von Cx32	1,5 ± 0,2 Std	4,4 ± 0,4 Std
Cx32 in Anwesenheit von Cx26	1,9 ± 0,2 Std	2,1 ± 0,1 Std



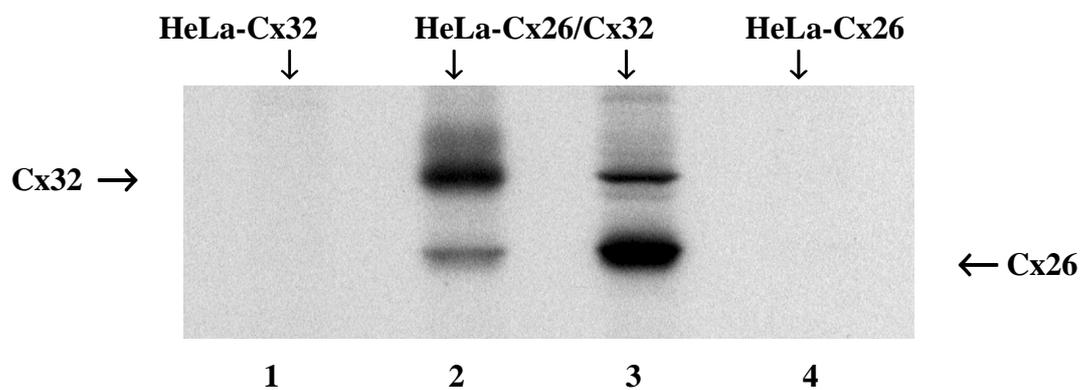
**Tabelle 4 – 8: Auswirkung der Koexpression von Cx32 auf die Halbwertszeit von Cx26 in Hepatozyten und HeLa-Transfektanten.**

Die Halbwertszeiten von Cx26 und Cx32 in HeLa-Transfektanten, in normalen und Cx32-defizienten Hepatozyten wurden durch Auswertung von „Pulse-Chase“-Experimenten bestimmt. Die Werte der Halbwertszeit von Cx26 allein exprimiert und koexprimiert mit Cx32 wurden gegenübergestellt. Der angegebene Wert in Stunden ist der Mittelwert aus mehreren durchgeführten Experimenten. Die Werte sind mit Standardabweichung angegeben. Zur besseren Übersicht sind die Werte zusätzlich graphisch dargestellt. Das größere Diagramm zeigt die Werte der Halbwertszeiten in Stunden, das kleinere die prozentualen Werte jeweils aufgetragen auf der X-Achse.

Die Expression von Cx32 verlängert die Halbwertszeit von Cx26 in Hepatozyten und HeLa-Zellen um etwa den Faktor 2 des Wertes ohne zusätzliche Cx32-Expression. Die Stabilisierung eines Connexins durch die Expression eines anderen scheint also ein generelles Prinzip zu sein, das sich zumindest für die Connexine Cx32 und Cx26 auch in ganz unterschiedlichen Zellsystemen, wie den primären Maushepatozyten und den artifiziellen HeLa-Transfektanten, beobachten lässt.

## 4.5 Hinweise auf die Bildung von heteromeren Kanälen aus Connexin26 und Connexin32

Das Vorhandensein von heterotypischen Cx26/Cx32 Gap Junction Kanälen ist in der Literatur gut dokumentiert (Valiunas et al., 1999, Bruzzone et al, 1996, Elfgang et al, 1995). Die Existenz von funktionellen, heteromeren Kanälen in Zellen ist jedoch nicht eindeutig nachgewiesen. Die deutliche Stabilisierung von Cx26 durch die Expression von Cx32 legt eine enge Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen nahe, die im Fall von heteromeren Kanälen gegeben wäre. Durch verschiedene Immunpräzitationsexperimente sollte die Möglichkeit der Bildung heteromerer Gap Junction Kanäle aus Cx26 und Cx32 untersucht werden.

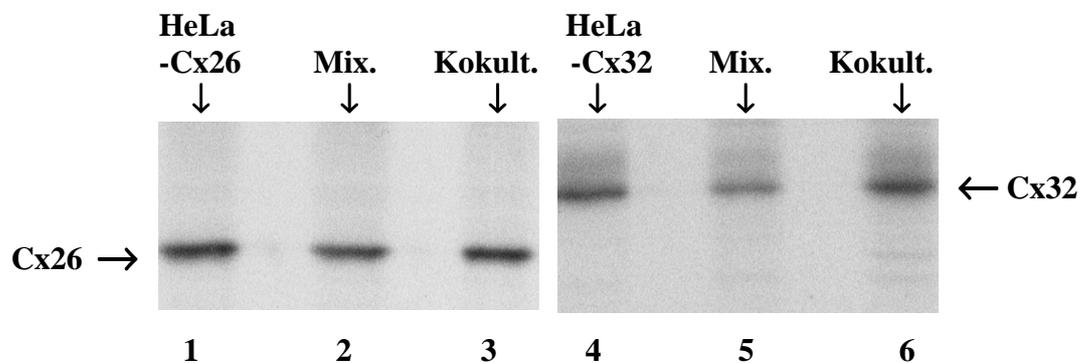


**Abbildung 4 – 22: Immunpräzitationen aus Lysaten von HeLa-Cx26, - Cx32-Transfektanten und HeLa-Cx26/Cx32-Doppeltransfektanten**

Dargestellt sind Autoradiogramme von Immunpräzitationsexperimenten der Lysate aus metabolisch mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierter HeLa-Cx32- (Spur 1), HeLa-Cx26/Cx32- (Spur 2 und 3) und HeLa-Cx26- Zellen (Spur 4). Es wurden spezifische Antikörper gegen Cx26 (Spur 1 und 3) und gegen Cx32 (Spur 2 und 4) verwendet. Cx26 und Cx32 werden in HeLa-Doppeltransfektanten kopräzitiert. Die Antikörper zeigen keine Kreuzreaktionen.

Nach der Immunpräzitation von Cx26 oder Cx32 aus Lysaten aus Hepatozyten oder HeLa-Cx26/Cx32-Doppeltransfektanten mit spezifischen Antikörpern wird stets das andere Connexin koimmunpräzitiert (siehe Kapitel 4.4.2 und Abbildung 4 - 22). Eine Kreuzreaktion der Antikörper kann ausgeschlossen werden, da eine Immunpräzitation mit Antikörper gegen Cx26 aus einem HeLa-Cx32-Lysat kein Signal ergibt, ebenso wie eine Immunpräzitation mit Antikörper gegen Cx32 aus einem HeLa-Cx26-Lysat (siehe Abbildung 4 - 22).

Abbildung 4 – 23 zeigt die Autoradiogramme der Immunpräzipitationen von Cx26 und Cx32 aus Lysaten von kokultivierten HeLa-Cx26- und HeLa-Cx32-Zellen und Lysatgemischen im Vergleich zu Kontrollimmunpräzipitationen aus HeLa-Cx26- und HeLa-Cx32-Transfektanten. Werden Lysate von HeLa-Cx26- und HeLa-Cx32-Zellen im Verhältnis eins zu eins gemischt und anschließend eine Immunpräzipitation mit Antikörper gegen Cx26 und gegen Cx32 durchgeführt, kann jeweils nur eine Bande, nämlich die des entsprechenden Antigens, detektiert werden. Ebenso wird jeweils nur hauptsächlich eine Bande aus den Lysat kokultivierter Zellen immunpräzipitiert. Im Fall der Immunpräzipitation mit Antikörper gegen Cx32 ist zusätzlich eine sehr schwache Bande in Höhe des Cx26-Signals zu sehen, was auf eine sehr geringe Koimmunpräzipitation hindeuten könnte..



**Abbildung 4 – 23: Immunpräzipitationen aus Lysaten von HeLa-Cx26, - Cx32-Transfektanten, kokultivierten HeLa-Cx26, -Cx32-Zellen und Lysatgemischen aus HeLa-Cx26- und HeLaCx32-Transfektanten**

Dargestellt sind die Autoradiogramme der Immunpräzipitationsexperimente aus Lysaten von metabolisch mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierter HeLa-Cx26- (Spur 1), HeLa-Cx32-Zellen (Spur 4), kokultivierten HeLa-Cx26- und Cx32-Zellen (Spur 3 und 6) und von Lysatgemischen der beiden Zellen (Spur 2 und 5) Es wurden spezifische Antikörper gegen Cx26 (Spur 1, 2 und 3) und gegen Cx32 (Spur 4, 4 und 5) verwendet.

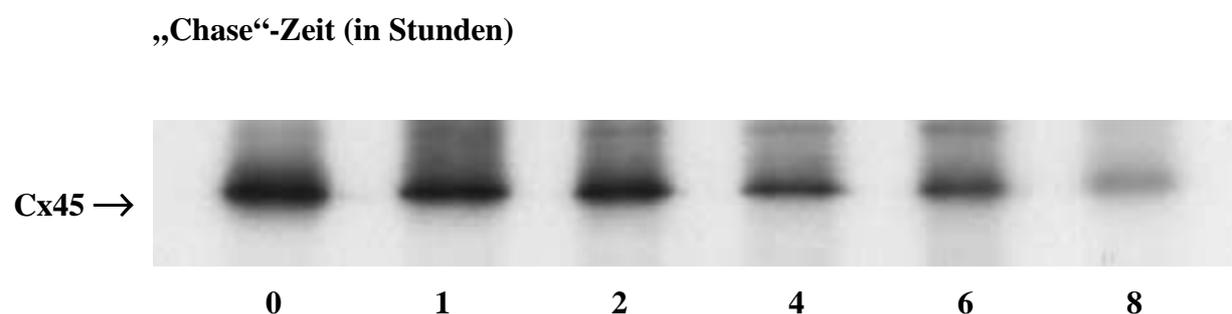
Die Koimmunpräzipitation von Cx26 und Cx32 aus Zellen, die beide Connexine exprimieren ist ein Resultat von Wechselwirkungen zwischen diesen Connexinen, die in den Zellen vorliegen und nicht erst während des Experiments entstehen. Dies wird dadurch gezeigt, dass die Immunpräzipitation aus Lysatgemischen unter gleichen experimentellen Bedingungen nur zu einer Bande führt. Kokultivierte HeLa-Cx26- und HeLa.Cx32-Zellen können homotypische und heterotypische Gap Junction Kanäle bilden, aber keine heteromeren Kanäle. Die Tatsache, dass die Immunpräzipitation aus Lysaten kokultivierter Zellen fast ausschließlich ein Signal ergibt, deutet darauf hin, dass die Koimmunpräzipitation von Cx26 und Cx32 auf Wechselwirkungen zwischen den beiden Proteinen beruht, die sich in kokultivierten Zellen nicht ausbilden können. Insgesamt deuten die Ergebnisse auf das

Vorhandensein von heteromeren Cx32/Cx26 Gap Junction Kanälen in Hepatozyten und HeLa-Cx26/Cx32-Doppeltransfektanten hin.

#### **4.6 Die Stabilisierung eines Connexins auf Proteinebene durch Koexpression eines zweiten Connexins lässt sich auch auf andere Connexine übertragen: Cx43 stabilisiert Cx45**

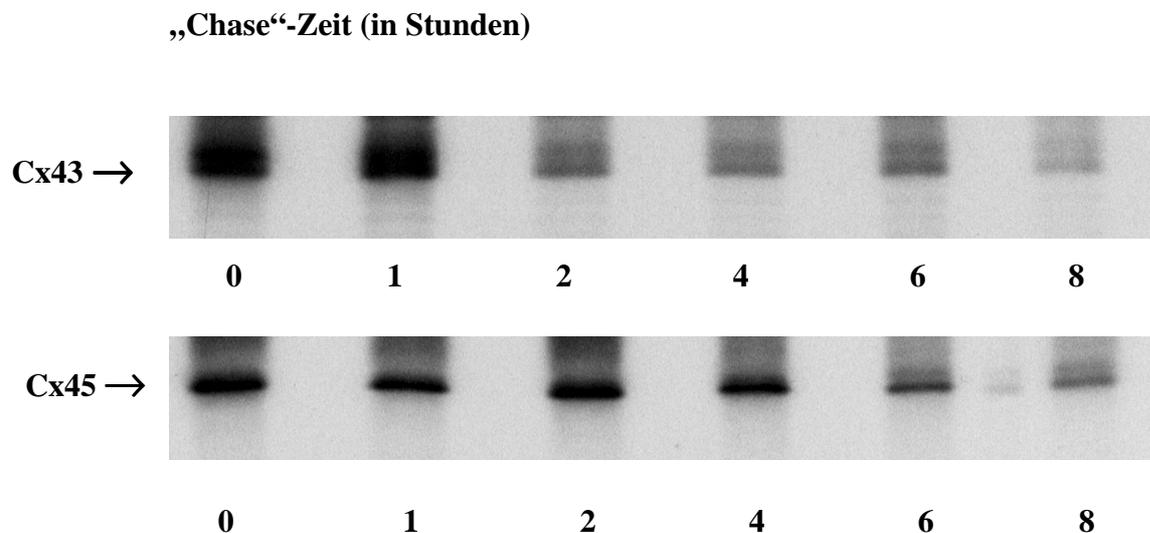
In Kapitel 4.4.3 konnte gezeigt werden, dass die Stabilisierung von Cx26 durch Koexpression von Cx32 ein genereller Mechanismus zu sein scheint, der nicht nur in Hepatozyten beobachtet werden kann, sondern sich auch auf HeLa-Cx26/Cx32 Doppeltransfektanten übertragen lässt. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob dieser Mechanismus der Stabilisierung auf Proteinebene auch für andere Connexine Gültigkeit hat.

Für die Untersuchung dieser Frage standen HeLa-Cx43/Cx45-Doppeltransfektanten zur Verfügung, die von Claudia Elfgang im Rahmen ihrer Dissertation 1994 stabil transfiziert und charakterisiert wurden. Die Halbwertszeit von Cx43 in den Doppeltransfektanten und die Halbwertszeit von Cx45 in HeLa-Cx45-Transfektanten (Efgang et al., 1995) und den Doppeltransfektanten wurde analog wie in Kapitel 4.1.2 bestimmt (Abbildung 4 – 24 und 4 - 25).



**Abbildung 4 – 24: „Pulse-Chase“-Experimente zur Bestimmung der Halbwertszeit von Cx45 in HeLa-Transfektanten**

Dargestellt ist ein Autoradiogramm eines „Pulse-Chase“-Experimentes zur Halbwertszeitbestimmung von Cx45 in HeLa-Cx45-Transfektanten. Die Zellen wurden für eine Stunde mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin metabolisch markiert (Pulse) anschließend für verschiedene Zeiten (0, 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden) mit nicht radioaktivem Medium kultiviert (Chase) und lysiert. Das aus den Zelllysaten immunpräzipitierte Cx45 wurde nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie detektiert. Dargestellt sind stellvertretend die Signale von einem Experiment.



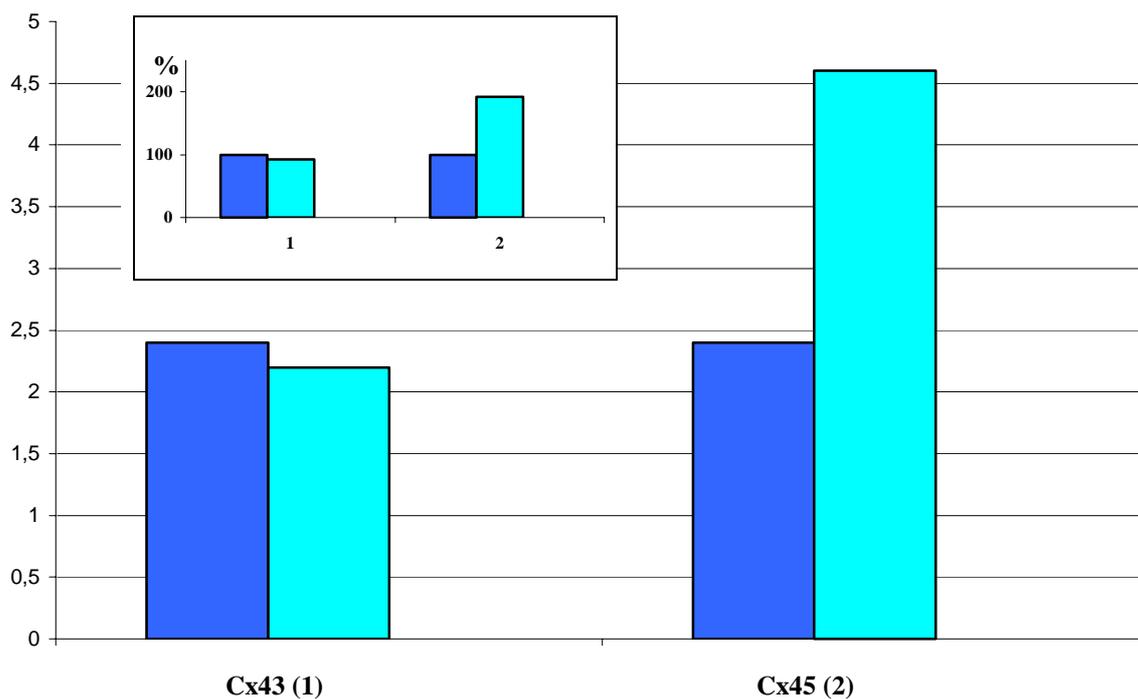
**Abbildung 4 – 25: „Pulse-Chase“-Experimente mit HeLa-Cx43/45-Doppeltransfektanten**

Dargestellt sind Autoradiogramme von „Pulse-Chase“-Experimenten zur Halbwertszeitbestimmung von Cx43 und Cx45 in HeLa-Doppeltransfektanten. Die Zellen wurden für eine Stunde mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin metabolisch markiert (Pulse), anschließend für verschiedene Zeiten (0, 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden) mit nicht radioaktivem Medium kultiviert (Chase) und lysiert. Das aus den Zelllysaten immunpräzipitierte Cx43 und Cx45 wurde nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie detektiert. Dargestellt sind stellvertretend die Signale von jeweils einem Experiment.

Die Halbwertszeit von Cx43 in HeLa-Zellen wurde im Kapitel 3.1.2 mit 2,4 Stunden berechnet. Die Halbwertszeit von Cx45 in HeLa-Cx45-Einfachtransfektanten beträgt 2,4 Stunden. Im Vergleich dazu beträgt die Halbwertszeit in HeLa-Cx43/Cx45-Doppeltransfektanten für Cx43 2,2 Stunden und für Cx45 4,6 Stunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 – 9 zusammengefasst. Die Koexpression von Cx43 schützt Cx45 deutlich vor dessen Abbau. Die Halbwertszeit verlängert sich um den Faktor 1,8. Dies ist ein ähnlich starke Stabilisierung des Connexins wie sie durch Koexpression von Cx32 bei Cx26 in Leberzellen und HeLa-Doppeltransfektanten zu beobachten ist, hier erfolgt eine Verlängerung der Halbwertszeit um etwa den Faktor 2. Die Halbwertszeit von Cx43, bestimmt in den Doppeltransfektanten, ist im Vergleich zu Cx43 allein exprimiert nahezu gleich, der Unterschied von 0,2 Stunden ist sehr gering.

Die Experimente haben gezeigt, dass die Stabilisierung eines Connexins durch die Koexpression eines anderen nicht ausschließlich auf Cx26 und Cx32 beschränkt ist. Auch Cx43 kann Cx45 gegen Abbau stabilisieren. Dieser Mechanismus der Stabilisierung gegen Abbau durch Koexpression scheint für Connexine typisch zu sein.

Connexine	Connexin 43 (1)	Conexin45 (2)
Connexin allein exprimiert	2,4 ± 0,2 Std	2,4 ± 0,1 Std
Cx43 und Cx45 koexprimiert	2,2 ± 0,1 Std	4,6 ± 0,4 Std



**Tabelle 4 – 8: Auswirkung der Koexpression von Cx43 auf die Halbwertszeit von Cx45 in HeLa-Cx43/Cx45-Doppeltransfektanten.**

Die Halbwertszeiten von Cx43 und Cx45 in HeLa-Doppeltransfektanten wurden mittels „Pulse-Chase“-Experimenten bestimmt und mit den Werten in HeLa-Cx43- und HeLa-Cx45-Transfektanten verglichen. Der angegebene Wert in Stunden ist der Mittelwert aus mehreren durchgeführten Experimenten. Die Werte sind mit Standardabweichung angegeben. Zur besseren Übersicht sind die Werte zusätzlich graphisch dargestellt. Das größere Diagramm zeigt die Werte der Halbwertszeiten in Stunden, das kleinere die prozentualen Werte jeweils aufgetragen auf der X-Achse.

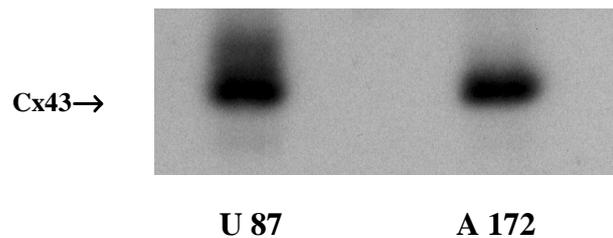
## **4.7 Die Zell-Zell-Kommunikation mittels Gap Junction Kanälen kann durch das Phosphorylierungsmuster des exprimierten Connexins gesteuert werden**

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die Veränderung der Degradationsrate einen möglichen Regulationsmechanismus für die Zell-Zell-Kommunikation, über die Änderung der Menge an Connexinprotein in den Zellen, darstellt. Neben dieser Möglichkeit stehen Zellen noch verschiedene andere Regulationsmechanismen zur Verfügung (siehe auch Kapitel 1.6). Eine dieser Möglichkeiten stellt die Variation der Phosphorylierung des Connexinproteins in der Zelle dar. Um den Einfluss der Phosphorylierung eines Connexins auf die Kopplung nachzuweisen, ist ein Vergleich zwischen Zellen, die den gleichen Hintergrund haben (aus dem gleichen Gewebe stammen) und sich möglichst nur in Kopplung und Phosphorylierungsmuster (Ausprägung der unterschiedlichen phosphorylierten Isoformen) des exprimierten Connexins unterscheiden, besonders gut geeignet. Es kann davon ausgegangen werden, dass hier andere die Kopplung beeinflussende Parameter, wie zum Beispiel die Halbwertszeit, ähnlich genug sind, um auf die Unterschiede in der Kopplung keinen Einfluss zu haben.

Untersuchungen an den beiden Zelllinien U 87 (bereits vorgestellt in Kapitel 3.1) und A 172 (Giard et al., 1973), die beide aus menschlichen Gliomen etabliert worden sind, zeigten, dass hier Zellen vorliegen, die den gleichen Hintergrund haben und ein einziges Connexin in etwa gleicher Menge mit gleicher Halbwertszeit ausprägen.

### **4.7.1 Vergleichende Charakterisierung der Cx43-Expression in U 87- und A 172-Zellen**

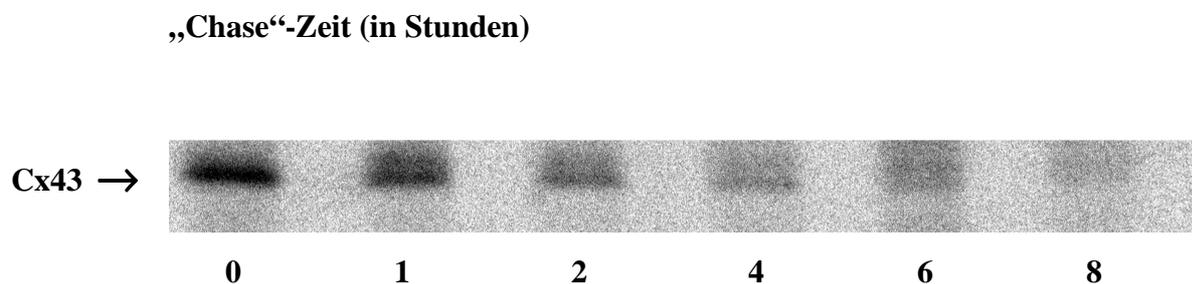
Zuerst wurde die Ausprägung von Cx43 in U 87- und A 172-Zellen untersucht. Durch Immunoblotanalysen von Zelllysaten (Abbildung 4 – 26) konnte gezeigt werden, dass beide Zellen Cx43 in ähnlichem Ausmaß exprimieren, U 87-Zellen exprimieren etwa 1,4-fache Menge an Cx43 wie A 172 Zellen.



**Abbildung 4 - 26: Immunoblotanalysen von U 87- und A 172-Zellysaten.**

Es wurden jeweils 10 µl Lysat von 95% konfluenten A 172- und U87-Zellen aufgetragen, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Elektrobrot auf eine Trägermembran transferiert. Die Detektion der Signale erfolgte nach einer Inkubation mit gegen Cx43 spezifischen Antikörper durch Markierung mit  $^{125}\text{J}$ -Protein A und anschließende Autoradiographie. Die Signalintensitäten wurden mit Hilfe des Programms Imagemaster verglichen.

Die Halbwertszeit von Cx43 in A 172-Zellen wurde analog wie in Kapitel 4.1.2 mit „Pulse-Chase“-Experimenten als 2,1 Stunden bestimmt (Abbildung 4 – 27), die Halbwertszeit von Cx43 in U 87-Zellen ist mit 1,9 Stunden (siehe Kapitel 4.1.2) sehr ähnlich.

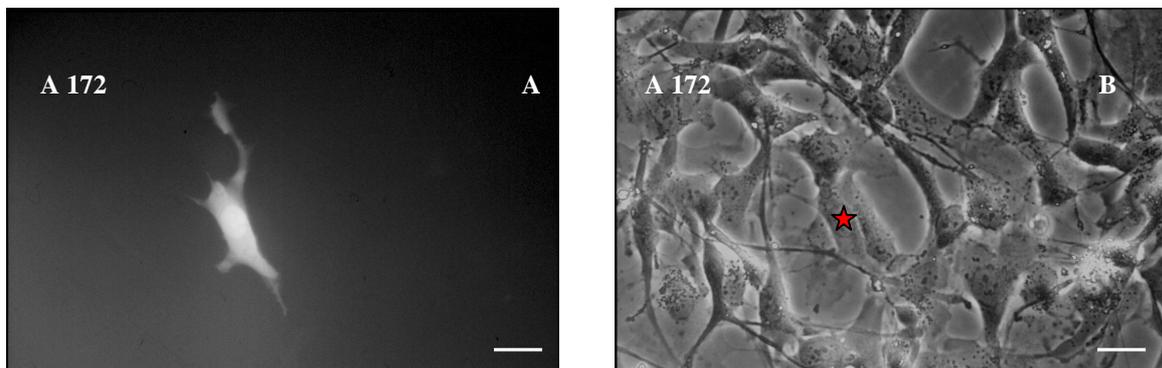


**Abbildung 3 – 27: „Pulse-Chase“-Experimente zur Bestimmung der Halbwertszeit von Cx43 in A 172-Zellen**

Dargestellt ist das Autoradiogramm eines „Pulse-Chase“-Experimentes zur Halbwertszeitbestimmung von Cx43 in A 172-Zellen. Die Zellen wurden für eine Stunde mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin metabolisch markiert (Pulse), anschließend für verschiedene Zeiten (0, 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden) mit nicht radioaktivem Medium kultiviert (Chase) und lysiert. Das aus den Zellysaten immunpräzipitierte Cx43 wurde nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie detektiert. Dargestellt sind stellvertretend die Signale von einem Experiment.

Es konnte gezeigt werden, dass in den Glioma-Zelllinien U 87 und A 172 sowohl das Expressionsniveau als auch die Halbwertszeit von Cx43 weitgehend übereinstimmen. Die Ergebnisse sind auch in Tabelle 4 – 10 zusammengefasst.

Die Untersuchung der Kopplung durch Mikroinjektionsexperimente mit Lucifer Yellow (analog wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben) und Neurobiotin (analog wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben) ergab jedoch große Unterschiede in der Funktion der Gap Junction Kanäle, bezogen auf ihr Kopplungsverhalten. Während in eine U 87-Zelle injiziertes Lucifer Yellow sich in durchschnittlich  $8 \pm 2,8$  Nachbarzellen ausbreitete (siehe Kapitel 3.1.1), konnte in A 172-Zellen fast nie eine Ausbreitung von Lucifer Yellow von injizierten Zellen in Nachbarzellen beobachtet werden (bei insgesamt 37 Injektionen konnte nur zweimal beobachtet werden, dass Lucifer Yellow sich auch in eine der Nachbarzellen erster Ordnung ausbreitete, dies entspricht durchschnittlich  $0,05 \pm 0,04$  koppelnden Zellen. Abbildung 4 – 28 zeigt eine Injektion von Lucifer Yellow in A 172-Zellen.



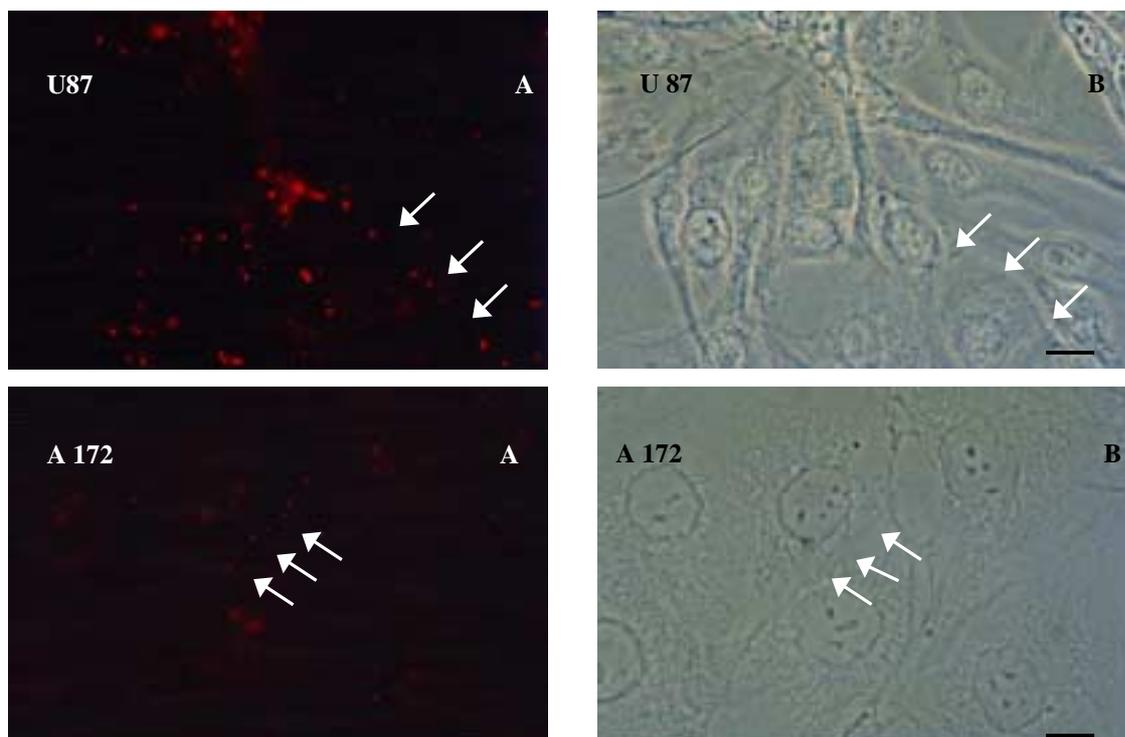
**Abbildung 4 – 28: Mikroinjektion von Lucifer Yellow in A 172- Zellen.**

In eine einzelne A 172-Zelle wurde der Fluoreszenz-Farbstoff Lucifer Yellow injiziert. Nach 90 Sekunden konnte keine Ausbreitung des Farbstoffes beobachtet werden, ebenso nach fünf und zehn Minuten. Die mit Farbstoff injizierte Zelle ist mit einem roten Stern ★ gekennzeichnet, der Balken entspricht 12  $\mu\text{m}$ . A: Fluoreszenzaufnahme, B: Phasenkontrastaufnahmen.

Weitere Mikroinjektionsexperimente zeigten, dass sich jedoch Neurobiotin in A 172-Zellen aus der injizierten Zelle durch Cx43 Gap Junction Kanäle in Nachbarzellen ausbreiten kann. Die Ausbreitung von Neurobiotin fand aber in wesentlich geringerem Maße statt als in U 87 Zellen. Während bei U 87-Zellen durchschnittlich pro Injektion 90 koppelnde Zellen gezählt werden konnte, ergab die Auszählung der koppelnden A 172-Zellen einen Durchschnittswert von 36 koppelnden Zellen.

Die Kopplung ist in A 172-Zellen im Vergleich zu U 87-Zellen um den Faktor 2,5 reduziert. Ebenso zeigen Immunfluoreszenzanalysen von A 172-Zellen deutlich weniger Connexin-typische Signale an der Kontaktmembran (Abbildung 4 – 29) als U 87-Zellen. In U 87-Zellen

konnten mittels indirekter Immunfluoreszenz Cx43 Gap Junction Plaques als deutliche, punktförmige Signale nachgewiesen werden, die entlang der Kontaktmembranen lokalisiert waren. Die Signale waren besonders häufig an Stellen zu finden, an denen die langen, dünnen Ausläufer einer Zelle eine andere Zelle berührten. Die weißen Pfeile in Abbildung 4 – 29 zeigen auf Gap Junction Plaques entlang eines solchen Ausläufers einer Zelle. Insgesamt zeigte die indirekte Immunfluoreszenz häufige und regelmäßige Signale von Gap Junction Plaques in U 87-Zellen (siehe auch Kapitel 4.1, Abbildung 4 – 3). In A 172-Zellen waren die Signale deutlich seltener und schwächer ausgeprägt. Nur selten waren die für Gap Junctions typischen Signale an Kontaktmembranen zu beobachten. In Abbildung 4 – 29 weisen Pfeile auf solche Signale hin. Der Unterschied in der Signalintensität und Häufigkeit ist größer, als eine um den Faktor 1,4 reduzierte Menge an Cx43 erwarten lässt. Die Ergebnisse sind auch in Tabelle 4 – 10 zusammengefasst.



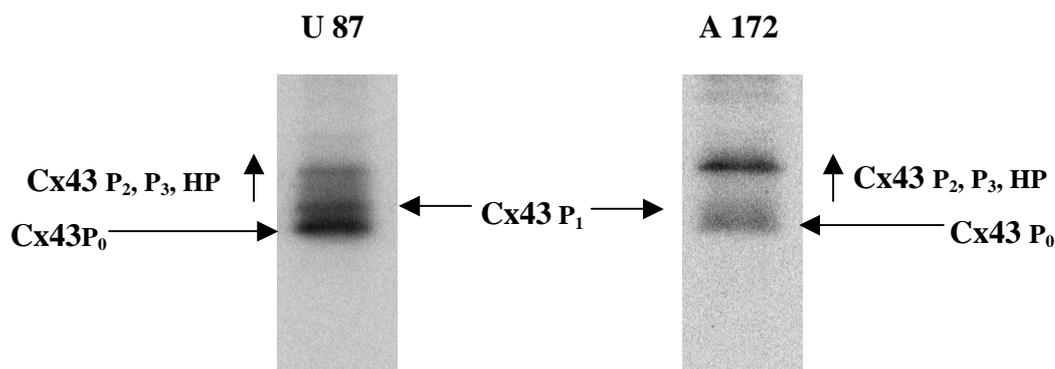
**Abbildung 4 – 29: Immunfluoreszenzanalysen von U 87- und A 172- Zellen.**

Die für Connexine typischen Signale an den Kontaktmembranen konnten bei U87- Zellen nachgewiesen werden. Bei A 172-Zellen waren nur wenige Signale zu sehen. Die Pfeile weisen auf Signale an den Kontaktmembranen zwischen zwei Zellen hin. Cx43 wurde durch den spezifischen Antikörper erkannt und durch Cy3-konjugierten zweiten Antikörper nachgewiesen. Der Balken entspricht ca. 6 µm.

A: Fluoreszenzaufnahme, B: Phasenkontrastaufnahmen.

Verschiedene Untersuchungen haben einen Zusammenhang zwischen einer veränderten Phosphorylierung und einer veränderten Zell-Zell-Kommunikation hergestellt (Moreno et al., 1992 und 1994; Takens-Kwak und Jongma, 1992). Auch ein Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und Connexintransport beziehungsweise Gap Junction Bildung konnte gezeigt werden (Atkinson et al., 1993; Burghardt et al., 1995). Eine mögliche Ursache für die Unterschiede in der Kopplung und in der Lokalisierung von Cx43 in U 87- und A 172-Zellen könnte also in der Ausprägung der phosphorylierten Isoformen von Cx43 in den beiden Zellen liegen.

Da die verschiedenen phosphorylierten Isoformen von Cx43 unterschiedliche Mobilitäten in der SDS-PAGE aufweisen, gibt die Auftrennung der Cx43-Immunpräzipitate aus den Lysaten metabolisch mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierter Zellen über SDS-PAGE Aufschluss (Abbildung 4 – 30) über das Phosphorylierungsmuster von Cx43 in den beiden Zellen.



**Abbildung 4 – 30: Immunpräzipitationen aus Lysaten von U 87- und A 172-Zellen.**

Dargestellt sind die Autoradiogramme der Immunpräzipitationsexperimente aus Lysaten von metabolisch mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierten U 87- und A 172-Zellen. Es wurde ein spezifischer Antikörper gegen Cx43 verwendet.

Die Autoradiogramme zeigen, dass in den U 87-Zellen, die eine gute Kopplung aufweisen, Cx43 hauptsächlich in den Modifikationen  $P_0$  (stärkstes Signal) und  $P_1$  (zweitstärkstes Signal) vorliegt. Andere Isoformen mit geringerer Mobilität sind schwächer ausgeprägt. In A172-Zellen ist die Isoform geringster Mobilität am stärksten ausgeprägt, daneben liegt Cx43 auch in den Modifikationen  $P_0$  (zweitstärkstes Signal) und  $P_1$  (drittstärkstes Signal) vor. Es liegt nah, dass die veränderte Kopplung in den beiden Zelllinien mit den unterschiedlich phosphorylierten Isoformen des exprimierten Cx43 in Zusammenhang steht.

Insgesamt zeigt die Ausprägung der verschiedenen Cx43 Isoformen in U 87- und A 172-Zellen deutliche Unterschiede.

<b>Eigenschaft</b>	<b>U 87-Zellen</b>	<b>A 172-Zellen</b>
Expression von Cx43	+++++	++++
Halbwertszeit	1,9 Stunden	2,1 Stunden
Kopplung (Ausbreitung von Lucifer Yellow)	+++++	nein
Kopplung (Ausbreitung von Neurobiotin)	+++++	++
Signale in der Immunfluoreszenz	+++++	++

**Tabelle 4 – 10: Zusammenfassung: Vergleichende Charakterisierung der Cx43-Expression in U 87- und A 172-Zellen.**

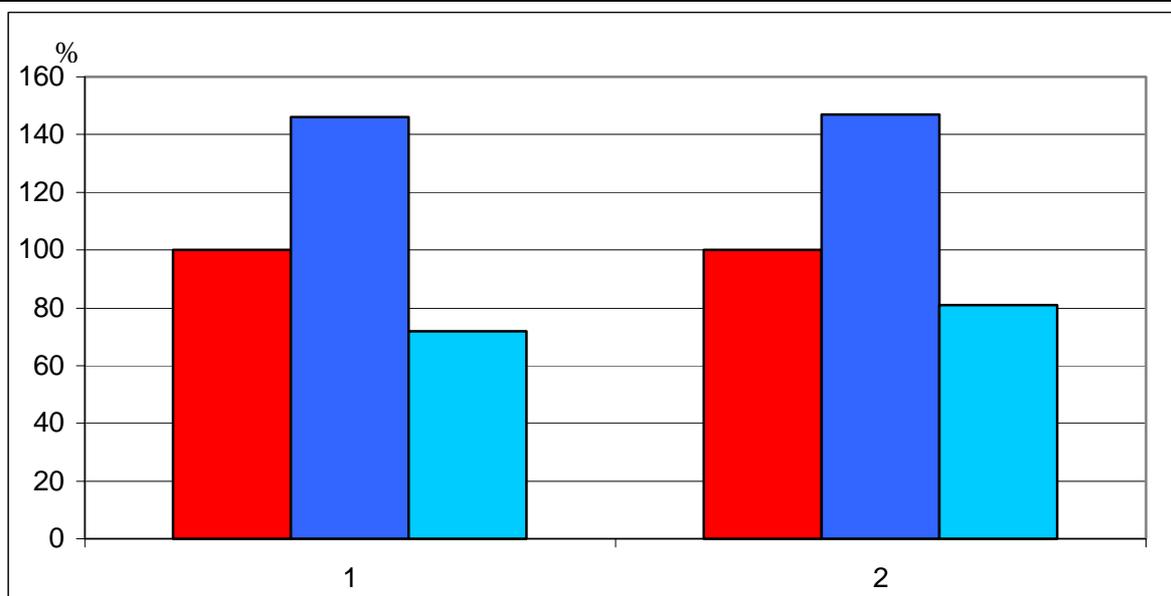
Die einzelnen Eigenschaften sind im Vergleich der Zellen A 172 und U 87 mit + (positiv aber schwach) bis +++++ (positiv und sehr stark) bewertet.

#### **4.7.2 Die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und die Aktivierung der Proteinkinase C mit TPA verändern die Kopplung von U 87- und A 172-Zellen**

Die Funktion der Gap Junction Kanäle, die Zell-Zell-Kommunikation, scheint in U 87- und A 172-Zellen vom Phosphorylierungsmuster von Cx43 bestimmt zu sein. Es sollte untersucht werden, ob cAMP (ein sekundärer Botenstoff und ein Aktivator der Proteinkinase A, der eine Phosphorylierung von Cx43 induzieren kann, siehe auch Kapitel 1.6.1) und TPA (ein Aktivator der Proteinkinase C) einen Einfluss auf die Zell-Zell-Kommunikation durch eine Veränderung der Phosphorylierung von Cx43 in den beiden Zellen ausüben. Insbesondere sollte festgestellt werden, ob die durch cAMP und TPA möglicherweise induzierte Phosphorylierung die Kopplung der beiden Zellen gleichermaßen beeinflusst, oder ob die Unterschiede in der Kopplung durch eine solche Veränderung des Phosphorylierungsmusters aufgehoben werden kann. Die Bestimmung der Kopplung durch Mikroinjektionsexperimente mit Neurobiotin wurde als Maß für die Zell-Zell-Kommunikation benutzt. Die Experimente wurden analog wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben durchgeführt. Parallel zu einem Experiment

in Anwesenheit eines Kinaseaktivators wurde stets ein Kontrollexperiment durchgeführt. Die Ergebnisse einer Experimentreihe (Kontrollexperiment und Experiment in Anwesenheit von cAMP oder TPA) wurden in % berechnet, der Wert des Kontrollexperimentes wurde 100 % gesetzt. Aus mehreren Experimentreihen wurde der Mittelwert in Prozent berechnet, die Ergebnisse sind in Tabelle 4 – 11 dargestellt.

Zelltypen	Kontrolle <span style="color: red;">■</span>	cAMP <span style="color: blue;">■</span>	TPA <span style="color: cyan;">■</span>
U 87 (1)	100 % (90)	146 % ± 14 %	74 % ± 16 %
A 172 (2)	100 % (32)	147 % ± 4 %	81 % ± 8 %



**Tabelle 4 – 11: Auswirkung von cAMP und TPA auf die Kopplung vermittelt von Cx43- und in U 87- und A172-Zellen**

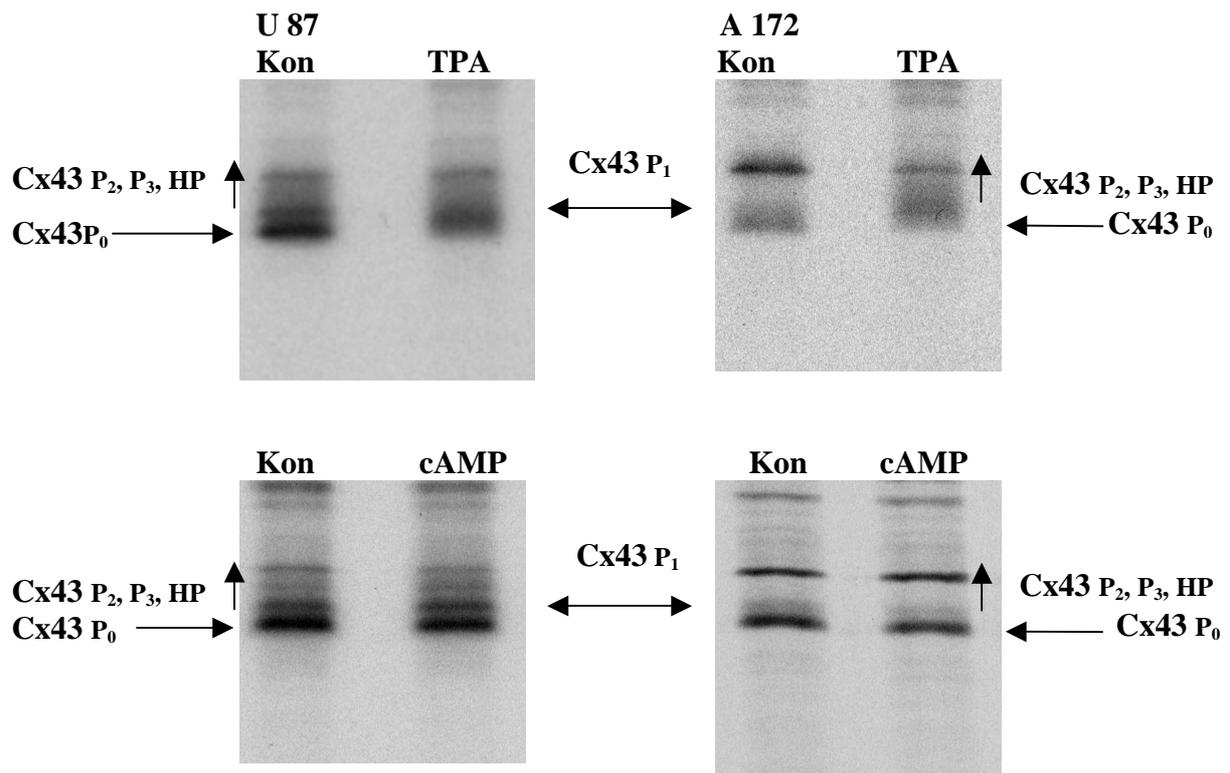
Die durchschnittliche Anzahl der koppelnden Zellen (U 87- und A 172-Zellen) wurden durch Auswertung von Neurobiotin-Mikroinjektion und anschließender Farbreaktion bestimmt. Die Werte in Anwesenheit von cAMP oder TPA wurden mit den Werten der Kontrollexperimente ohne Einsatz von Inhibitoren verglichen, die Werte der Kontrollexperimente wurden 100 % gesetzt und die anderen Werte entsprechend in prozentuale Werte umgerechnet. Die angegebene Werte in % sind die Mittelwerte der prozentualen Werte, die sich aus den verschiedenen Experimentreihen ergaben. Diese Werte sind mit Standardabweichung angegeben. Zur besseren Übersicht sind die Werte zusätzlich graphisch dargestellt.

Die Wirkung der Kinaseaktivatoren auf die beiden Gliomazellen war weitgehend identisch. Die Anwesenheit von cAMP steigerte die Kopplung um etwa den Faktor 1,5, TPA hingegen reduzierte die Kopplung um etwa den Faktor 0,75. Eine Aktivierung der Proteinkinase C

fürte also zu reduzierter Zell-Zell-Kommunikation, eine gesteigerte Konzentration an cAMP zu einem Anstieg der Zell-Zell-Kommunikation.

Die Auswirkung der beiden Reagenzien wurde auch mit Immunpräzipitationen aus Lysaten von mit cAMP und TPA behandelten Zellen untersucht.

Zuerst wurde untersucht, ob die Immunpräzipitate aus mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierten Zellen Unterschiede im Phosphorylierungsmuster von Cx43 in U 87- und A 172-Zellen aufwiesen.

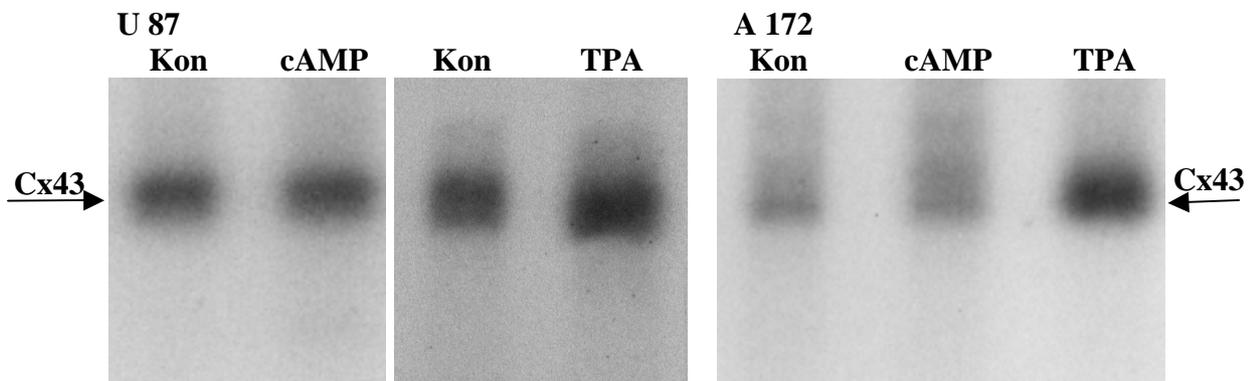


**Abbildung 4 – 31: Immunpräzipitationen aus Lysaten von U 87- und A 172-Zellen.**

Dargestellt sind die Autoradiogramme der Immunpräzipitationsexperimente aus Lysaten von metabolisch mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierten U 87- und A 172-Zellen in Anwesenheit von cAMP und TPA und von Kontrollelexperimenten (Kon). Es wurde ein spezifischer Antikörper gegen Cx43 verwendet.

Die in Abbildung 4 – 31 dargestellten Autoradiogramme zeigen, dass sich das Phosphorylierungsmuster von Cx43 in den Gliomazellen in Anwesenheit von TPA ändert. In beiden Zellen scheint die Cx43 P<sub>0</sub> Bande zu verschwinden. Eine Verbreiterung des Signals etwa in Höhe der P<sub>1</sub> Bande, welche die zuvor distinkte Bande überdeckt, spricht für eine Zunahme der Phosphorylierung, die nicht dem vorher in den Zellen nachgewiesenen Muster entspricht. Gleichzeitig nimmt die Intensität der Bande niedrigster Mobilität in A 172-Zellen ab.

Durch die Immunpräzitationen aus Lysaten nach  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat-Markierung von mit cAMP und TPA behandelten Zellen wurde untersucht, ob die Reagenzien das Ausmaß der Phosphorylierung in den Gliomazellen, repräsentiert durch das Verhältnis der Signalintensitäten der Immunpräzitate in der Autoradiographie, verändern.



**Abbildung 4 – 32: Immunpräzitationen aus Lysaten von U 87- und A 172-Zellen.**

Dargestellt sind die Autoradiogramme der Immunpräzitationsexperimenten aus Lysaten von metabolisch mit  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat markierten U 87- und A 172-Zellen in Anwesenheit von cAMP, TPA und von Kontrolleexperimenten (Kon). Es wurde ein spezifischer Antikörper gegen Cx43 verwendet.

Abbildung 4 – 32 zeigt die Autoradiogramme der Immunpräzitate der  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat-Markierung. Die Signalintensitäten wurden mit Hilfe des Programms Imagemaster densitometrisch ausgewertet.

Die Behandlung der Zellen mit cAMP hat eine minimale Steigerung der Phosphorylierung zufolge (Signalintensitäten: U 87 Kon zu cAMP wie 1 zu 1,2; A 172 Kon zu cAMP wie 1 zu 1,15). Die Steigerung der Phosphorylierung in Anwesenheit von TPA ist wesentlich größer (Signalintensitäten: U 87 Kon zu TPA wie 1 zu 1,5; A 172 Kon zu TPA wie 1 zu 2,5).

Die Auswirkung von cAMP und TPA lässt sich also auch an einer veränderten Phosphorylierung, sowohl im Ausmaß als auch in der Expression der verschiedenen Isoformen, beobachten.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der cAMP-Konzentration die Zell-Zell-Kommunikation deutlich erhöht, während aber keine bis höchstens eine geringe Veränderung des Phosphorylierungsmusters und der Gesamtphosphorylierung beobachtet werden konnte. Die Aktivierung der Proteinkinase C durch TPA resultiert in einer verminderten Kopplung und in einer Veränderung des Phosphorylierungsmusters sowie einer deutlichen Zunahme der Gesamtphosphorylierung. Qualitativ betrachtet konnten keine Unterschiede in der Wirkung der Reagenzien auf beide Gliomazellen beobachtet werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Kann die Zell-Zell-Kommunikation durch die Degradationsrate gesteuert werden?

Die für Membranproteine relativ kurze Halbwertszeit der Connexine (Kapitel 1.6.3) legt nahe, die Degradation der Connexinproteine als möglichen Regulationsmechanismus für die Zell-Zell-Kommunikation in Betracht zu ziehen (Laird et al., 1996). Neuere Ergebnisse (Saffitz et al., 2000) weisen konkret auf die Regulation der Connexindegradation als wichtigen Mechanismus der Kontrolle der interzellularen Kopplung im Herz unter normalen und pathophysiologischen Bedingungen hin. Dies würde voraussetzen, dass Zellen Möglichkeiten zur Verfügung stehen, die Degradationsrate zu variieren. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Halbwertszeit von Cx43 in verschiedenen Zellen (Kapitel 4.1) ergab, dass diese keine Zelltyp-unabhängige Größe ist, sondern sich von Zelle zu Zelle unterscheiden kann (1,9 bis 2,5 Stunden). Dies weist darauf hin, dass es in den Zellen Möglichkeiten zur Variation der Degradationsrate gibt. In den folgenden Kapiteln wird der Einfluss des Expressionsmusters der Connexine als Möglichkeit der Modulation der Degradation und die Degradationsrate als Regulationsmechanismus der Kopplung diskutiert.

#### 5.1.1 Ein Connexin kann durch die Koexpression eines weiteren Connexins gegen Abbau stabilisiert werden

Die Connexine sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, bisher wurden sechzehn Nager-Connexine beschrieben (Tabelle 1 – 1). Sie bilden die Gap Junction Kanäle, durch die die Zellen miteinander kommunizieren. Die Gründe für die molekulare Heterogenität der Connexin Kanäle (siehe Kapitel 1.4) *in vivo* blieb bisher weitgehend unklar. Das Auftreten von unerwarteten Phänotypen bei „Knock-In“-Experimenten mit Mäusen, in denen ein Connexin durch ein anderes in seiner Funktion ersetzt wurde, zeigte, dass die Aufrechterhaltung des zellulären Gleichgewichts nicht nur einfach von der Existenz einer Zell-Zell-Kommunikation, sondern auch von den spezifisch-exprimierten Connexinen abhängig ist (White und Bruzzone, 2000).

Die Connexine zeigen ein äußerst komplexes, zell- und gewebetypisches Expressionsmuster (siehe Kapitel 1.4). Einige werden ubiquitär exprimiert, andere nur sehr selten, in wenigen, spezifischen Organen und Zellen (Beyer und Willecke, 2000). Oft exprimieren Zellen mehr als ein Connexin. So werden Cx26- und Cx32-mRNA in Leber, Niere, Darm, Lunge, Magen, Milz und Gehirn gemeinsam ausgeprägt (Zhang und Nicholson, 1989). Connexin26 kann aber auch allein (in Leptomeningialzellen, Spray et al., 1991) oder mit anderen Connexinen, wie zum Beispiel Cx43 (in Pinealocyten, Saez et al., 1991) exprimiert werden. Durch die Expression von mehr als einem Connexin in einer Zelle ergibt sich eine Vielfalt von Kombinationsmöglichkeiten in der Zusammensetzung der Gap Junction Kanäle, die homomer, homotypisch, heteromer und heterotypisch aufgebaut sein können (siehe Kapitel 1.4.1).

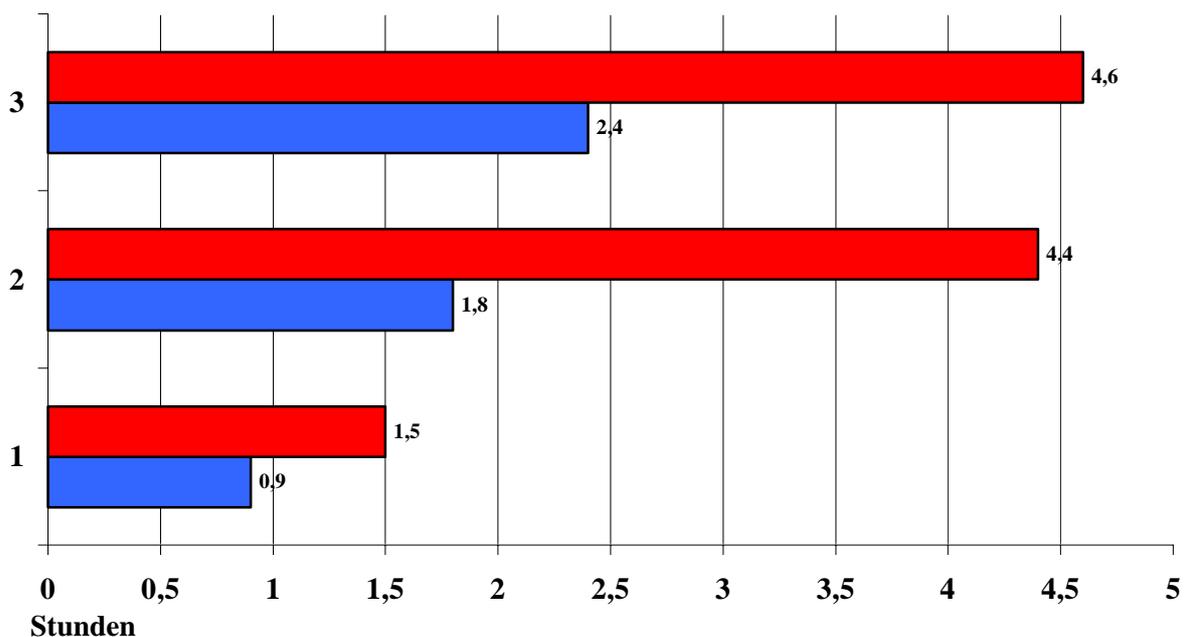
Das Expressionsmuster der Connexine in den verschiedenen Zellen legt die möglichen Connexinzusammensetzungen der Gap Junction Kanäle fest und diese bestimmt die Eigenschaften des Kanals (Kapitel 1.4.2), wie beispielsweise die Größe des Durchmessers der Kanalpore und welche Ladungen mit der Auskleidung der Pore assoziiert sind (Veenstra, 1996; Beblo und Veenstra, 1997; Bevans et al., 1999). Auch die Abhängigkeit der Öffnungswahrscheinlichkeit eines Gap Junction Kanals von der zellulären Calciumkonzentration, dem pH-Wert und der Potentialdifferenz zwischen den durch die Gap Junctions verbundenen Zellen wird durch die Connexine, aus denen der Kanal aufgebaut ist, festgelegt (Trexler et al., 1996; Veenstra, 1996; Purnick et al., 2000; Beyer et al., 2000).

Das zell- und gewebespezifische Ausprägungsmuster eines Connexins legt fest, ob ein Connexin allein oder koexprimiert mit anderen Connexinen vorliegt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass das Ausprägungsmuster der Connexine noch eine weitere Eigenschaft, neben den in vorherigen Abschnitten beschriebenen, bestimmt: die Degradationsrate.

Da ein Connexin durch die Expression eines weiteren Connexins auf Proteinebene gegen Abbau geschützt werden kann, kann das Expressionsmuster der Connexine auch die Degradationsrate der Connexine bestimmen. Dieser Zusammenhang konnte für verschiedene Connexine erstmalig nachgewiesen werden. So verursacht die fehlende Expression von Cx32 eine Verkürzung der Halbwertszeit von Cx26 um den Faktor 0,6 (Kapitel 4.2), die Halbwertszeit von Cx26 nimmt also in Anwesenheit von Cx32 um den Faktor 1,7 zu. Die zusätzliche Expression von Cx32 in HeLa-Cx26-Transfektanten führt zu einer um den Faktor 2,4 verlängerten Halbwertszeit von Cx26 in diesen Zellen (Kapitel 4.4.3). Ähnliches konnte durch vergleichende Untersuchungen in HeLa-Cx43/Cx45-Doppeltransfektanten und HeLa-

Cx45-Transfektanten gezeigt werden: die Halbwertszeit von Cx45 wird durch Koexpression von Cx43 um den Faktor 1,9 verlängert (Kapitel 4.6). Diese Ergebnisse sind in Tabelle 5 – 1 zusammengefasst.

Vergleich folgender Zellen	Cx	Connexin	Connexin	allein
		koexprimiert	exprimiert	
(1) Primäre, normale Hepatozyten und Primäre Cx32-defiziente Hepatozyten	Cx26	1,5 Stunden	0,9 Stunden	
(2) HeLa-Cx26/Cx32-Doppeltransfektanten und HeLa-Cx26-Transfektanten	Cx26	4,4 Stunden	1,8 Stunden	
(3) HeLa-Cx43/Cx45-Doppeltransfektanten und HeLa-Cx45-Transfektanten	Cx45	4,6 Stunden	2,4 Stunden	



**Tabelle 5 – 1: Auswirkung der Koexpression von Connexinen auf ihre Halbwertszeit**

Die Halbwertszeiten von Cx26, Cx32 und Cx45 in HeLa-Transfektanten, HeLa-Doppeltransfektanten und in normalen sowie Cx32-defizienten Hepatozyten wurden durch Auswertung von „Pulse-Chase“-Experimenten bestimmt. Die Werte der Halbwertszeit des allein exprimierten Connexins wurde der Halbwertszeit des Connexins, koexprimiert mit einem weiteren Connexin, gegenübergestellt. Der angegebene Wert in Stunden ist der Mittelwert aus mehreren durchgeführten Experimenten. Zur besseren Übersicht sind die Werte zusätzlich graphisch dargestellt.

Während sich die Halbwertszeiten von Cx26, koexprimiert mit Cx32, und von Cx45, koexprimiert mit Cx43, im Vergleich zu den einzeln exprimierten Connexinen deutlich

verlängert haben, bleiben die Halbwertszeiten von Cx32 (einzeln: 1,9 zu koexprimiert: 2,1 Stunden) und Cx43 (einzeln: 2,4 zu koexprimiert: 2,2 Stunden) nahezu unverändert (Kapitel 4.4.3 und 4.6). Cx32 stabilisiert Cx26 gegen Abbau und Cx43 entsprechend Cx45. Umgekehrt geht Cx26 jedoch keine stabilisierende Wechselwirkung mit Cx32 sowie Cx45 keine mit Cx43 ein. Ein bestimmtes Connexin ist in der Lage ein anders zu stabilisieren, ohne dass es selbst gegen Abbau stabilisiert wird. Die Stabilisierung von Connexinen gegen Degradation erfolgt also nicht gegenseitig, sondern einseitig. Auf welchen Wechselwirkungen der Connexine diese Stabilisierung beruht, bleibt unklar. Die in dieser Arbeit vorgestellten Resultate zeigen, dass mit der Koexpression von bestimmten Connexinen eine langsamere Degradation eines der in der Zelle exprimierten Connexins erreicht werden kann. Ebenso kann das „Abschalten“ der Expression eines Connexins durch „Knock-Out“-Experimente in den betroffenen Zellen zu einer Destabilisierung eines Connexins führen. Die Degradationsrate von Connexinen kann also durch das Expressionsmuster der Connexine in den verschiedenen Zellen moduliert werden.

### 5.1.2 Der Abbauweg von Connexin26 und Connexin32 beinhaltet lysosomale und proteasomale Degradation

Die bisherigen Untersuchungen zum Abbau der Connexine sind fast ausschließlich im Hinblick auf Cx43 durchgeführt worden. Die Ergebnisse wiesen sowohl auf eine Beteiligung von Lysosomen als auch Proteasomen am Abbau von Connexin43 hin (siehe Kapitel 1.7.2).

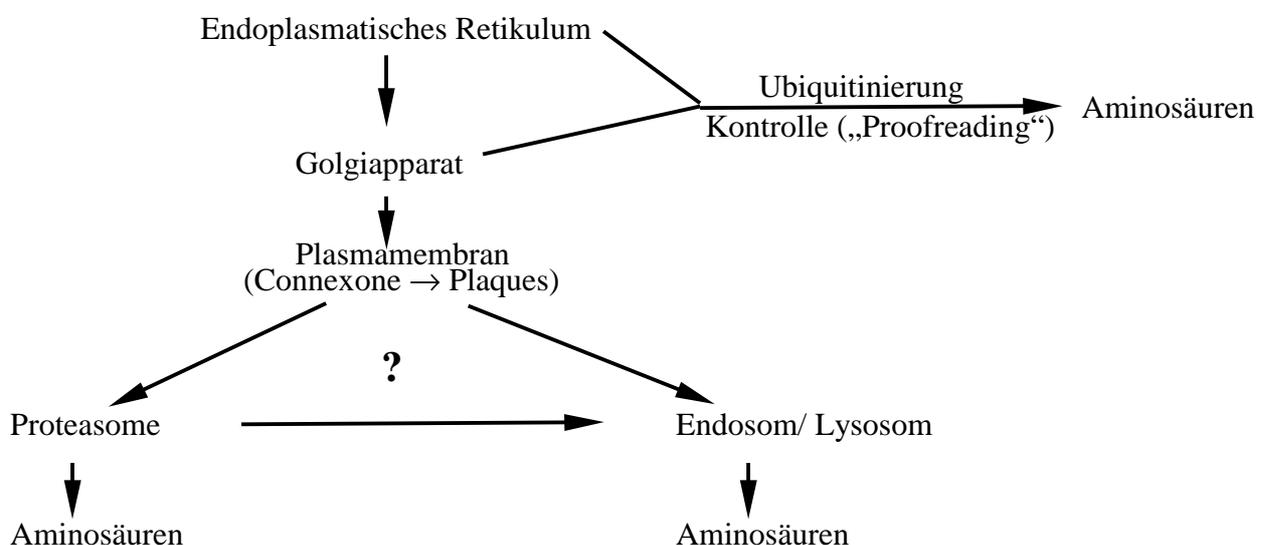


Abbildung 5 – 1: Wege der Cx43-Degradation (nach Laing et al. (1997) ins Deutsche übersetzt)

Offen ist allerdings noch, ob der lysosomal und der proteasomal vermittelte Abbau zu einem einzigen Abbauweg von Cx43 gemeinsam beitragen oder ob es zwei getrennte, alternative Abbauwege gibt (siehe Abbildung 5 – 1).

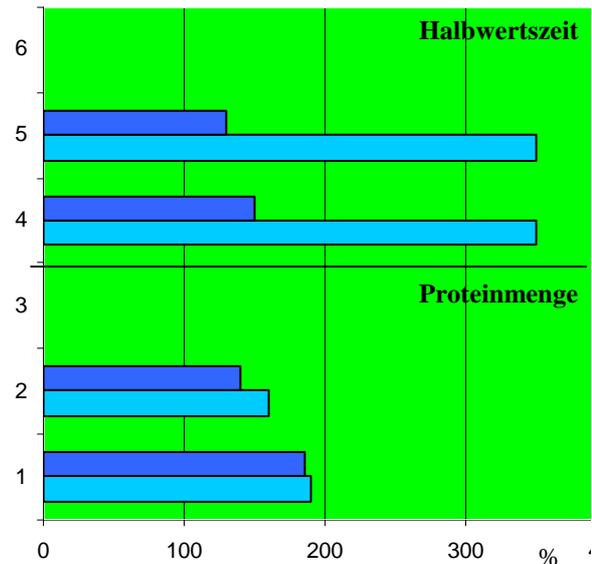
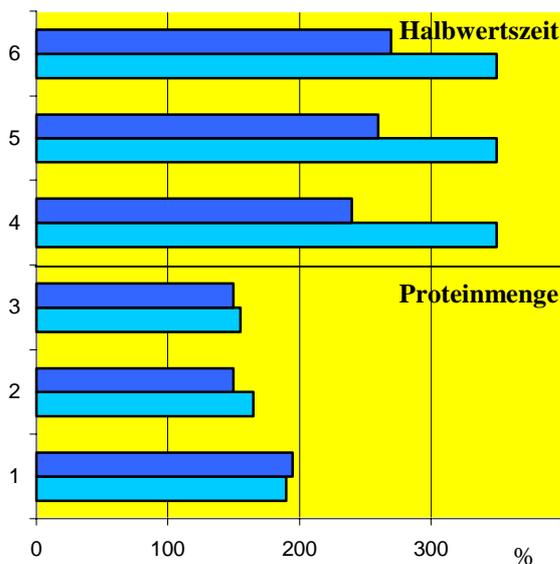
Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten mal die Degradation von Cx32 und Cx26 sowohl in primären Maushepatozyten als auch in HeLa-Cx32- und HeLa-Cx26-Transfektanten untersucht und verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass an der Degradation von Cx26 und Cx32 lysosomal als auch proteasomal vermittelter Abbau einen Anteil hat. Diese Schlussfolgerung basiert auf den Ergebnissen, dass sowohl die Hemmung des lysosomal vermittelten Abbaus durch Chloroquin als auch die Hemmung des proteasomal vermittelten Abbaus durch Lactacystin eine Steigerung der Menge an Cx26 und Cx32 in den Immunpräzipitaten und eine deutliche Verlängerung der Halbwertszeit zur Folge hat (Kapitel 4.3.1 und 4.3.2). In Tabelle 5 – 2 sind die Ergebnisse zusammengefasst und die Resultate von Cx26 denen von Cx32 gegenübergestellt.

Ein Vergleich des Anstiegs der Proteinmenge an Cx26 und Cx32 bei Inhibierung des lysosomalen Abbaus durch Chloroquin zeigt, dass die Änderung der Proteinmengen für Cx26 und Cx32 in den entsprechenden Zellen etwa gleich ist (190 % in HeLa-Einfachtransfektanten und 160/165 % in primären Hepatozyten). Ebenso ist der Einfluss der Hemmung der lysosomalen Degradation auf Cx26 und Cx32 gleich stark. In allen untersuchten Zellen verlängert sich die Halbwertszeit der beiden Connexine auf weit über sechs Stunden, das heißt innerhalb der sechsständigen Chaseperiode konnte keine Abnahme beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der lysosomale Abbau an der Degradation von Cx26 und Cx32 den gleichen Anteil hat.

Eine Hemmung des proteasomal vermittelten Abbaus durch Lactacystin steigert die Menge an Cx26 und Cx32 in den entsprechenden Zellen in ähnlichen Umfang (auf 195/185 % in HeLa-Einfachtransfektanten und auf 150/140 % in primären Hepatozyten). Die Verlängerung der Halbwertszeit ist jedoch bei Cx26 deutlich größer als bei Cx32 (240/150 % in HeLa-Einfachtransfektanten und 260/130 % in primären Hepatozyten). Der proteasomal vermittelte Abbau scheint an der Degradation von Cx26 stärker beteiligt zu sein als an der Degradation von Cx32.

Ingesamt resultiert sowohl die Inhibition lysosomal vermittelten Abbaus als auch die Inhibition des proteasomal vermittelten Abbaus in einer deutlich verminderten Degradation der beiden Connexine Cx26 und Cx32. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass beide Abbauwege zur Degradation beitragen.

	Connexin26		Connexin32	
	Chloroquin	Lactacystin	Chloroquin	Lactacystin
<b>Zelltypen</b>	<b>Änderung der Proteinmenge in % des Kontrollwertes</b>			
(1) HeLa-Einfachtransfektanten	190 %	195 %	190 %	185 %
(2) Normale Hepatozyten	165 %	150 %	160 %	140 %
(3) Cx32-defiziente Hepatocyten	155 %	150 %	-	-
	<b>Änderung der Halbwertszeit in % des Kontrollwertes</b>			
(4) HeLa-Einfachtransfektanten	>>350 %	240 %	>>350 %	150 %
(5) Normale Hepatozyten	>>350 %	260 %	>>350 %	130 %
(6) Cx32-defiziente Hepatocyten	>>350 %	270 %	-	-



**Tabelle 5 – 2: Auswirkung von Lactacystin und Chloroquin auf die Menge an detektierten Cx26 oder Cx32 sowie auf die Halbwertszeit in Wildtyp (Wt) Hepatozyten, Cx32 Knockout (Ko) Hepatozyten beziehungsweise in HeLa-Cx26- und HeLa-Cx32-Transfektanten**

Die Proteinmenge an Cx26 und Cx32 in An- und Abwesenheit von Degradationshemmern wurde in Immunpräzipitaten der Lysate metabolisch mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierter Zellen bestimmt, die Halbwertszeit mit „Pulse-Chase“-Experimenten ermittelt. Die Werte der jeweils parallel zu den einzelnen Experimenten durchgeführten Kontrollexperimente wurden als 100 % gesetzt und mit den Werten der Lactacystin- oder Chloroquin-Inkubation verglichen. Zur besseren Übersicht sind die Werte zusätzlich graphisch dargestellt.

Die Wirkung von Chloroquin auf die Menge der beiden untersuchten Connexine war bei Hepatozyten und HeLa-Transfektanten meist etwas stärker. Auch die Halbwertszeit wurde in Anwesenheit von Chloroquin deutlich stärker beeinflusst, innerhalb von sechs Stunden zeigten die „Pulse-Chase“-Experimente keinen nennenswerten Abbau der Connexine. Das könnte bedeuten, dass Lysosomen einen größeren Anteil an der Degradation haben (wenn ein gemeinsamer Abbaumechanismus angenommen wird), oder dass der lysosomale vermittelte Abbau in der Zelle wichtiger ist (wenn von zwei alternativen Abbauwegen ausgegangen wird). Dies könnte jedoch auch in einer unterschiedlichen Effizienz der Inhibitoren in der Hemmung des entsprechenden Abbauweges liegen. Lactacystin geht eine kovalente Verbindung mit einer Untereinheit des Proteasoms ein und inhibiert so spezifisch die Funktion des Multienzymkomplexes Proteasom (Fenteany et al., 1995). Da Zellen ständig neue Proteasomen synthetisieren und die Reaktion mit Lactacystin eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt, ist trotz der Inkubation mit Lactacystin ein Anteil der Proteasomen in den Zellen aktiv. Chloroquin hemmt durch eine Erhöhung des pH-Wertes die Aktivität aller pH-abhängigen lysosomalen Enzyme. Diese unterschiedlichen Wirkmechanismen können durchaus einen Unterschied in der Effizienz der Inhibitoren verursachen, der die größere Wirkung von Chloroquin erklären könnte.

Im Gegensatz dazu scheinen bei der Degradation von Cx43 in einer Herzmuskel-Zelllinie beide Abbauege gleichermaßen beteiligt zu sein. Der Einsatz von sowohl lysosomalen als auch proteasomalen Hemmern führt zu ähnlichen Ergebnissen (Laing et al., 1997). In E36-Zellen wird die Menge an Cx43-Protein und dessen Degradationsrate sogar deutlich stärker durch proteasomale Hemmer beeinflusst (Laing und Beyer, 1995). In primären Herzmuskelzellen konnte jedoch, analog zu den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen der Degradation von Cx26 und Cx32 in primären Hepatozyten und HeLa-Transfektanten, ein größerer Einfluß der lysosomalen Hemmer auf die Degradation des exprimierten Cx43 beobachtet werden (Laing et al., 1998). Offensichtlich kann der Anteil proteasomal und lysosomal vermittelten Abbaus bei Cx43 von Zelltyp zu Zelltyp variieren, dies konnte auch durch Ergebnisse von Musil und Mitarbeitern (2000) bestätigt werden, die die Auswirkung von Hemmern des lysosomalen und proteasomalen Proteinabbaus in parallelen Experimenten an mehreren Cx43-exprimierenden Zellen testeten. Hingegen besteht bei Cx26 und Cx32, zumindest in primären Hepatozyten und HeLa-Transfektanten, kein qualitativer Unterschied in Auswirkungen der Inhibitoren des lysosomalen und proteasomalen Abbaus.

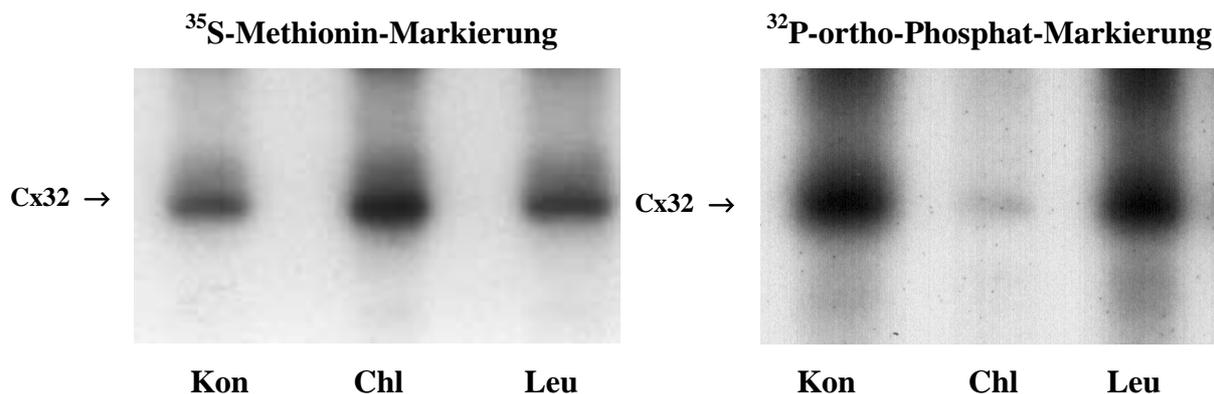
### **5.1.3 Die Hemmung der lysosomalen Degradation führt zu einer Anreicherung von deutlich schwächer phosphoryliertem Cx32 im Vergleich zur Kontrolle**

In HeLa-Transfektanten und Hepatozyten liegt phosphoryliertes Cx32 vor (siehe Abbildung 4 – 14 und 4 – 15). Die Phosphorylierung von Cx32 ist schon vielfach untersucht worden. So ist bekannt, dass Cx32 *in vitro* durch Serin/Threonin-Proteinkinasen phosphoryliert werden kann (Saez et al., 1998). Auch die EGF-Rezeptor-Kinase ist in der Lage Cx32 an Tyrosinresten zu phosphorylieren (Diez et al., 1998). Es konnte bisher aber noch nicht aufgeklärt werden, welche Rolle ein verändertes Ausmaß der Phosphorylierung von Cx32 bezüglich der Regulation der Zell-Zell-Kommunikation spielt. Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass die Phosphorylierung von Cx32 eine Rolle für die Regulation der Zell-Zell-Kommunikation spielt (Traub et al., 1987). Auch konnte nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung von Cx32 die Entfernung des Connexins aus der Membran und seine Proteolyse verhindern kann (Saez et al., 1989, Elvira et al., 1993 und 1994). Ebenso konnte der Phosphorylierungsgrad anderer Connexine in Zusammenhang mit ihrer Degradation gebracht werden. So zeigten Laird und Mitarbeiter (1995), dass eine Korrelation zwischen dem Verlust von höher phosphorylierten Isoformen von Cx43 und einer beschleunigten Degradation der Gap Junction Plaques zu bestehen scheint.

In Kapitel 4.3.4 konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung des proteasomalen Abbaus die Menge an phosphorylierten Cx32 steigert. Die Autoradiographien der Cx32-Immunpräzipitate aus Lysaten mit radioaktivem Methionin sowie mit radioaktiven ortho-Phosphat markierten Zellen zeigten in beiden Fällen eine deutliche Steigerung der Signalintensität der mit Lactacystin behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 4 – 16). Für die Hemmung der lysosomalen Degradation mittels Chloroquin ergab sich ein gegensätzliches Resultat. Die Signalintensität der mit <sup>35</sup>S-Methionin markierten und immunpräzipitierten Lysate der Chloroquin-behandelten Zellen waren im Vergleich zur Kontrolle wesentlich größer (Intensitäten ca. 1,9 zu 1), während die Signale der mit <sup>32</sup>P-ortho-Phosphat markierten und immunpräzipitierten Lysate der Chloroquin-behandelten Zellen deutlich schwächer waren (Intensitäten ca. 0,15 zu 1). Zieht man in Betracht, dass die Menge an Cx32 um den Faktor 1,9 zunahm, führt eine Inhibierung des lysosomalen Abbaus mittels Chloroquin zu einer Abnahme des Phosphorylierungsgrad von Cx32 auf unter 10 % der in den Kontrollexperimenten vorhandenen Phosphorylierung.

Die eine Aminogruppe enthaltende Verbindung Chloroquin hemmt zwar die Aktivität der lysosomalen Proteasen durch die Anhebung des pH-Wertes, nicht aber die Endozytose von Membranproteinen und ihren Transport zu den Lysosomen (Fritsch et al., 1988). Wird der lysosomale Abbau durch Chloroquin gehemmt, können sich die Connexine in den Lysosomen und in der Membran ansammeln. Die Herabregulation der Degradation findet also nicht durch eine Verhinderung des Abbaus statt, sondern der begonnene Abbau wird unterbrochen. Die Ergebnisse zeigen, dass einer der ersten Schritte des lysosomal vermittelten Abbaus von Cx32 die Dephosphorylierung zu sein scheint.

Es ist bekannt, dass Chloroquin in hoher Konzentration (10 mM und höher) die Phosphorylierung bestimmter Proteine in Hefezellen teilweise hemmen kann. Die in dieser Arbeit eingesetzte Chloroquinkonzentrationen betrug maximal 300  $\mu$ M. Somit ist es unwahrscheinlich, dass eine Inhibierung der Phosphorylierung durch die Anwesenheit von Chloroquin verursacht wurde. Um zu bestätigen, dass die Anreicherung von schwächer phosphoryliertem Cx32 auf den unterbrochenen lysosomal vermittelten Abbau und nicht auf eine „Nebenwirkung“ von Chloroquin zurückzuführen ist, wurden die Markierungen mit radioaktivem  $^{35}$ S-Methionin und  $^{32}$ P-ortho-Phosphat in An- und Abwesenheit von Leupeptin wiederholt (siehe Abbildung 5 - 2). Leupeptin ist ein Peptid, das in Lysosomen vorkommende Serin-Proteasen aber auch weitere Proteasen hemmen kann (Aoyagi et al., 1969).



**Abbildung 5 - 2: Immunpräzitationen von Cx32 aus Zelllysatenen von Cx32 exprimierenden HeLa-Transfektanten in An- und Abwesenheit von Leupeptin.**

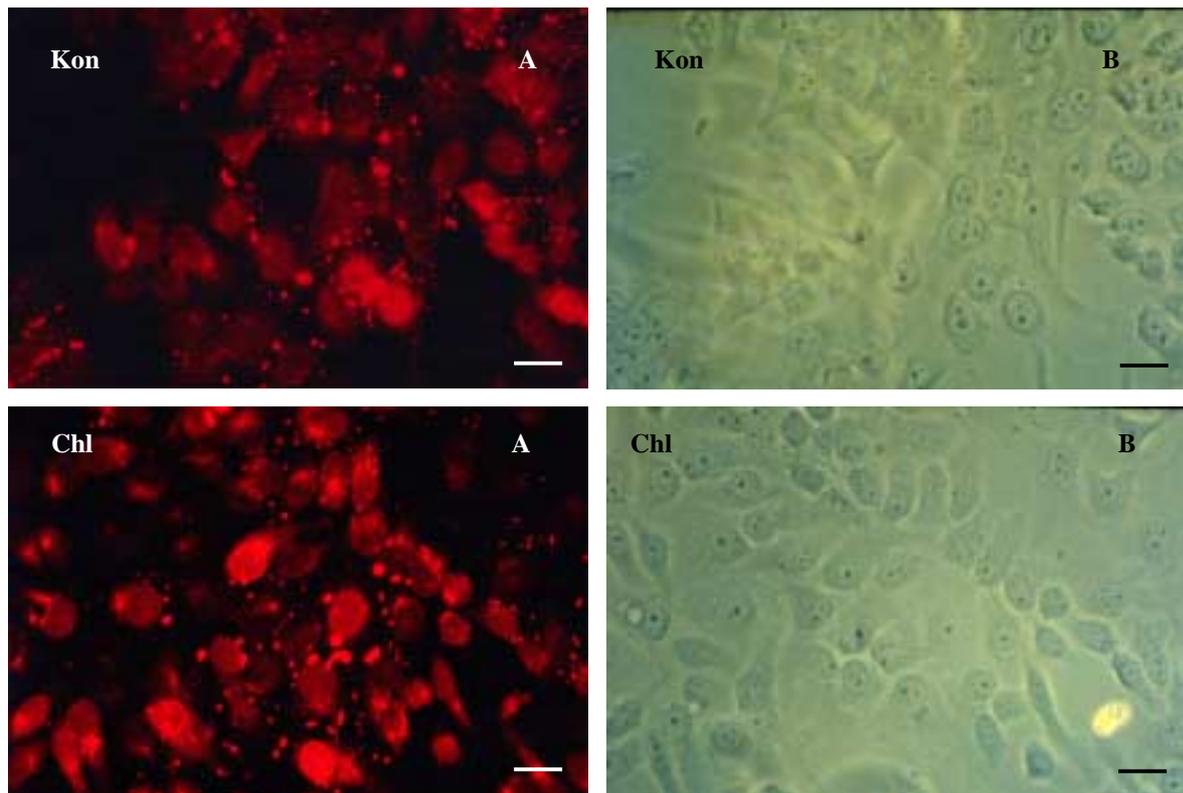
Die Zellen wurden mit  $^{35}$ S-Methionin (linke Spalte) oder  $^{32}$ P-ortho-Phosphat (rechte Spalte) metabolisch markiert. Während des „Pulse“ wurde ein Drittel der Kulturschalen mit Leupeptin inkubiert (Leu), ein Drittel mit Chloroquin und die anderen Zellen dienten als Kontrolle (Kon). Cx32 wurde aus den Lysaten immunpräzipitiert und nach Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie detektiert.

Die Verwendung des Proteasehemmers Leupeptin zeigte im Vergleich zu Chloroquin nur einen moderaten Effekt, es konnte eine Steigerung der Menge an Cx32-Protein auf 135 bis 150 % in HeLa-Cx32-Transfektanten beobachtet werden, während mit Chloroquin eine Steigerung auf durchschnittlich 190 % (siehe Tabelle 5 – 2) erzielt wurde.

Ein Vergleich der Signalintensitäten der immunpräzipitierten mit  $^{32}\text{P}$ -orthoPhosphat markierten HeLa-Cx32-Lysate ergab ein Verhältnis der Intensitäten von 1 (Kontrolle) zu 0,8 (Leupeptin). Damit ist die Verringerung des Signals geringer, als dies für die Inkubation mit Chloroquin gezeigt werden konnte. Zieht man die Steigerung der Proteinmenge unter Einfluss von Leupeptin (Faktor 1,4) in Betracht, so beträgt der Phosphoryierungsgrad von Cx32 ca. 60 % des Phosphoryierungsgrads, der in den Kontrollzellen beobachtet werden konnte. Leupeptin verursacht einen geringeren Verlust der Phosphorylierung von Cx32 als Chloroquin. Dies kann durch die insgesamt schwächere Wirkung von Leupeptin erklärt werden, die an der geringeren Steigerung der Proteinmenge zu sehen ist.

Die Ergebnisse der Inkubation mit Leupeptin bestätigt also das Ergebnis einer reduzierten Phosphorylierung von Cx32 bei Hemmung des lysosomalen Abbaus. Dies weist darauf hin, dass die Dephosphorylierung von Cx32 einer der ersten Schritte sein könnte, die den lysosomal vermittelten Abbau einleiten.

Ob die Dephosphorylierung von Cx32 schon in der Plasmamembran, auf den Weg zu den Lysosomen oder in den Lysosomen stattfindet ist offen. Immunfluoreszenzanalysen (Abbildung 5 – 3) von unbehandelten im Vergleich zu mit Chloroquin behandelten HeLa-Cx32-Transfektanten zeigen, dass auch in mit Chloroquin inhibierten Zellen ein großer Anteil des exprimierten Cx32 in den Plasmamembranen lokalisiert ist. Die Immunfluoreszenzsignale von Cx32 an den Kontaktmembranen sind bei den mit Chloroquin behandelten Zellen etwas größer und stärker. Der Zuwachs der Signale an den Kontaktmembranen entspricht nicht der deutlichen Steigerung der Menge an Cx32-Protein. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich entweder eine große Menge an vereinzelt Gap Junction Kanälen zusätzlich in der Plasmamembran befinden und/oder weitere Connexinmoleküle intrazellulär, zum Beispiel in Lysosomen, vorliegen. Beides kann mit der durchgeführten Immunfluoreszenzanalyse nicht nachgewiesen werden. Da in Anwesenheit von Chloroquin der Phosphoryierungsgrad von Cx32 aber nur etwa 10 % im Vergleich zu Kontrollzellen beträgt, ist es wahrscheinlich, dass die im Zusammenhang mit dem lysosomal vermittelten Abbau stattfindende Dephosphorylierung von Cx32 schon in der Plasmamembran beginnt.



**Abbildung 5 – 3: Immunfluoreszenzanalysen von HeLa-Cx32-Zellen in An- und Abwesenheit von Chloroquin**

Mit Chloroquin (Chl) inkubierte HeLa-Cx32-Transfektanten wurden mit unbehandelten Zellen (Kon) verglichen. Cx32 wurde durch den spezifischen Antikörper erkannt und durch Cy3-konjugierten zweiten Antikörper nachgewiesen. Der Balken entspricht ca. 15  $\mu\text{m}$ .

A: Fluoreszenzaufnahme, B: Phasenkontrastaufnahmen.

#### **5.1.4 Die Degradationsrate beeinflusst die Zell-Zell-Kommunikation**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Zell-Zell-Kommunikation auf der Ebene der Degradation reguliert werden kann (Urschel et al., International Gap Junction Conference 1999). Durch die Herabregulierung der Degradation bei Verwendung von Lactacystin und Chloroquin kann eine Anreicherung von funktionell aktivem Gap Junction Proteinen erreicht werden, die eine Zunahme der Zell-Zell-Kommunikation ermöglichen.

Die Inhibierung des lysosomal und proteasomal vermittelten Abbaus in Cx26-exprimierenden Zellen (HeLa-Cx26-Transfektanten, normale und Cx32-defiziente Hepatozyten) führt zu einer deutlichen Steigerung der Kopplung auf bis zu über 180 % des Wertes, der in Kontrollzellen

bestimmt wurde (Kapitel 4.3.3). Ebenso führt die Hemmung der proteasomalen Degradation in Cx32-exprimierenden Zellen (HeLa-Cx26-Transfektanten und normale Hepatozyten) zu einer ähnlichen Steigerung der Kopplung auf bis zu über 170 %. Die Hemmung der lysosomalen Degradation resultiert jedoch nicht in einer Änderung der Zell-Zell-Kommunikation in Zellen, die nur Cx32 ausprägen. Der für die Kopplung der HeLa-Cx32-Transfektanten bestimmte Wert für Chloroquin-behandelte Zellen unterschied sich nicht vom Wert der Kontrolle (Chloroquin-behandelte Zellen: 98 %, Kontrolle: 100 %). Der Wert, der für die Kopplung von Chloroquin-inkubierten normalen Hepatozyten, die sowohl Cx32 als auch Cx26 exprimieren, bestimmt wurde, lag mit 153 % des Kontrollwertes in der Mitte der Werte für HeLa-Cx32-Transfektanten (98 %) und für Cx32-defiziente Hepatozyten (184 %). Diese Werte legen nahe, dass in den Hepatozyten nur die durch Cx26 vermittelte Kopplung anstieg und Cx32 nicht zur Steigerung beitrug.

An verschiedenen Cx43-exprimierenden Zellen durchgeführte Untersuchungen (Musil et al., 2000) zeigten ähnliche Ergebnisse. Sowohl die Inhibierung des lysosomalen als auch des proteasomalen Abbaus führte zu einer Verminderung der Degradation des exprimierten Cx43, jedoch nur die Hemmung der proteosomally vermittelten Degradation resultierte in einer deutlichen Steigerung der Kopplung. Inhibitoren der Lysosomenaktivität beeinflussten die Zell-Zell-Kommunikation nicht.

Cx43 liegt ebenso wie Cx32 in Zellen teilweise in phosphorylierten Isoformen vor. Die in Kapitel 5.1.3 diskutierten Ergebnisse legen nahe, dass die Ursache für eine unveränderte Kopplung, trotz der deutlich gesteigerten Proteinmenge, die Dephosphorylierung der Connexine im Zuge des lysosomal vermittelten Abbaus ist.

Insgesamt deuten die Ergebnisse auf zwei mögliche Modelle für die Degradation von Connexinen hin:

1. Die gemeinsame Beteiligung des proteasomalen und lysosomalen Abbaus an der Degradation der Connexine (Abbildung 5 – 4.1). Der proteosomally vermittelte Abbau (keine Dephosphorylierung) geht hier dem lysosomal vermittelten Abbau (jetzt findet die Dephosphorylierung statt) voraus.
2. Proteosomally vermittelter Abbau und lysosomal vermittelter Abbau sind zwei alternative Systeme die der Zelle zum Abbau der Connexine zur Verfügung stehen, wobei ein Schritt des lysosomalen Abbaus die Dephosphorylierung der phosphorylierten Connexinisoformen ist (Abbildung 5 – 4.2).

Für das erste Modell sprechen starke Effekte, die sich in der Verlängerung der Halbwertszeit sowie die Steigerung der Proteinmenge und der Kopplung widerspiegeln, die sowohl die Inhibierung der lysosomalen als auch der proteasomalen Degradation bewirken. Diese konnten nicht nur in den in dieser Arbeit untersuchten Zellen, sondern auch noch in einigen andern nachgewiesen werden (Laing und Beyer, 1995, Laing et al., 1997 und 1998, Musil et al., 2000, VanSlyke et al., 2000). Dies deutet auf eine Hemmung der gesamten Connexindegradation mit jeweils beiden Inhibitoren hin.

Neuere Ergebnisse von Jordan und Mitarbeitern (2001) deuten drauf hin, dass es in Zellen zwei alternative Abbauege für Connexine geben könnte. Es konnte gezeigt werden, dass annuläre Gap Junction Zwischenstufen lysosomalen Abbaus der Gap Junctions sind. Da diese aber nicht in allen Zellen in einer Häufigkeit nachgewiesen werden können, die die schnelle Degradation der Connexine erklärt, ist ein zweiter - möglicherweise proteasomaler - Abbaueweg wahrscheinlich.

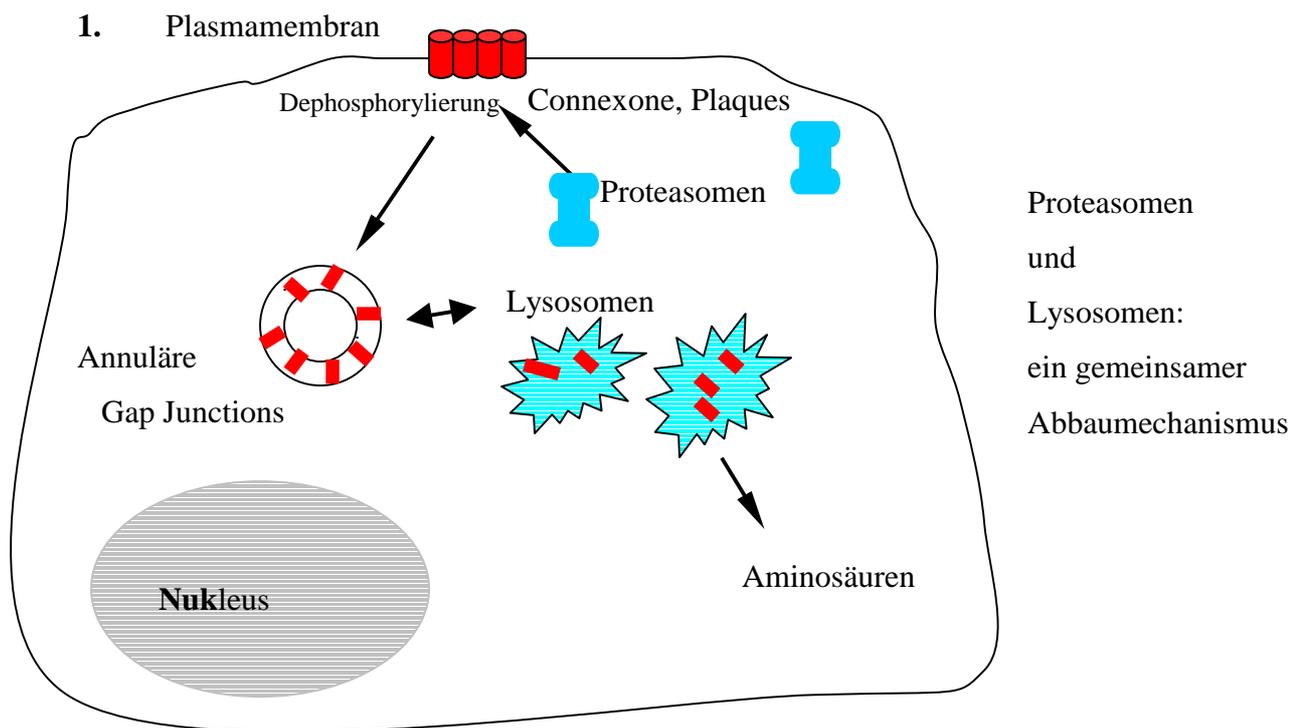


Abbildung 5 – 4 1.: Wege der Cx43-Degradation in einer Zelle

## 2. Plasmamembran

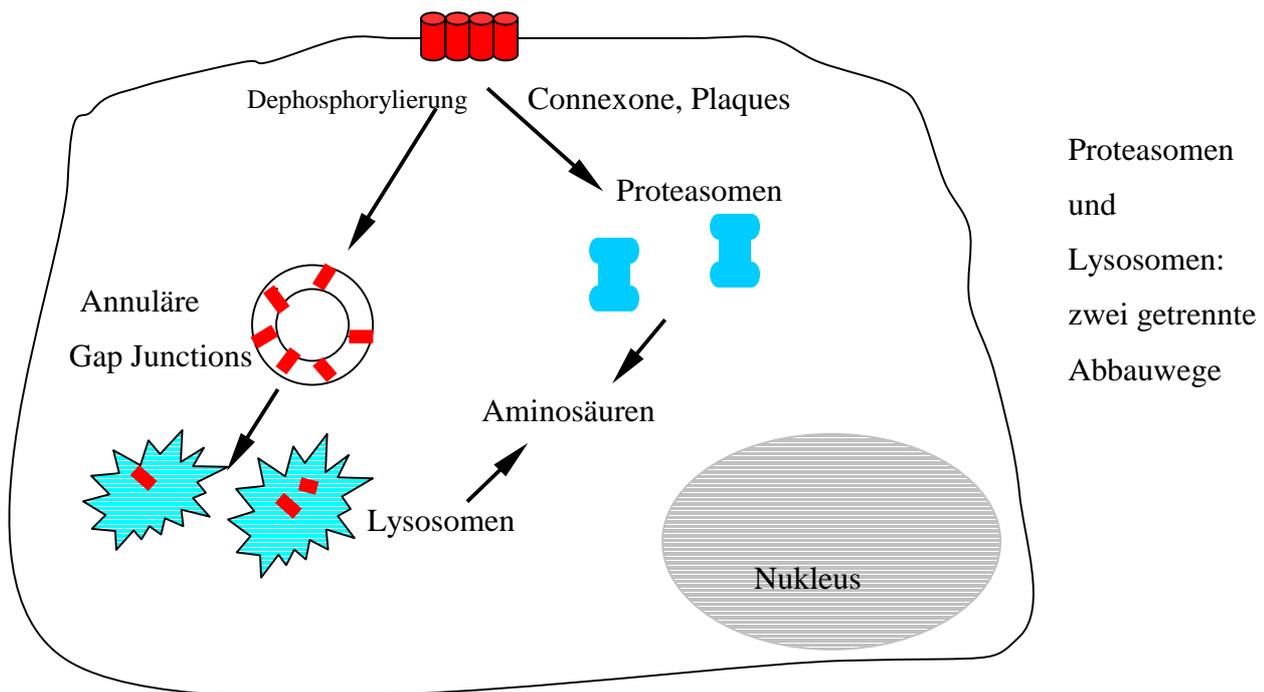


Abbildung 5 – 4 2.: Wege der Cx43-Degradation in einer Zelle

## 5.2 HeLa-Transfektanten: ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Degradation

Die Transfektion von Connexinen in kommunikationsdefizienten HeLa-Zellen ist schon erfolgreich für viele Fragestellungen, insbesondere für die vergleichende Untersuchung der Eigenschaften der durch verschiedene Connexine oder mutierte Connexine gebildeten Gap Junction Kanäle, angewandt worden (Willecke und Haubrich, 1996). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass HeLa-Transfektanten auch ein geeignetes System zur Untersuchung der Degradation der Connexine sind.

Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Connexine in der Lage sind, andere Connexine auf Proteinebene gegen Degradation zu stabilisieren. Für diese Fragestellung standen mit den primären, embryonalen, normalen Maushepatozyten ein ideales Zellsystem zur Verfügung. Die Kultivierung von primären Zellen ist jedoch zeitaufwendig und die in den Zellen

exprimierten Connexine sind nicht beliebig variierbar, sondern von dem zellspezifischen Ausprägungsmuster der Connexine vorgegeben.

In Hepatozyten von normalen Mausembryonen ist die Halbwertszeit von Cx26 um etwa den Faktor 2 größer als in Hepatozyten von Cx32-defizienten Mausembryonen. Dieser Verlängerungseffekt wurde auch in HeLa-Cx26/Cx32-Doppeltransfektanten beobachtet. Die Stabilisierung eines Connexins durch die Existenz eines anderen konnte auch im artifiziellen Zellsystem der HeLa-Transfektante untersucht werden. Hier konnte auch die Stabilisierung von Cx45 durch Cx43 nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der Abbauwege von Cx26 und Cx32 wurde durch die Behandlung von Zellen mit Inhibitoren des lysosomalen und proteasomalen Degradation durchgeführt. Es zeigte sich, dass die durch die Inhibitoren verursachten Änderungen in den Zellen, verlängerte Halbwertszeit und gesteigerte Proteinmenge sowie erhöhte Kopplung, sowohl in den primären Zellen als auch in den HeLa-Transfektanten beobachtet werden konnte (Kapitel 4.4.1, 4.3.2. und 4.3.3). Die Effekte der Inhibitoren waren in den HeLa-Transfektanten zumeist sogar stärker ausgeprägt.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass HeLa-Transfektanten ein geeignetes System zur Untersuchung der Degradation der Connexine sind.

### **5.3 Bilden Connexin26 und Connexin32 heteromere Kanäle?**

Die Möglichkeit der Bildung von heteromeren Gap Junction Kanälen, insbesondere in Hepatozyten, wurde schon mehrmals untersucht. Unter Verwendung eines zellfreien Transkriptions-Translations-System konnte die Bildung von heteromeren Halbkanäle aus Cx26 und Cx32 nachgewiesen werden (Ahmad et al., 1999). Auch in mit Cx26 und Cx32 transfizierten Insektenzellen konnte dies beobachtet werden (Stauffer et al., 1995). Die Untersuchung der elektrischen Eigenschaften von Gap Junction Kanälen in primären Hepatozyten (Valiunas, et al., 1999) ergaben kein eindeutiges Resultat: Homotypische und heterotypische Kanäle konnten nachgewiesen, die Anwesenheit von heteromeren Gap Junction Kanälen nicht ausgeschlossen werden. Anderen Untersuchungen analysierten die pH-Sensitivität der Gap Junctions in Hepatozyten und fanden weitere Hinweise für die Bildung von heteromeren Gap Junction Kanälen in diesen Zellen (Lee et al., 1998).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationen mit Antikörpern spezifisch gegen Cx26 beziehungsweise Cx32 ergaben stets beide Connexinbanden für

Zellen die beide Connexine exprimierten (Kapitel 4.5). Eine Kreuzreaktion des Antikörpers konnte ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 4 – 22). Interessanterweise konnte aus einem Gemisch der Lysate von HeLa-Cx26- und HeLa-Cx32-Transfektanten nur jeweils eine Bande immunpräzipitiert werden (siehe Abbildung 4 – 23). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Koimmunpräzipitation von Cx26 mit Cx32 oder von Cx32 mit Cx26 auf Wechselwirkungen beruht, die sich erst während des Immunpräzipitationsexperimentes ausbilden. Auch die Immunpräzipitation aus Lysaten von kokultivierten HeLa-Cx26- und HeLa-Cx32-Transfektanten, hier können neben homomeren und homotypischen auch heterotypische Kanäle ausgebildet werden, ergab nur jeweils eine Bande, während Immunpräzipitate von HeLa-Cx26/Cx32-Doppeltransfektanten zwei Banden aufwiesen (siehe Abbildung 4 – 23). Die Koimmunpräzipitation von Cx26 und Cx32 geht also auf Wechselwirkungen zurück, die sich nicht in kokultivierten HeLa-Cx26- und HeLa-Cx32-Transfektanten, sondern nur in Hepatozyten und HeLa-Cx26/Cx32-Doppeltransfektanten ausbilden können.

Insgesamt sind diese Ergebnisse ein Hinweis auf die Existenz heteromerer Gap Junction Kanäle in HeLa-Cx26/Cx32-Doppeltransfektanten und Hepatozyten.

#### **5.4 Die Beeinflussung der Kopplung durch Reagenzien, die das Phosphorylierungsmuster verändern können**

Die Phosphorylierung der Connexine kann die Zell-Zell-Kommunikation regulieren (Kapitel 1.6.1). Um die Funktion der Gap Junctions zu untersuchen und zu modulieren, wurden schon vielfach Proteinkinase-Aktivatoren und -Hemmer eingesetzt. Es scheint jedoch, dass die gleichen Phosphorylierungsbedingungen in unterschiedlichen Zellen, die auch verschiedene Connexine exprimieren können, andere Wirkung zeigen können (Kwak et al., 1995). Auch die Phosphorylierung von Cx43 kann die Gap Junction Funktion positiv und negativ beeinflussen (zusammengefasst von Lampe und Lau, 2000).

Reagenzien, die das zelluläre cAMP-Niveau anheben, erhöhen meist die Gap Junction Kommunikation, indem sie zum Beispiel die Phosphorylierung der Connexine steigern (Saez et al., 1986; Traub et al., 1987, Atkinson et al., 1995; Burghardt et al., 1995; Darrow et al., 1996). Phorbolster wie TPA und andere Reagenzien, die die Proteinkinase C aktivieren, führen in der Regel zu einer Inhibierung der Kopplung (Kwak et al., 1995; Lampe et al., 2000).

Die beiden Glioma-Zelllinien U 87 und A 172 exprimieren Cx43 auf ähnlichen Niveau (Verhältnis des ausgeprägten Cx43-Proteins: 1 (A 172) zu 1,4 (U 87), siehe Abbildung 4 – 26). Auch die für Cx43 bestimmte Halbwertszeit ist fast gleich, sie beträgt in U 87-Zellen 1,9 Stunden und in A 172-Zellen 2,1 Stunden (siehe Tabelle 4 – 9). Dennoch ist die Zell-Zell-Kommunikation, bestimmt durch die Kopplung nach Neurobiotin-Injektion, in A 172-Zellen deutlich geringer als in U 87-Zellen (siehe Tabelle 4 – 9). Es konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede in der Kopplung der beiden Zelllinien wahrscheinlich auf das Phosphorylierungsmuster, die Ausprägung der verschiedenen phosphorylierten Isoformen von Cx43, in den jeweiligen Zellen zurückzuführen ist (Kapitel 4.7.1).

Die Untersuchung des Einflusses von cAMP und TPA auf die Zell-Zell-Kommunikation und das Phosphorylierungsmuster von Cx43 sollte zeigen, ob die Unterschiede in der Kopplung der beiden Zellen durch die Änderung des Phosphorylierungsmusters angeglichen werden könnten oder ob in beiden Zelllinien, trotz der Unterschiede, ähnliche Effekte beobachtet werden könnten.

Die Steigerung der zellulären cAMP-Konzentration durch Inkubation mit dbcAMP, führte in beiden Zellen zu einer Steigerung der Kopplung auf 150 % (Tabelle 4 – 10), obwohl die Steigerung der Gesamtphosphorylierung von Cx43 nur minimal war und auch keine Steigerung der Proteinmenge beobachtet werden konnte (Abbildungen 4 – 31 und 4 - 32). Das zeigt, dass die Regulierung der Zell-Zell-Kommunikation über minimale Änderungen erfolgen könnte. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass der sekundäre Botenstoff cAMP, der vielfältig Signalkaskaden auslösen kann, die interzelluläre Kommunikation auch durch andere Faktoren als die Phosphorylierung und Menge an exprimierten Cx43 beeinflussen kann. So kann beispielsweise die Erhöhung der zellulären cAMP-Konzentration in manchen Zellen zu einer Änderung der Leitfähigkeit führen (Saez et al., 1986; Burt und Spray, 1988; Spray et al, 1991).

Die Aktivierung der Proteinkinase C durch TPA resultierte in beiden Zellen in einer Inhibierung der Gap Junction Kommunikation (auf 74 beziehungsweise 81 % der Kontrollwerte (Tabelle 4 – 10). In beiden Zelllinien war eine Veränderung des Phosphorylierungsmusters (Abbildung 4 – 31) und eine Zunahme der Gesamtphosphorylierung zu beobachten (Abbildung 4 - 32). Es konnte jeweils eine Abnahme der P<sub>0</sub>-Isoform und das Auftreten einer neuen, diffuse Bande in der Höhe um P<sub>1</sub> bis P<sub>2</sub> festgestellt werden. Cx43 ist normalerweise hauptsächlich an Serinresten phosphoryliert (Lampe und Lau, 2000). Eine Aktivierung der Proteinkinase C durch TPA könnte zu Phosphorylierung von Cx43 an Serinresten führen, die ohne diese verstärkte Aktivierung der

Proteinkinase C nicht möglich wäre. So könnte eine Cx43-Isoform mit verändertem Laufverhalten entstehen, die in den Kontrollexperimenten nicht vorhanden ist. Erstaunlich ist, dass die Gesamtphosphorylierung von Cx43 in A 172- wesentlich stärker zunimmt als in U 87-Zellen (Kapitel 4.7.2). Die Phosphorylierung in Gegenwart von TPA beträgt in A 172-Zellen 250 % und in U 87-Zellen 150 % der unbehandelten Kontrollzellen. In A 172-Zellen liegt Cx43 hauptsächlich unphosphoryliert ( $P_0$  oder NP Isoform) vor. Es scheint, dass unphosphoryliertes Cx43 wesentlich leichter durch die Proteinkinase C phosphoryliert werden kann als phosphorylierte Isoformen.

## 5.5 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente ergaben, dass bestimmte Connexine durch Koexpression eines weiteren stabilisiert werden können. Der Mechanismus der Stabilisierung ist aber weitgehend unklar. Aus den Resultaten kann nur abgeleitet werden, dass die Stabilisierung der Connexine auf Proteinebene gegen die beiden möglichen Abbauwege, lysosomal vermittelter Abbau und proteasomal vermittelter Abbau, gleichermaßen zu schützen scheint. So ist die Steigerung der Proteinmenge an Cx26 sowie die Verlängerung der Halbwertszeit durch Inhibitoren des lysosomalen und proteasomalen Abbaus in Cx32-defizienten und normalen Hepatozyten fast gleich. Weitere Untersuchung des Mechanismus der Stabilisierung, zum Beispiel durch in HeLa-Zellen transfizierte Domänen austauschmutanten von Cx32 und Cx26, könnten auch zur weiteren Aufklärung des Degradationsmechanismus der Connexine beitragen. Experimente mit HeLa-Cx26/Cx32-Doppeltransfektanten, die Cx26 und Cx32 in verschiedenen Verhältnissen exprimieren, könnten zeigen, welche Menge an Cx32 nötig ist, um Cx26 zu stabilisieren oder ob es einen linearen Zusammenhang zwischen der Degradationsrate und der Größe des Verhältnisses der Menge an Cx26 und Cx32 gibt. Die Untersuchung von Hepatozyten, die nur Cx32 exprimieren, es wird daran gearbeitet Cx32 anstelle von Cx26 in Mäusen zu exprimieren (persönliche Mitteilung von T. Ott), würde zeigen, wie primäre Zellen auf den Verlust von Cx26 reagieren und könnten die in HeLa-Cx26-Transfektanten gewonnenen Ergebnisse bestätigen.

Ein Thema von physiologischer Bedeutung ist die Regulation der Zell-Zell-Kommunikation durch die Degradation. Es konnte gezeigt werden, dass die Connexindegradation durch das Expressionsmuster in den verschiedenen Zellen moduliert werden kann. Des weiteren führt

die Inhibition proteosomalen Abbaus zu einer Heraufregulation der durch Cx26 und Cx32 vermittelten Kopplung. Ebenso kann eine Steigerung der durch Cx26 vermittelten Zell-Zell-Kommunikation durch die Hemmung des lysosomalen Abbaus erreicht werden. Ein wichtiges Ziel der zukünftigen Forschung wird es sein, weitere Faktoren zu finden, die die Degradationsrate der Connexine in den Zellen modulieren kann. Solche Faktoren könnten den Zellen ermöglichen, sehr schnell, durch die Modulation der Degradation und somit durch die Regulation der Zell-Zell-Kommunikation, auf äußere Einflüsse zu reagieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl der lysosomal vermittelte Abbau als auch der proteasomal vermittelte Abbau einen Anteil an der Degradation von Cx32 und Cx26 haben. Diese Ergebnisse stimmen mit den publizierten Daten für Cx43, exprimiert in verschiedenen Zellen, und Cx32 beziehungsweise mutiertem Cx32, ausgeprägt in PC 12-Zellen, überein (Laing und Beyer, 1995, Laing et al., 1997 und 1998, Musil et al., 2000, VanSlyke et al., 2000).

Noch immer sind viele Teile des Puzzles der Degradation der Connexinproteine nicht entdeckt. Sicher scheint nur, dass sowohl der proteasomale und der lysosomale Abbau an der Degradation der Connexine teilhaben. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen müssen, ob beide Abbauewege zu einem Mechanismus der gemeinsamen Degradation beitragen oder ob es zwei alternative Abbaumechanismen gibt. Jordan und Mitarbeiter konnten zeigen, dass annuläre Gap Junctions einen Teil der Abbaueweges der Connexine bilden und sehr wahrscheinlich in den lysosomalen Abbaueweg münden. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Möglichkeit lysosomalen Abbaus ohne eine Beteiligung von annulären Gap Junctions (Jordan et al., 2001) besteht. Der Nachweis verminderter Phosphorylierung von Cx32 bei Inhibierung des lysosomalen Abbaus hat ein weiteres Puzzleteil aufgedeckt. Weitere Experimente werden zeigen, ob sich diese Beobachtung auch auf andere Connexine übertragen lässt.

Weitgehend unklar ist die Beteiligung der Proteasomen an der Degradation der Connexine. Zwar konnten Laing und Beyer (1995) einen Hinweis für die Ubiquitinierung von Cx43 erbringen, aber ein konkreter Nachweis für die Ubiquitinierung der Connexine und ihren Abbau durch Proteasomen steht noch aus. Es ist durchaus möglich, dass ein bekannter oder noch nicht entdeckter Interaktionspartner der Connexine, wie beispielsweise E-Cadherin (Jongen et al., 1991), N-Cadherin (Meyer et al., 1992) oder ZO-1 (Toyofuku et al., 2000), durch Proteasomen degradiert wird und die Connexine erst nach deren Abbau aus der Membran entfernt und abgebaut werden können. Untersuchungen zum Abbau von mutierten

Connexinen, in denen verschiedene Lysine durch andere Aminosäuren ersetzt wurden, könnten Aufschluss über die Rolle des proteasomalen Abbaus an der Connexindegradation geben. So konnte durch diese Technik beispielsweise die Ubiquitinierung des Wachstumshormon-Rezeptors (Govers et al., 1997) und des Epithelialen Natriumkanals ENaC (Staub et al, 1997) nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass lysosomaler und proteasomaler Abbau zur Degradation der Connexine Cx26 und Cx32 beitragen und die Inhibierung des lysosomalen Abbaus eine Dephosphorylierung von Cx32 verursacht. Die weitere Aufklärung des Abbaumechanismus der Connexine wird auch Einsichten in die Regulation der Degradation ermöglichen.

Verminderte Gap Junction Kommunikation kann dazu führen, dass isolierten Zellen weniger inhibitorische Signale empfangen und eine unregulierte Zellteilung und Differenzierung ausgelöst werden kann (Ruch, 1994). So konnte maligne Transformation in der Lunge (Ruch et al., 1998) und in der Leber (Trosko und Ruch 1999) mit einem Verlust der Gap Junction Kommunikation in Verbindung gebracht werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Expressionsniveau von Cx43 in Gliomen und Glioma-Zelllinien stark variieren kann (Shinoura et al., 1996). In neueren Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen dem höheren Expressionsniveau von Cx43 und einer gesteigerten Kopplung nachgewiesen werden. Hinweise wurden gefunden, dass eine verminderte Kopplung mit einer erhöhten Aggressivität von Tumoren einhergeht (Soroceanu et al., 2001).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gliomazellen zeigten eine stark unterschiedliche Kopplung, die nicht durch Unterschiede im Niveau an exprimierten Cx43, sondern durch ein verändertes Phosphorylierungsmuster erklärt werden konnte. Es ist wahrscheinlich, dass die Variation des Phosphorylierungsmusters von Cx43 eine weitere Möglichkeit, neben der Veränderung der Menge an exprimiertem Connexin, darstellt, um die Zell-Zell-Kommunikation im Laufe der Tumorgenese zu verändern.

Es konnte gezeigt werden, dass cAMP und TPA die Phosphorylierung in A 172- und U 87-Zellen in verschiedenem Umfang ändern können und dass dies auch zu einer Änderung des Kopplungsverhaltens führt. Durch weitere Untersuchungen mit Reagenzien, die in der Lage sind, das Phosphorylierungsmuster zu verändern, könnten Wege gefunden werden, die die Phosphorylierung der gering-koppelnden A 172-Zellen so zu ändern, dass die Zell-Zell-Kommunikation heraufreguliert wird. So könnten Mechanismen aufgeklärt werden, die die Verminderung der Zell-Zell-Kommunikation in Gliomzellen auslösen und damit die Tumorgenese erst möglich machen.

## 6 Zusammenfassung

Die durch Gap Junctions vermittelte Zell-Zell-Kommunikation kann vielfältig über verschiedene Mechanismen reguliert werden. Ziel dieser Arbeit war es, zum einen die Degradation der Connexinproteine als möglichen Ansatzpunkt der Regulation zu untersuchen und zum anderen den Einfluss einer veränderten Phosphorylierung der Connexine auf die Kopplung zu analysieren.

Die Degradation der Connexine kann nur dann zur Regulation der Gap Junction Funktion dienen, wenn es in den Zellen Möglichkeiten zur Modulation der Degradationsrate gibt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass das Expressionsmuster der Connexine ihre Degradationsrate, bestimmt durch die Halbwertszeit, modulieren kann. Durch Untersuchungen der Halbwertszeit von Cx26, Cx32, Cx43 und Cx45 in Zellen mit unterschiedlichen Connexin-Expressionsmuster konnte nachgewiesen werden, dass Cx32 Cx26 und Cx43 entsprechend Cx45 auf Proteinebene gegen Abbau stabilisieren können. So ist die Halbwertszeit von Connexin26 in primären, normalen Hepatozyten, die Cx26 und Cx32 exprimieren, um den Faktor 2 größer, als in Cx32-defizienten Hepatozyten. Dieser Unterschied in der Halbwertszeit erklärt auch, die in den Cx32-defizienten Hepatozyten deutlich reduzierte Menge an Cx26-Protein.

An der Degradation von Cx32 und Cx26 sind sowohl der lysosomal vermittelte Abbau als auch der proteasomal vermittelte Abbau beteiligt. Kopplungsanalysen ergaben in Cx26-exprimierenden Zellen eine deutliche Steigerung der Kopplung unter dem Einfluss lysosomaler als auch proteasomaler Inhibitoren. Auch in Cx32-exprimierenden Zellen konnte eine Steigerung der Kopplung durch Hemmung des lysosomalen Abbaus, nicht aber durch Inhibition des proteasomalen Abbaus, beobachtet werden.

Diese Ergebnisse zeigten zum ersten mal, dass die durch Cx26 und Cx32 vermittelte Gap Junction Kommunikation durch die Degradationsrate hochreguliert werden kann.

Der Unterschied in der Beeinflussung der Kopplung durch Degradationshemmer in Zellen, die Cx26 beziehungsweise Cx32 exprimieren, konnte durch den Nachweis von dephosphoryliertem Connexin32 bei Inhibition des lysosomalen Abbaus erklärt werden. Die Dephosphorylierung eines Connexins im Zusammenhang mit der lysosomalen Degradation eröffnet einen neuen Aspekt des Degradations-Mechanismus der Connexine.

Durch die Transfektion von Cx32 zusätzlich zu Cx26, in HeLa-Zellen und vergleichende Untersuchungen an primären Zellen sowie an HeLa-Transfektanten konnte gezeigt werden, dass das artifizielle Zellsystem HeLa-Transfektante gut geeignet ist, um den Abbau der

Connexine zu untersuchen. So konnte mittels Immunpräzipitationsanalysen von HeLa-Cx26/Cx32-Doppeltransfektanten und Cx26- sowie Cx32-Einfachtransfektanten ein Nachweis für die mögliche Bildung heteromerer Gap Junction Kanäle erbracht werden.

Es wurden Untersuchungen zur Expression und Funktion von Cx43 in den Glioma-Zelllinien A 172 und U 87 durchgeführt. Es zeigte sich, dass die beiden Zelllinien ein etwa gleiches Proteinniveau und gleiche Halbwertszeit von Cx43 aufwiesen. Dennoch konnten große Unterschiede in der Kopplung festgestellt werden. Der Nachweis eines unterschiedlichen Phosphorylierungsmusters zeigte eine mögliche Erklärung auf. Trotz der Unterschiede in der durch Cx43 vermittelten Kopplung zeigten cAMP und TPA ähnliche Wirkung in beiden Zelllinien: Durch cAMP wurde die Kopplung auf jeweils etwa 150 % gesteigert, während TPA die Kopplung auf etwa 80 % reduzierte.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Zell-Zell-Kommunikation in Tumorzellen nicht nur durch das Expressionsniveau, sondern auch durch ein verändertes Phosphorylierungsmuster des exprimierten Connexins beeinflusst werden kann.

## 7 Literatur

- Abernethy, D. J., Greelae, W. F., Huband, J. C. und Boreiko, C. J. (1985): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) promotes the transformation of C3H/10T1/2 cells. *Carcinogenesis* 6: 651-653.
- Ahmad, S., Diez, J. A., George, C. H. und Evans, W. H. (1999) Synthesis and assembly of connexins in vitro into homomeric and heteromeric functional gap junction hemichannels. *Biochem. Journal* 339: 247-253.
- Anzini, P., Neuberg, D. H., Schachner, M., Nelles, E., Willecke, K., Zielasek, J., Toyka, K.V., Suter, U. und Martini, R. (1997). Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32. *J. Neurosci.* 17,4545-4551.
- Aoyagi T, Miyata S, Nanbo M, Kojima F, Matsuzaki M. (1969): Biological activities of leupeptins. *J Antibiot (Tokyo)* 1969 Nov;22(11):558-68.
- Asato, A. E., Peng, A., Hossain, M. Z., Mirzadegan, T. und Bertram, J. S. (1993). Azulenic retinoids: novel nonbenzenoid aromatic retinoids with anticancer activity. *J. Med. Chem.* 36, 3137-3147.
- Atkinson M. M., Lampe P. D., Lin H. H., Kollander R., Li X. R., Kiang D. T. (1995): Cyclic AMP modifies the cellular distribution of connexin43 and induces a persistent increase in the junctional permeability of mouse mammary tumor cells. *J. Cell Sci.* 108 ( Pt 9): 3079-90.
- Bagnall, K. M., Sanders, E. J. und Berdan, R. C. (1992). Communication compartments in the axial mesoderm of the chick embryo. *Anat. Embryol. Berl.* 186, 195-204.
- Bai, S., Spray, D. C. und Burk, R. D. (1993). Identification of proximal and distal regulatory elements of the rat connexin32 gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1216, 197-204.
- Barrio, L. C., Capel, J., Jarrillo, J. A., Castro, C., und Revilla, A. (1997): Species-specific voltage-gating properties of connexin45 junctions expressed in *Xenopus oocytes*. *Biophys. J.* 73: 757-769.
- Beblo, D. A. und Veenstra, R. D. (1997): Monovalent cation permeation through the connexin40 gap junction channel. Cs, Rb, K, Na, Li, TEA, TBA, and effects of anions BR, Cl, F, acetate, aspartate, glutamate and NO<sub>3</sub>. *J. Gen. Physiol.* 109: 509-522.
- Bennett M. V. L., Barrio L. C., Bargello T. A., Spray D. C., Hertzberg E. und Sáez J. C. (1991). Gap Junctions: new Tools, New Answers, New Questions. *Neuron* 6: 305-320.
- Bennett, M. V. L. und Verselis, V.K. (1992): Biophysics of gap junctions. *Semin. Cell Biol.* 3: 29-47.
- Berdan, R.C und Gilula, N.B. (1988): The arthropod gap junction and pseudo-gap junction: Isolation and preliminary biochemical analysis. *Cell Tissue Res.* 251: 257-274.
- Bergoffen, J., Scherer, S. S., Wang, S., Scott, M. O., Bone, L. J., Paul, D. L., Chen, K., Lensch, M. W., Chance, P. F. und Fischbeck, K. H. (1993). Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease. *Science* 262, 2039-2042.
- Berthoud, V.M., Ledbetter, M. L. S., Hertzberg, E. L., Saez, J. C. (1992): Connxin43in MDCK cells is regulated by a tumor-promoting phorbol ester and Ca<sup>2+</sup>. *Eur. J. Cell Biol.* 57: 40-50.
- Bevans, C. G. und Harris, A. L. (1999): Regulation of connexin channels by pH. Direct action of the protonated form of taurine and other aminosulfonates. *J Biol Chem.* 1999 Feb 5;274(6):3711-9.
- Bevans, C. G., Kordel, M., Rhee, S. K. und Harris, A. L. (1999): Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J. Biol. Chem.* 273: 2808-2816.
- Bevilacqua, A., Loch, C. R. und Erickson, R. P. (1989). Abnormal development and dye coupling produced by antisense RNA to gap junction protein in mouse preimplantation embryos. *Proc. Nad. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5444-5448.

- Bex, V., Mercier, T., Chaumonett, C., Gaillard-Sanchez, I., Flechon, B., Mazett, F., Traub, O. und Martel, P. (1995): Retinoic acid enhances connexin43 expression at the post-transcriptional level in rat liver epithelial cells. *Cell Biochemistry and Function*. 13: 69-77.
- Beyer, E. C., Paul, D. L. und Goodenough, D. A. (1987). Connexin43: A Protein From Rat Heart Homologous to a Gap Junction Protein From Liver. *The Journal of Cell Biology* 105, 2621-2629.
- Beyer E. C., Goodenough D. A. und Paul D. L. (1988). The Connexins, a Family of related Gap Junction Proteins. *Gap Junctions*, ed. EL Hertzberg, RG Johnson: 167-175.
- Beyer, E.G., Paul, D.L. und Goodenough, D.A. (1990): Connexin family of gap junction proteins. *J. Membr. Biol.* 116: 187-194.
- Beyer E. C. (1993): Gap Junctions. *International Review of Cytology* 137c: 231-242.
- Beyer, E.C., Kistler, J., Paul, D.L. und Goodenough, D.A. (1989). Antisera directed against connexin43 peptides react with a 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium and other tissues. *J. Cell Biol.* 108: 595-605.
- Beyer, E. C. und Willecke, K. (2000): Gap junction genes and their regulation. *Advances in Molecular and Cell Biology* 30: 1-30.
- Beyer, E. C., Gemel, J., Seul, K. H., Larson, D. M., Banach, K. und Brink, p. R. (2000): Modulation of intercellular communication by differential regulation and heteromeric mixing of co-expressed connexins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33:391-397.
- Bone, L. J., Deschenes, S. M., Balice-Gordon, R. J., Fischbeck, K. H. und Scherer, S. S. (1997). Connexin32 and X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease. *Neurobiology of Disease* 4,221-230.
- Boreiko, C. J., Abernethy, D. J., Sanchez, J. H. und Dormab, B. H. (1986): Effect of mouse skin tumor promoters upon [3H]uridine exchange and focus formation in cultures of C3H/10T1/2 mouse fibroblasts. *Carcinogenesis* 7: 1095-1099.
- Bräuner, T., Schmid, A. und Hülser, D. F. (1990): Tumor cell invasion and gap junctional communication. I. Normal and malignant cells confronted in monolayer cultures. *Invasion Metastasis* 10: 18-30.
- Bruzzone, R., Haefliger, J. A., Gimlich, R. A. und Paul, D. L. (1993): Connexin40, a Component of Gap Junctions in Vascular Endothelium, is Restricted in Its Ability to Interact with Other Connexins. *Molecular Biology of the Cell* 4, 7-20.
- Bruzzone, R., White, T. W. und Paul, D. L. (1996): Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 238: 1-27.
- Bruzzone, R. und Ressot, C. (1997): Connexins, gap junctions and cell-cell signaling in the nervous system. *Eur J. Neurosci.* 9: 1-6.
- Budunova, I.V. (1994): Alteration of gap junctional intercellular communication during carcinogenesis. *The Cancer Journal* 7: 228-237.
- Bukauskas, F. F., Elfgang, C., Willecke, K. und Weingart, R. (1995): Biophysical properties of gap junction channels formed by mouse Connexin40 in induced pairs of transfected human HeLa cells. *Biophys. J.* 68,2289-2298.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987): XLI-blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *E. coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-380.
- Burghardt RC, Barhoumi R, Sewall TC, Bowen JA. (1995): Cyclic AMP induces rapid increases in gap junction permeability and changes in the cellular distribution of connexin43. *J Membr Biol.* 148(3):243-53.
- Burt, J.M. und Spray, D.C. (1988): Single channel events and gating behavior of the cardiac gap junction channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3431-3434.

- Burt, J.M. (1991): Modulation of cardiac gap junction channel activity by the membrane lipid environment. In: *Biophysics of Gap Junction Channels*. Peracchia, C. (Hrsg.). CRC-Press. Baton Rouge. California. S. 90-93.
- Butterweck A., C. Elfgang, K. Willecke und O. Traub (1994): Differential expression of the gap junction proteins connexin45, -43, -31 and -26 in mouse skin. *Europ. J. Cell Biol.* 65: 152-163.
- Calero, G., Kanemitsu, M., Taffet, S. M., Lau, A. F. und Delmar, M. (1998): A 17mer peptide interferes with acidification-induced uncoupling of connexin43. *Circ. Res.* 82, 929-935.
- Caspar, D.L.D., Goodenough, D.A., Makowsky, L. und Philipps, W.C. (1977): Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and X-ray diffraction. *J. Cell Biol.* 74: 605-628.
- Caspar, D.L.D., Sosinsky, G.E., Tibbitts, T.T., Phillips, W.C. und Goodenough, D.A. (1988): Gap junction structure. In: *Gap junctions*. Hertzberg, E.L. und Johnson, R.G. (Hrsg.). Alan R. Liss Inc., New York. S. 117-133.
- Caveney, S. (1985): The role of gap junctions in development. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 319-335.
- Chalcroft, J.P. und Bullivant, S. (1970): An interpretation of liver cell membrane and junction structure based on observation of freeze fracture replicas of both sides of the fracture. *J. Cell Biol.* 47: 49-60.
- Charles, A.C., Naus, C.C.G., Zhu, D., Kidder, G.M., Dirksen, E.R. und Sanderson, M.J. (1992): Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells. *J. Cell Biol.* 118: 195-201.
- Chen, Y.H. und DeHaan, R.L. (1992): Multiple channel conductance states and voltage regulation of embryonic chick cardiac gap junctions. *J. Membr. Biol.* 127: 95-111.
- Chow, L. und Lye, S. J. (1994): 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.* 170(3):788-795.
- Civitelli, R., Ziambaras, K., Warlow, P. M., Lecanda, F., Nelson, T., Harley, J., Atal, N., Beyer, E. C. und Steinberg, T. H. (1998): Regulation of connexin43 expression and function by prostaglandin E2 (PGE2) and parathyroid hormone (PTH) in osteoblastic cells. *J. Cell Biochem.* 68, 8-21.
- Clairmont, A. und Sies, H. (1997): Evidence for a posttranscriptional effect of retinoic acid on connexin43 gene expression via the 3'-untranslated region. *FEBS Lett.* 419,268-270.
- Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S. und Smith, S.J. (1990): Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long range glial signaling. *Science* 247: 470-474.
- Dahl, G., Nonner, W. und Werner, R. (1994): Attempts to define functional domains of gap junction proteins with synthetic peptides. *Biophys J.* 67(5):1816-22.
- Dahl, E., Winterhager, E., Traub, O. und Willecke, K. (1995): Expression of gap junction genes, connexin40 and connexin43, during fetal mouse development. *Anat. Embryol.* 191,267-278.
- Dahl, E., Manthey, D., Chen, Y., Schwarz, H.J., Chang, Y.S., Lalley, P.A., Nicholson, B.J. und Willecke, K. (1996). Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *J. Biol. Chem.* 271: 17903-17910.
- Darrow, B. J., Laing, J. G., Lampe, P. D., Saffitz, J. E. und Beyer, E. C. (1995): Expression of multiple connexins in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 76(3):381-7.
- Davies, T. C., Barr, K. J., Jones, D. H., Zhu, D. G. und Kidder, G. M. (1996). Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse. *Dev. Genet.* 18,234-243.
- De Leon, J. R., Buttrick, P. M. und Fishman, G. I. (1994): Functional analysis of the connexin43 gene promoter in vivo and in vitro. *J. Mol. Cell Cardiol.* 26,379-389.
- DeMello, W.C. (1988): Cyclic nucleotides and junctional permeability. In: *Gap Junctions*. Hertzberg, E.L. und Johnson, R.G. (Hrsg.), Alan R. Liss Inc., New York: S. 245-254..

- Denoyelle, F., Weil, D., Maw, M. A., Wilcox, S. A., Lench, N. J., Allen-Powe, D. R., Osborn, A. H., Dahl, H.-H. M., Middleton, A., Houseman, M. J., Dode, C., Marlin, S., Boulila-El Gated, A., Grati, M., Ayadi, H., BenArab, S., Bitoun, P., Lina-Granade, G., Godet, J., Mustapha, M., Loiselet, J., El-Zir, E., Aubois, A., Joannard, A., Levilliers, J., Garabedian, E.-N., Mueller, R. F., McKinlay Gardner, R. J. und Petit, C. (1997). Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum. Mol. Genet.* 6,2173-2177.
- Denoyelle, F., Lina-Granade, G., Plauchu, H., Bruzzone, R., Chaib, H., Leviacobas, F., Weil, D. und Petit, C. (1998). Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* 393,319-320.
- Dermietzel, R., Leibstein, A., Frixen, U., Janssen-Timmen, U., Traub, O. und Willecke, K. (1984). Gap junction in several tissues share antigenic determinants with liver gap junctions. *EMBO J* 3,2261-2270.
- Dermietzel, R., Traub, O., Hwang, T.K., Beyer, E., Bennett, M.V., Spray, D.C. und Willecke, K. (1989). Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10148-10152.
- Dermietzel, R., Herzberg, E. L., Kessler, J. A. und Spray, D. C. (1991): Gap junctions between cultured astrocytes: immunochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *J. Neurosci.* 11: 1421-1431
- DeVries, S.H. und Schwartz. E.A. (1992): Hemi-gap-junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina. *J. Physiol.* 445: 201-230.
- Diestel, S. (2000): Dissertation an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Diez, J. A., Ahmad, S. und Evans, W. H. (1998): Biogenesis of liver gap junctions. In: Werner, R. (Ed.) *Gap junction*. IOS, Amsterdam, S. 130-134.
- Ebihara, L. Beyer, E.G., Swenson, K.I., Paul, D.L. und Goodenough. D.A. (1989): Cloning and expression of a *Xenopus* embryonic gap junction protein. *Science* 243: 1194-1195.
- Ek, J. F., Delmar, M., Perzova, R. und Taffet, S. M. (1994): Role of histidine 95 on pH gating of the cardiac gap junction protein connexin43. *Circ.Res.* 74, 1058-1064.
- Ek, V. J., Calero, G., Morley, G. E., Coombs, W., Taffet, S. M. und Delmar, M. (1996): PH regulation of connexin43: molecular analysis of the gating particle. *Biophys. J.* 77, 1273-1284.
- El-Sabban, M. E. und Pauli, B. U. (1995): Adhesion-mediated gap junctional communication between lung-metastatic cancer cells and endothelium. *Invasion Metastasis* 14, 164-176.
- Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., Hülser D.F. und Willecke, K. (1995): Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* 129: 805-817.
- Elvira. M., Diez, J. A., Wang, K.K.W. und Villalobo, A. (1993): Phosphorylation of connexin-32 by protein kinase C prevents its proteolysis by [J-Calpain and m-Calpain. *J. Biol. Chem.* 268: 14294-14300.
- Elvira. M., Wang, K. K. W. und Villalobo, A. (1994): Phosphorylated and non-phosphorylated connexin-32 molecules in gap junction plaques are protected against calpain proteolysis after phosphorylation by protein kinase C. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 793-796.
- Enkvist, M. O. und McCarthy, K. D. (1994): Astroglial gap junction communication is increased by treatment with either glutamate or high K<sup>+</sup> concentration. *J. Neurochem.* 62,489-495.
- Enomoto, T. und Yamasaki, H. (1985): Phorbol ester-mediated inhibition of intercellular communication in BALB/c 3T3 cells: relationship to enhancement of cell transformation. *Cancer Res.* 45,2681-2688.
- Estivill, X., Fortina, P., Surrey, S., Rabionet, R., Melchionda, S., D'Agruma, L., Mansfield, E., Rappaport, E., Govea, N., Mila, M., Zeiante, L. und Gasparini, P. (1998): Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 351,394-398.

- Evans, W.H. (1994): Assembly of gap junction intercellular communication channels. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 788-792.
- Falk, M. M., Kumar, N. M. und Gilula, N. B. (1994): Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins. *J. Cell Biol.* 127: 343-355.
- Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J. und Schreiber, S. L. (1995): Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystine. *Science* 268: 726-731.
- Fernandez, C. M., Gingalewski, C. und De Mello, A. (1998): Expression of the connexin 43 gene is increased in the kidneys and the lungs of rats injected with bacterial lipopolysaccharide. *Shock* 10, 97-102.
- Finbow, M.E., Buultjens, T.E.J., Lane, N.J., Shuttleworth, J. und Pitts, J.D. (1984): Isolation and characterization of arthropod gap junctions. *EMBO J.* 3: 2271-2278.
- Fishman, G.I., Spray, D.C. und Levin, L.A. (1990): Molecular characterization and functional expression of the human cardiac gap junction channel. *J. Cell Biol.* 111: 589-598.
- Foot, C.I., Zhou, L., Zhu, X. und Nicholson, B.J. (1998): The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. *J. Cell Biol.* 140: 1187-1197.
- Fritsch, J.E., Buckmaster, M.J., Storrie, B. (1988): Fibroblasts maintain a complete endocytic pathway in the presence of lysosomotropic amines. *Exp Cell Res* 1988 Apr;175(2):277-85.
- Fujimoto, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Kuraoka, A., Ohshika, H. und Shibata, Y. (1997): Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *Journal of Cell Science* 70,311-322.
- Fujita, M., Spray, D. C., Choi, H., Saez, J. C., Watanabe, T., Rosenberg, L. C., Hertzberg, E. L. und Reid, L. M. (1987). Glycosaminoglycans and proteoglycans induce gap junction expression and restore transcription of tissue-specific mRNAs in primary liver cultures. *Hepatology* 7, 1S-9S.
- Gabriel, H.D., Jung, D., Blitzler, C., Temme, A., Traub, O., Winterhager, E. und Willecke, K. (1998): Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J. Cell Biol.* 140, 1453-1461.
- Gergs, U. (1997): Dissertation an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Gey, G. O., Coffman, W.D. und Kubicek, M.T. (1952): Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12: 264-265.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. und Parks, W. P. (1973): In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.(Bethesda)* 51: 1417-1423.
- Gimlich, R.L., Kumar, N.M. und Gilula, N.B. (1990): Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos. *J. Cell Biol.* 110: 597-605.
- Godwin, A. J., Green, L. M., Walsh, M. P., McDonald, J. R., Walsh, D. A. und Fletcher, W. H. (1993): In situ regulation of cell-cell communication by the cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Cell Biochem.* 127-128:293-307.
- Goliger, J. A. und Paul, D. L. (1994): Expression of Gap Junction Proteins Cx26, Cx31.1, Cx37 und Cx43 in Developing and Mature Rat Epidermis. *Developmental Dynamics* 200,1-13.
- Goodenough, D. A., Paul, D. L. und Jesaitis, L. (1988). Topological Distribution of Two Connexin32 Antigenic Sites in Intact and Split Rodent Hepatocyte Gap Junctions. *The Journal of Cell Biology* 1817-1824.
- Goodenough, D. A. (1992): The crystalline lens. A system networked by gap junctional intercellular communication. *Semin Cell Biol.* 3(1):49-58. Review.

- Goodenough, D.A., Goliger, J.A., Paul, D.L. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 475-502.
- Govers, R., van Kerkhof, P., Schwartz, A. L. und Strous, G. J. (1997): Linkage of the ubiquitin-conjugating system and the endocytic pathway in ligand-induced internalization of the growth hormone receptor. *EMBO J.* 1997 16(16):4851-8.
- Grifa, J., Wagner, C. A., D'Ambrosio, L., Melchionda, S., Bemardi, F., Lopez-Bigas, N., Rabionet, R., Aaones M., Delia Monica, M., Estivill, X., Zeiante, L., Lang, F. und Gasparini, P. (1999): Mutations in *gjb6* cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at *DFNA3* locus. *Nature Genetics* 23,16-18.
- Groenewegen, W. A., van Veen, T. A., van-der Velden, H. M. und Jongsma, H. J. (1998): Genomic organization of the rat connexin40 gene: identical transcription start sites in heart and lung. *Cardiovasc.Res.* 38,463-471.
- Gros, D. B. und Jongsma, H. J. (1996). Connexins in mammalian heart function. *BioEssays* 18, 719-730.
- Grümmer, R., Chwalisz, K., Mulholland, J., Traub, O. und Winterhager, E. (1994). Regulation of connexin26 and connexin43 expression in rat endometrium by ovarian steroid hormones. *Biol. Reprod.* 51, 1109-1116.
- Haefliger, J.A., Bruzzone, R., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G. und Paul, D.L. (1992). Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. Molecular cloning, expression, and chromosome mapping. *J. Biol. Chem.* 267: 2057-2064.
- Hamel, E., Katoh, F., Müller, G., Birchmeier, W. und Yamasaki (1988): Transforming growth factor beta as a potent promoter in two-stage BALB/c 3T3 cell transformation. *Cancer. Res.* 48: 2832-2836.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia Coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hare, J.F. (1990): Mechanisms of membrane protein turnover. *Biochem. Biophys. Acta* 1031: 71-90.
- Haubrich, S., Schwarz, H. J., Bukauskas, F., Lichtenberg, F.H., Traub, O., Weingart, R. und Willecke, K. (1996): Incompatibility of connexin 40 and 43 Hemichannels in gap junctions between mammalian cells is determined by intracellular domains. *Mol. Biol. Cell* 7, 1995-2006.
- Hennemann, H. (1992a): Isolierung und Charakterisierung von neuen Connexin-Genen der Maus, die für Gap Junction Proteine kodieren. Doktorarbeit an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn: 75.
- Hennemann, H., Dahl, E., White, J.B., Schwarz, H.J., Lalley, P.A., Chang, S., Nicholson, B.J. und Willecke, K. (1992b): Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin. *J. Biol. Chem.* 267: 17225-17233.
- Hennemann, H., Kozjek, G., Dahl, E., Nicholson, B. und Willecke, K. (1992c): Molecular cloning of mouse connexins26 and -32: similar genomic organization but distinct promoter sequences of two gap junction genes. *Eur. J. Cell Biol.* 58: 81-89.
- Hennemann H., Dahl E., White J. B., Schwarz H. J., Lalleys P. A., Chang S., Nicholson B. J. und Willecke K. (1992d): Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin. *J. Biol. Chem.* 267: 17225-17233.
- Hermans, M.M.P., Kortekaas, P., Jongsma, H.J. und Rook, M.B. (1995): pH sensitivity of the cardiac gap junction proteins, connexin 45 and 43. *Pflugers Arch.* 431: 138-140.
- Hertzberg E. L., Disher R. M., Tiller A. A., Zhou Y. und Cook R. G. (1988): Topology of the  $M_r$  27.000 liver gap junction protein. Cytoplasmic localization of amino- and carboxyl-termini and a hydrophilic domain which is protease hypersensitive. *J. Biol. Chem.* 263: 19105-19111.
- Hicke, L. (1999): Gettin' down with ubiquitin: turning of cell surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol.* 9: 107-112.
- Hicke, L. (1997): Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. *FASEB Journal* 11: 1215-1226.

- Hoffmann, B., Piasecki, A und Paul, D. (1989): Proliferation of fetal rat hepatocytes in response to growth factors and hormones in primary culture. *J. Cell. Physiol.* 139: 654-662.
- Hoh, J. H., John, S. A. und Revel, J.-P. (1991): Molecular Cloning and Characterization of a New Member of the Gap Junction Gene Family, Connexin31. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 6524-6531.
- Hossain, M. Z., Ao, P. und Boynton, A. L. (1998): Platelet-derived growth factor-induced disruption of gap junctional communication and phosphorylation of connexin43 involves protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Physiol* 176, 332-341.
- Hülser, D. F., Rehkopf, B. und Traub, O. (1998): Immunogold labeling of dispersed and ubiquitinated gap junction channels. In: Werner, R. (Ed.): *Gap Junctions*. IOS Press, Miami: S. 18-21.
- Hunte, C., JanBen, M., Schulz, M., Traub, O., Willecke, K. und Schnabl, H. (1993): Age dependent modification and further localization of the cx26-like protein from *Vicia faba* L. *Bot. Acta* 106: 207-212.
- Imanaga, J. (1974): Cell to cell diffusion of Procion yellow in sheep and calf Purkinje fibres. *J. Membr. Biol.* 16: 381-388.
- Jiang, J. X., Taffet, S. M. und Burt, J. M. (1999): Formation of heteromeric gap junction channels by connexins 40 and 43 in vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6495-6500.
- Johnson, R.G. und Sheridan, J.D. (1971): Junctions between cancer cells in culture. Ultrastructure and permeability. *Science* 174: 717-719.
- Jongen, W. M., Fitzgerald, D. J., Asamoto, M., Picolli, C., Slaga, T. J., Gros, D., Takeichi, M. und Yamasaki, H. (1991): Regulation of connexin43-mediated gap junctional intercellular communication by  $Ca^{+}$  in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J. Cell Biol.* 107: 241-255.
- Jordan, K., Solan, J. L., Dominguez, M., Sia, M., Hand, A., Lampe, P. D. und Laird, D. W. (1999): Trafficking, Assembly, and Function of a Connexin43-Green Fluorescent Protein Chimera in Live Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* 10: 2033-2050.
- Jordan, K., Chodock, R., Hand, A. R. und Laird, D. W. (2001): The origin of annular junctions : a mechanism of gap junction internalization. *J. Cell. Sci.* 114:763-773.
- Kadle, R., Zhang, J. T. und Nicholson, B. J. (1991): Tissue-Specific Distribution of Differentially Phosphorylated Forms of Cx43. *Molecular and Cellular Biology* 77, 363-369.
- Kanemitsu, M.Y. und Lau, A.F. (1993): Epidermal growth factor stimulates the disruption of gap junctional communication and connexin43 phosphorylation independent of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-sensitive protein kinase C: the possible involvement of mitogen-activated protein kinase. *Mol. Biol. Cell* 3: 837-848.
- Kanno, Y., Sasaki, Y., Shiba, Y., Yoshida-Noro, C., Takeichi, M. (1984): Monoclonal antibody ECCD-1 inhibits intercellular communication in teratocarcinoma PCC3 cells. *Exp. Cell Res.* 152: 270-273.
- Kanter, H.L., Saffitz, J.E. und Beyer, E.C. (1992): Cardiac myocytes express multiple gap junction proteins. *Circ. Res.* 70: 438-444.
- Kelley, P. M., Hams, D. J., Comer, B. C., Askew, J. W., Fowler, T., Smith, S. D. und Kimberling, W. J. (1998a) Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 62, 792-799.
- Kelley, P. M., Harris, D. J., Comer, B. C., Askew, J. W., Fowler, T., Smith, S. D. und Kimberling, W. J. (1998b): Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am. J Hum. Genet.* 62, 792-799.
- Kiang, D. T., Jin, N., Tu, Z. J. und Lin, H. H. (1997): Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene* 199, 165-171.

- Kistler, J., Christie, D. und Bullivant, S. (1988): Homologies Between Gap Junction Proteins in Lens, Heart and Liver. *Nature* 331, 721-723.
- Klaunig J. E. und Ruch R. J. (1990): Role of intercellular communication in nongenotoxic carcinogenesis. *Lab. Invest.* 62: 135-146.
- Kumar N. M. Und Gilula N. B. (1996): The gap junction communication channel. *Cell* 84: 381-388.
- Kwak, B. R., Saez, J.C., Wilders, R., Chanson, M., Fishman, G. I., Hertzberg, E.L., Spray, D. C. und Jongsma, H. J. (1995). Effects of cGMP-dependent phosphorylation on rat and human connexin43 gap junction channels. *Pflugers Arch.* 430, 770-778.
- Kwak, B. R. und Jongsma, H. J. (1996). Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Mol. Cell Biochem.* 757,93-99.
- Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Lampe, P. D. und Lau, A. F. (2000): Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch. Biochem. Biophys.*: 384 (2): 205-215.
- Laing, J.G. und Beyer, E. C. (1995): The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 270: 26399-26403.
- Laing, J.G., Tadros, P. N., Westphale, E. M. und Beyer, E. C. (1997): Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome. *Exp. Cell Res.* 236: 482-492.
- Laing, J.G., Tadros, P. N., Green, K., Saffitz, J E. und Beyer, E. C. (1998): Proteolysis of connexin43-containing gap junctions in normal and heat-stressed cardiac myocytes. *Cardiovas. Res.* 38: 711-718.
- Laird D. W. und Revel J. P. (1990): Biochemical and immunochemical analysis of the arrangement of connexin 43 in rat heart gap junction membranes. *J Cell Sci.* 97: 109-117.
- Laird, D. W., Puranam, K. L. und Revel, J.-P. (1991): Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem. J.* 273,67-72.
- Laird, D. W., Castillo, M. und Kasprzak, L. (1995). Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in Brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *The Journal of Cell Biology* 131, 1193-1203.
- Laird, D. W. (1996): The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J. Biophys. Biomembr.* 28 (4): 311-318.
- Larsen. W. J. und Tung, H.N. (1978): Origin and fate of cytoplasmic gap junctional vesicles in rabbit granulosa cells. *Tissue Cell* 10: 585-598.
- Larsen, W. J., Tung, H.N., Murray. S.A. und Swenson. C.A. (1979): Evidence for the participation of actin microfilaments and bristle coats in the internalization of gap junction membrane. *J. Cell Biol.* 83: 576-587.
- Larson, D. M., Haudenschild. C.C. und Beyer, E.C. (1990): Gap junction messenger RNA expression by vascular wall cells. *Circ. Res.* 66: 1074-1080.
- Lau, A. F., Kurata, W. E., Kanemitsu, M. Y., Loo, L. W. M., Wam-Cramer, B. J., Eckhart, W. und Lampe, P.D (1996) : Regulation of connexin43 function by activated tyrosine protein kinases. *J. Bioenerg. Biomembrane.* 2: 359-368.
- Lee, S., Gilula, N. B. und Wamer, A. E. (1987): Gap Junctional Communication and Compaction during Preimplantation Stages of Mouse Development. *Cell* 51, 851-860.
- Lee, S. W., Tomasetto, C. und Sager, R. (1991): Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88,2825-2829.

- Lefebvre, D. L., Piersanti, M., Bai, X. H., Chen, Z. Q. und Lye, S. J. (1995). Myometrial transcriptional regulation of the gap junction gene, connexin-43. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 603-611.
- Liu, S., Taffet, S., Stoner, L., Delmar, M., Vallano, M. L. und Jalife, J. (1993). A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intracellular acidification: the carboxyl tail length. *Biophys. J.* 64, 1422-1433.
- Lo, C.W. (1988): Communication compartments in insect and mammalian development. In: *Modern Cell Biology*. Hertzberg, E.L. und Johnson, R.G. (Hrsg.), Vol. 7, Alan Liss, New York, S. 505-514.
- Loewenstein W. R., Socolar S. J., Higashino S., Kanno Y. und Davidson N. (1965): Interzellular communication: Renal, urinary bladder, sensory and salivary gland cells. *Science* 149: 295-298.
- Loewenstein W. R. und Kanno Y. (1966): Interzellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature* 209: 1248-1249.
- Loewenstein, W. (1979): Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta* 560: 1-65.
- Loewenstein, W. (1981): Junctional intercellular communication: The cell-to-cell membrane channel. *Physiol. Rev.* 61: 829-913.
- Makowski L., Caspar D., Phillips W. C. und Goodenough D. A. (1977). Gap Junction structures. II. Analysis of X-ray diffraction data. *J. Cell Biol.* 74: 629-645.
- Manjunath, C.K., Goings, G.E. und Page, E. (1984): Cytoplasmic surface and intermembrane components of rat heart gap junctional proteins. *Am. J. Physiol.* 246: H865-H875.
- Manthey, D. (1998): Dissertation an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Manthey, D., Bukauskas, F., Lee, C.G., Kozak, C.A. und Willecke, K. (1999). Molecular cloning and functional expression of the mouse gap junction gene connexin-57 in human HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 274: 14716-14723.
- Mesnil, M. und Yamasaki, H. (1988). Selective Gap-Junctional Communication Capacity of Transformed and Non-Transformed Rat Liver Epithelial Cell Lines. *Carcinogenesis* P, 1499-1502.
- Meyer, R.A., Laird, D.W., Revel, J.P. und Johnson, R.G. (1992): Inhibition of gap junctions and cadherins junction assembly by connexin and cadherin and A-CAM antibodies. *J. Cell Biol.* 119: 179-189.
- Montesano, R., Drevon, C., Kutoki, T., Saint Vincent, L., Handleman, S., Sanfort, K. K., Defeo, D. und Weinstein, R. (1977): Test for malignant transformation of rat liver cells in culture: growth in soft agar and production of plasminogen activator. *J. Natl. Cancer Inst.* 59: 1651-1656.
- Moreno, A. P., Campos DeCarvalho, A. C., Verselis, V. K., Eghebali, B. und Spray, D. C. (1991): Voltage-dependent gap-junction channels are formed by connexin32, the major gap junction protein of rat liver. *Biophys. J.* 59: 920-925
- Moreno, A. P., Fishman, G. I. und Spray, D. C. (1992): Phosphorylation Shifts Unitary Conductance and Modifies Voltage Dependent Kinetics of Human Connexin43 Gap Junction Channels. *Biophys. J.* 62, 51-53.
- Moreno, A. P., Rook, M. B., Fishman, G. I. und Spray, D. C. (1994a): Gap junction channels: distinct voltage-sensitive and -insensitive conductance states. *Biophysical Journal* 67, 113-119.
- Moreno, A. P., Saez, J. C., Fishman, G. I. und Spray, D. C. (1994b): Human Connexin43 gap junction channels. Regulation of unitary conductances by phosphorylation. *Circ. Res.* 74, 1050-1057.
- Moreno, A. P., Laing, J. G., Beyer, E. C. und Spray, D. C. (1995): Properties of gap junction channels formed of connexin 45 endogenously expressed in human hepatoma (SKHep1) cells. *Am. J. Physiol.* 268, C356-C365.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.

- Murray, A. W. und Fitzgerald, D. J. (1979): Tumor promoters inhibit metabolic cooperation in cocultures of epidermal and 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1979 Nov 28;91(2):395-401. No abstract available. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 395-401.
- Musil L. S., Cunnungham D.A., Edelman G. M. und Goodenough D.A. (1990a). Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol.* 111: 2077-2088.
- Musil, L.S., Beyer, E.C. und Goodenough, D.A. (1990b): Expression of the gap junction protein connexin43 in embryonic chick lens: molecular cloning, ultrastructural localization and posttranslational phosphorylation. *J. Membr. Biol.* 116: 163-175.
- Musil, L. S. und Goodenough, D. A. (1991). Biochemical Analysis of Connexin43 Intracellular Transport, Phosphorylation und Assembly into Gap Junctional Plaques. *The Journal of Cell Biology* 115,1357-1374.
- Musil, L.S. und Goodenough, D.A. (1993): Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74: 1065-1077.
- Musil, L. S., Le, A.-C. N., VanSlyke, J. K. und Roberts L. M. (2000): Regulation of connexin degradation is a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J. Biol. Chem.* 275(33):25207-25215.
- Nagato, T. und Tandler. B. (1986): Gap junctions in rat sublingual gland. *Anat. Rec.* 214: 71-75.
- Naus, C. C., Hearn, S., Zhu, D., Nicholson, B. J. und Shivers, R. R. (1993): Ultrastructural analysis of gap junctions in C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA. *Exp Cell Res.* 206(1):72-84.
- Nelles, E., Butzler, C., Jung, D., Temme, A., Gabriel, H. D., Dahl, U., Traub, O., Stumpel, F., Jungermann, K. Zielasek, J., Toyka, K.V., Dermietzel, R. und Willecke, K. (1996). Defective propagation of signals generated sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9565-9570.
- Nicholson, B. J. und J.-T. Zhang (1988): Multiple protein components in a single gap junction. In: *Gap Junctions*. E.L. Hertzberg and R.G. Johnson, eds. (New York: Alan R. Liss Inc.), 207-218.
- Nicholson, B.J., L. Zhou, F. Cao, F. Zhou, und Y. Chen (1998): Diverse molecular mechanisms of gap junction channel gating. In: *Gap Junctions*. R. Wemer, ed. (IOS Press), 3-7.
- Nishi, M., Kumar, N. M. und Gilula, N. B. (1991): Developmental Regulation of Gap Junction Gene Expression During Mouse Embryonic Development. *Developmental Biology* 146, 117-130.
- O'Brien, J., al-Ubaidi, M.R. und Ripps, H. (1996): Connexin 35: a gap-junctional protein expressed preferentially in the skate retina. *Mol. Biol. Cell* 7: 233-243.
- Orkand, R. K. (1986): Glial-interstitial fluid exchange. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 48 J, 269-272.
- Orsino, A., Taylor, C. V. und Lye, S. J. (1996): Connexin-26 and connexin-43 are differentially expressed and regulated in the rat myometrium throughout late pregnancy and with the onset of labor. *Endocrinology* 137, 1545-1553.
- Paul, D. L. (1985): Antibody against liver gap junction 27-kD protein is tissue specific and crossreacts with a 54-kD protein. In: *Gap Junctions*. Bennett, M.V.L. und Spray, D.C. (Hrsg.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, S. 107-122.
- Paul, D. L., Ebihara, L., Takemoto, L.J., Swenson, K.I. und Goodenough, D.A. (1991): Connexin46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J. Cell Biol.* 115: 1077-1089.
- Paul, D. L. (1995): New functions for gap junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 665-672.
- Paul, D. L., Bmzzone, K. Y. R., Gimlich, R. L. und Goodenough, D. A. (1995): Expression of a dominant negative inhibitor of intercellular communication in the early *Xenopus* embryo causes delamination and extrusion of cells. *Development* 127, 371-381.

- Pederson, D., Sheridan, J. D. und Johnson, R. (1980): The development of metabolite transfer between reaggregating Novikoff hepatoma cells. *Exp. Cell Res.* 127: 159-178.
- Perkins, G. A., Goodenough, D. A. und Sosinsky, G. E. (1998): Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 rotation for interdigitating two apposing connexons. *J. Mol. Biol.* 277,171-177.
- Peracchia, C., A. Lazrak, und L.L. Peracchia (1994): Molecular models of channel interaction and gating in gap junctions. In: *Membrane channels - molecular and cellular physiology*. C. Peracchia, ed. (Academic Press In 61-377).
- Peracchia, C., Wang, X., Li, L. und Peracchia, L. L. (1996): Inhibition of calmodulin expression prevents low-pH-induced gap junction uncoupling in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch.* 1996 Jan;431(3):379-87.
- Petrocelli, T. und Lye, S. J. (1993): Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone. *Endocrinology* 133,284-290.
- Pitts, J.D. und Simms, J.W. (1977): Permeability of junctions between animal cells. Intercellular transfer of nucleotides but not of macromolecules. *Exp. Cell Res.* 104: 153-163.
- Pitts, J.D. und Finbow, M.E. (1986): The gap junction. *J. Cell Sci.* 4 (Suppl.): 239-266.
- Plum, A. (1999): Dissertation an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Ponten, J. und Macintyre, E. H. (1968): Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta pathol. Microbiol. Scand.* 74: 465-468.
- Purnick, P. E., Oh, S., Abrams, C. K., Verselis, V. K., Bargiello, T. A. (2000): Reversal of the gating polarity of gap junctions by negative charge substitutions in the n-terminus of connexin 32. *Biophys. J.* 79: 2403-2415.
- Rahman, S. und Evans, W. H. (1991): Topography of Connexin32 in Rat Liver Gap Junctions. *Journal of Cell Science* 100, 567-578.
- Rahman, S., Carlile, G. und Evans, W.H. (1993): Assembly of hepatic gap junctions: topography and distribution of connexin32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 268: 1260-1265.
- Reed, K. E., Westphale, E. M., Larson, D. M., Wang, H. Z., Veenstra, R. D. und Beyer, E. C. (1993): Molecular cloning and functional expression of human connexin37, an endothelial cell gap junction protein. *J. Clin. Invest.* 91, 997-1004.
- Ren, P., deFeijter, A. W., Paul, D. L. und Ruch, R. J. (1994): Enhancement of liver cell gap junction protein expression by glucocorticoids. *Carcinogenesis* 15(9): 1807-1813.
- Revel, J. P., und Karnovsky, M. J. (1967): Hexagonal array of the subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell. Biol.* 33: C7-C10.
- Richards, G., Lin, J.-P., Smith, L., Whyte, Y. M., Itin, P., Wollina, U., Epstein, E., Hohl, D., Giroux, J.-M., Chamas, L., Bale, S.J. und Di Giovanna, J. J. (1997): Linkage studies in erythrokeratodermias: Fine mapping, genetic heterogeneity und analysis of candidate genes. *J. Invest. Dermatol.* 109,666-671.
- Richards, G., Smith, L. E., Bailey, R. A., Itin, P., Hohl, D., Epstein, E. H. jr., Di Giovanna, J. J., Compton, J. G. und Bale, S. J. (1998a): Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis [see comments]. *Nat. Genet.* 20, 366-369.
- Richards, G., White, T. W., Smith, L. E., Bailey, R. A., Compton, J. G., Paul, D. L. und Bale, S. J. (1998b): Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deafmutism and palmoplantar keratoderma. *Hum. Genet* 103, 393-399.
- Rieske, E. (1975): Effect of  $Ca^{++}$  on synaptic transfer of protein precursors in electrically coupled nerve cells. *Exp. Brain Res.* 23: Suppl. No. 345.

- Risek, B., Guthrie, S., Kumar, N.M. und Gilula, N.B. (1990): Modulation of gap junction transcript and protein expression during pregnancy in the rat. *J. Cell Biol.* 110: 269-282.
- Risek, B. und Gilula, N.B. (1991): Spatiotemporal expression of three gap junction gene products involved in fetomaternal communication during rat pregnancy. *Develop.* 113: 165-181.
- Risley, M. S., Tan, I. P., Roy, C. und Saez, J. C. (1992): Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J. Cell Sci.* 103, 81-96.
- Rook, M.B., de Jonge, B., Jongsma, H.J. und Masson-Pevet, M.A. (1990): Gap junction formation and functional interaction between neonatal rat cardiocytes in culture: a correlative physiological and ultrastructural study. *J. Membr. Biol.* 118: 179-192.
- Rose, B. und Loewenstein, W. R. (1975): Permeability of cell junction depends on local cytoplasmic calcium activity. *Nature* 254,250-252.
- Ruch, R. J. (1994): The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 24 : 216-231.
- Ruch, R. J., Cesen-Cummings, K. und Malkinson, A. M. (1998): Role of gap junctional in lung neoplasia. *Exp. Lung Res.* 24: 523-539.
- Rup, D.M., Veenstra, R.D., Wang, H.Z., Brink, P.R. und Beyer, E.C. (1993): Chick connexin-56: a novel lens gap junction protein. *J. Biol. Chem.* 268: 706-712.
- Rütz, M.-L. und Hülser, D. F. (2001): Supramolecular dynamics of gap junctions. *Eur. J. Cell Biol.* 80: 20-30.
- Saez, J. C., Spray, D. C., Nairn, A. C.; Herzberg, E., Greengard, P. und Bennett, M. V. L. (1986): cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27 kDa principal gap junction polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2473-2477.
- Saez, J. C., Connor, J. A., Spray, D. C. und Bennett, M. V. L. (1989a). Hepatocyte Gap Junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-triphosphate, and to calcium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2708-2712.
- Saez, J. C., Gregory, W. A., Watanabe, T., Dermietzel, R., Hertzberg, E. L., Reid, L., Bennett, M. V. und Spray, D. C. (1989b). cAMP delays disappearance of gap junctions between pairs of rat hepatocytes in primary culture. *Am.J.Physiol* 257,Cl-11.
- Saez, J.C., Nairn, A.C., Czernik, A.J., Spray, D.C., Hertzberg, E.L., Greengard, P. und Bennett, M.V.L. (1990): Phosphorylation of connexin32, a hepatocyte gap-junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur. J. Biochem.* 192:263-273.
- Saez, J. C., Berthoud, V. M., Kadle, R., Traub, O., Nicholson, B. J., Bennett, M. V. L. und Dermietzel, R. (1991): Pinealocytes in rats: connexin identification and increase in coupling caused by norepinephrine. *Brain res.* 568: 265-275.
- Saez, J. C., Berthoud, V. M., Moreno, A. P. und Spray, D. C. (1993): Gap junctions. Multiplicity of controls in differentiated and undifferentiated cells and possible functional implications. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 27, 163-198.
- Saez, J.C., Martinez, A. D., Branes, M. C. und Gonzalez, H. E. (1998): Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz. J.Med. Biol. Res.* 31, 593-600.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, und M. Maniatis (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor: CSH Press).
- Sanderson, M.J., Charles, A.C. und Dirksen, E.R. (1990): Mechanical stimulation and intracellular Ca<sup>2+</sup> increases intercellular communication in epithelial cells. *Cell Regul.* 1: 585-596.

- Seul, K. H., Tadros, P. N. und Beyer, E. C. (1997): Mouse connexin40: gene structure and promoter analysis. *Genomics* 46, 120-126.
- Shinoura, N., Chen, L., Wani, M. A., Kim, Y. G., Larson, J. J., Warnick, R. E., Simon, M., Menon, A. G., Bi, W. L. und Stambrook, P. J. (1996): Protein and messenger RNA expression of connexin43 in astrocytomas: implications in brain tumor gene therapy. *J. Neurosurg.* 84: 839-846.
- Snipes, G. J. und Suter, U. (1995): Molecular anatomy and genetics of myelin proteins in the peripheral nervous system. *J. Anat.* 186(Pt 3): 483-94.
- Söhl G., Gillen C., Bosse F., Gleichmann M., Müller H. W. und Willecke K. (1996): A second alternative transcript of the gap junction gene connexin32 is expressed in murine Schwann cells and modulated in injured sciatic nerve. *Eur. J. of Cell Biol.* 69:267-275.
- Söhl, G., Degen, J., Teubner, B. und Willecke, K. (1998): The murine gap junction gene connexin36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. *FEBS Lett.* 428: 27-31.
- Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoreses. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Spray, D. C., Chanson, M., Moreno, A. P., Dermietzel, R. und Meda, P. (1991): Distinctive gap junction channel types connect WB cells, a clonal cell line derived from rat liver. *Am. J. Physiol. ( Cell Physiol.)* C513-C527.
- Spray, D.C. (1994): Physiological and pharmacological regulation of gap junction channels. In: *Molecular mechanisms of epithelial cell junctions: From Development to disease.* Citi, S. (Hrsg.), R.G. Landes Company, Austin, Texas, S. 195-215.
- Stagg, R. B. und Fletcher, W. H. (1990): The hormone-induced regulation of contact-dependent cell-cell communication by phosphorylation. *Endocr. Rev.* 77,302-325.
- Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L. und Rozin, D. (1997): Regulation of stability and function of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (EnaC) by ubiquitination. *EMBO* 16 (21): 6325-6336.
- Stauffer, K.A. (1995): The Gap junction proteins pi-connexin (connexin-32) and ps-connexin (connexin-26) can form heteromeric hemichannels. *J. Biol. Chem.* 270: 6768-6772.
- Steinberg, T. H., Civitelli, R., Geist, S. T., Robertson, A.J., Hick, E., Veenstra, R. D., Wang, H. Z., Warlow, P. M., Westphale, E. M., Laing, J. G. und Beyer, E. C. (1994): Connexin43 and connexin45 form gap junctions with different molecular permeabilities in osteoblastic cells. *EMBO J.* 13,744-750.
- Steinman, R., Mellman, I., Muller, W. und Cohn, Z. (1983): Endocytosis and recycling of plasmamembrane. *Trends Biochem. Sci.* 15: 305-309.
- Stergiopoulos, K., Alvarado, J. L., Mastroianni, M., Ek, V. J., Taffet, S. M. und Delmar, M. (1999): Heterodomain interactions as a mechanism for the regulation of connexin channels. *Circ-Res.* 84, 1144-1155.
- Soroceanu, L., Manning, T. J. Jr. und Sontheimer, H. (2001): Reduced expression of connexin43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* 33 (2): 107-117.
- Swenson, K. I., Piwnica-Wonns, H., McNamee, H. und Paul, D. L. (1990): Tyrosine Phosphorylation of the Gap Junction Protein Connexin43 is Required for the pp60v<sup>SRC</sup>-induced Inhibition of Communication. *Cell Regulation* 7,989-1002.
- Takens-Kwak, B. R. und Jongasma, H. J. (1992): Cardiac gap junctions: Three distinct single channel conductances and their modulation by phosphorylating treatments. *Pflugers Arch.* 422,198-200.
- Temme, A., Buchmann, A., Gabriel, H. D., Nelles, E., Schwarz, M. und Willecke, K. (1997): High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Current Biology* 7, 713-71.

- Thomas, S. A., Schuessler, R. B., Berul, C. I., Beardslee, M. A., Beyer, E. C., Mendelsohn, M. E. und Saffitz, E. (1998): Disparate effects of deficient expression of connexin43 on atrial and ventricular conduction: evidence for chamber-specific molecular determinants of conduction. *Circulation* 97, 686-691.
- Tibbits T. T., Caspar D. L. D., Philips W. C. und Goodenough D. A. (1990): Diffraction diagnosis of protein folding in gap junction connexons. *Biophys. J.* 57: 1025-1036.
- Toyofuku, T., Zhang, H., Akamatsu, Y., Kuzuya, T., Tada, M. und Hori, M. (2000): c-Src regulates the interaction between connexin43 and ZO-1 in cardiac myocyte. *J. Biol. Chem.*
- Traub, O., Janssen-Timmen, U., Druge, P.M., Dennietzel, R. und Willecke, K. (1982): Immunological properties of gap junction protein from mouse liver. *J. Cell Biochem.* 19, 27-44.
- Traub, O., Look, J, Paul, D. und Willecke, K. (1987): Cyclic adenosine monophosphate stimulates biosynthesis and phosphorylation of the 26 kDa gap junction protein in cultured mouse hepatocytes. *Eur J. Cell Biol.*
- Traub O., Look J., Dermietzel R., Brümmer F., Hülser D. und Willecke K. (1989): Comparative characterization of the 21-kD und 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. *J. Cell. Biol.* 108: 1039-1059.
- Traub, O., Willecke, K., Breuer, L. und Staschewsky, M. (1992): Changes in expression of three different connexins in organs and tissue during mouse embryonic development. *Eur. J. Cell Biol.* 57: Suppl. 36-38.
- Trexler, E. B., Bennet, M. V., Bargiello, T. A. und Verselis, V. K. (1996): Voltage gating and permeation in a gap junction semichannel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (12): 5836-41.
- Trosko, J. E. und Ruch, R. J. (1999): Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front. Biosci.* 3: 208-236.
- Tsao, M. S., Smith, J. D., Nelson, K.G. und Grisham, J. W. (1984): A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of „oval cells“. *Exp. Cell Res.* 154: 38-52.
- Tsien, R.W. und Weingart, R. (1976): Inotropic effect of cyclic AMP in calf ventricular muscle studied by a cut end method. *J. Physiol.* 260: 117-141.
- Unger, V. M., Kumar, N. M., Gilula, N. B. und Yeager, M. (1999). Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283, 1176-1180.
- Unwin, P. N. und Zampighi, G. (1980). Structure of the junction between communicating cells. *Nature* 283, 545-549.
- Unwin, P. N. und Ennis, P. D. (1983): Calcium-mediated changes in gap junction structure: evidence from the low angle X-ray pattern. *J. Cell Biol.* 97, 1459-1466.
- Unwin, N. (1989). The structure of ion channels in membranes of excitable cells. *Neuron* 3: 6656-6676.
- Urschel, S., Ott, T., Willecke, K. und Traub, O. (1999): Connexin26 degradation is mediated by proteasomes and lysosomes. 1999 International Gap Junction Conference, Programm and Abstract Book 153
- Valiunas, V., Nießen, H., Willecke, K. und Weingart, R. (1999): Electrophysiological properties of gap junction channels in hepatocytes isolated from connexin32-deficient and wildtype mice. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 437: 846-856.
- VanSlyke, J. K., Deschenes, S. M. und Musil, L. S. (2000): Intracellular transport, assembly and degradation of wild-type and disease-linked mutant gap junction proteins. *Mol. Biol. Cell* 11 (6): 1933-1946.
- Vaughan, D.K. und Lasater, E.M. (1990): Renewal of electrotonic synapses in the teleost retinal horizontal cells. *J. Comp. Neurol.* 299: 364-374.
- Veenstra, R.D., Wang, H.Z., Beyer, E.C. und Brink, P.R. (1994): Selective dye and ionic permeability of gap junction channels formed by connexin45. *Circ. Res.* 75: 483-490.

- Veenstra, R. D., Wang, H. Z., Beblo, D. A., Chilton, M. G., Harris, A. L., Beyer, E. C. und Brink, P. R. (1995): Selectivity of connexin-specific gap junctions does not correlate with channel conductance. *Circ. Res.* 77, 111-1165.
- Veenstra, R.D., Wang, H.Z., Westphale, E.M. und Beyer, E.C. (1992): Multiple connexins confer distinct regulatory and conductance properties of gap junctions in developing heart. *Circ. Res.* 71: 1277-1283.
- Veenstra, R. D. (1996). Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins. *J. Bioenerg. Biomembrane.* 28,327-337.
- Wang, X., Li, L., Peracchia, L. L. und Peracchia, C. (1996). Chimeric evidence for a role of the connexin cytoplasmic loop in gap junction channel gating. *Pflugers Arch.* 431, 844-852.
- Wang, X. G. und Peracchia, C. (1996). Connexin 32/38 chimeras suggest a role for the second half of inner loop in gap junction gating by low pH. *Am.J.Physiol* 277, C1743-C1749
- Warn, C. B., Cottrell, G. T., Burt, J. M. und Lau, A. F. (1998). Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 9188-9196.
- White, T.W., Bruzzone, R., Goodenough, D.A. und Paul, D.L. (1992). Mouse Cx50, a functional member of the connexin family of gap junction proteins, is the lens fiber protein MP70. *Mol. Biol. Cell* 3: 711-720.
- White, T. W., Bruzzone, R., Wolfram, S., Paul, D. L. und Goodenough, D. A. (1994): Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J. Cell Biol.* 725, 879-892.
- White, T. W. und Bruzzone, R. (2000): Gap junctions: fates worse than death? *Curr. Biol.* 10(18): R685-688.
- Willecke, K., Hennemann, H., Dahl, E., Jungbluth, S. und Heynkes, R. (1991a): The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. *Eur. J. Cell Biol.* 56: 1-7.
- Willecke, K., Heynkes, R., Dahl, E., Stutenkemper, R., Hennemann, H., Jungblut, S., Suchyna, T. und Nicholson, B.J. (1991b): Mouse connexin37: cloning and functional expression of a gap junction gene highly expressed in lung. *J. Cell Biol.* 114: 1049-1057.
- Willecke, K. und Haubrich, S (1996): Connexin expression systems: to what extent do they reflect the situation in the animal? *J. Bioenerg. Biomembr.* 28: 319-326.
- Wilmrig, M. (1985): LiCl-boiling method for plasmid minipreps. *Trends in Genetics* 1: 158.
- Winterhager, E., Stutenkemper, R., Traub, O., Beyer, E. C. und Willecke, K. (1991): Expression of Different Connexin Genes in Rat Uterus During Decidualization and at Term. *European Journal of Cell Biology* 55,13. 142.
- Wolf, G. (1992): Retinoids and carotenoids as inhibitors of carcinogenesis and inducers of cell-cell communication. *Nutr. Rev.* 50,270-274.
- Xia, J. H., Liu, C. Y., Tang, B. S., Pan, Q., Huang, L., Dai, H. P., Zhang, B. R., Xie, W., Hu, D. X., Zheng, D. Shi, X. L., Wang, D. A., Xia, K., Yu, K. P., Liao, X. D., Feng, Y., Yang, Y. F., Xiao, J. Y., Xie, D. H. und Huang, J. Z. (1998). Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat. Genet.* 20,370-373.
- Yaholm, A., Warmbrodt, R.D., Laird, D.W., Traub, O., Revel, J.P., Willecke, K. und Epel, B.L. (1991): Maize mesocotyl plasmodesmata proteins cross-react with connexin gap junction protein antibodies. *The Plant Cell* 3: 407-417.
- Yancey, S. B., John, S. A., Lal, R., Austin, B. J. und Revel, J.-P. (1989): The 43-kD Polypeptide of Heart Gap Junctions: Immunolocalization, Topology and Functional Domains. *The Journal of Cell Biology* 108,2241-2254.
- Yeager, M. (1998): Structure of cardiac gap junction intercellular channels. *J Struct Biol.* 121(2):231-45.

Yu, W., Dahl, G. und Wemer, R. (1994). The Connexin43 gene is responsive to oestrogen. *Proc R. Soc. Lond B. Biol. Sci.* 255,125-132.

Zhang, J. T. und Nicholson, B. J. (1989): Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA. *J. Cell Biol.* 109: 3391-3401.

Zhang, J. T., Chen, M., Foote, C. I. Und Nicholson, B. J. (1996): Membrane integration of in vitrotranslated gap junctional proteins: Co- and post-translational mechanism. *Mol. Biol. Cell* 7: 471-482.

Zimmer D. B., Green C. R., Evans W. H. und Gilula N. B. (1987). Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction –derived single membrane structures. *J. Biol. Chem.* 262: 7751-7763.