

**Erzeugung und Charakterisierung einer transgenen Maus  
als Tiermodell für die humane Erbkrankheit  
*Erythrokeratodermia variabilis***

**Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)**

**der**

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der**

**Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

**vorgelegt von**

**Marc Schnichels**

**aus Euskirchen**

**Bonn, 2006**

Diese Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

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

Tag der Promotion: 23.Oktober 2006

**Der Wissende weiß, dass er glauben muss.  
Friedrich Dürrenmatt**

## Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Klaus Willecke für seine umfassende fachliche und persönliche Betreuung, die Ermöglichung der Teilnahme an Konferenzen und die Bereitstellung aller für diese Arbeit notwendigen Mittel.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. Albert Haas für die Tätigkeit als 3. Gutachter

Frau Prof. Dr. Winterhager (Essen) für die Tätigkeit als 4. Gutachter und ihre Unterstützung bei den Plazenta-Analysen

Meinen Eltern und meiner Schwester für die Unterstützung vor und während meines Studiums und das Korrektur lesen dieser Arbeit.

Gaby Schwarz und Christine Siegmund (die guten Seelen des Doc-Labors) für ihre hervorragende technische Assistenz und beste Stimmung während der Laborarbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Genetik für das sehr angenehme Arbeitsklima und so manchen wichtigen Tipp am Rande. Ausdrücklicher Dank auch allen Mitarbeitern in den Mäusräumen, der Spülküche, dem Sekretariat und der Verwaltung für so manchen erfüllten Sonderwunsch.

Dr. Markus Kretz (jetzt Stanford Universität, USA) für die Idee zur Erzeugung einer Maus als Modell für die humane Erbkrankheit *Erythrokeratoderma variabilis* sowie seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Philipp Wörsdörfer und Christian Markopoulos für die Hilfe bei der Bearbeitung wichtiger Teilaspekte.

Radoslaw Dobrowolski für seine Unterstützung während der ES-Zell-Kultur und den regen Erfahrungsaustausch.

Julia von Maltzahn für wissenschaftliche Diskussionen und ihre Gelassenheit in so mancher stressiger Situation.

Dr. Qingyi Zheng-Fischhöfer für die Überlassung der Analyse der Cx30.3KO Tiere und Mitarbeit an der Analyse der Cx31.1KO Mäuse und die Unterstützung bei der Etablierung der Riechtests.

Dr. Joachim Degen und Dr. Stephan Maxeiner für wissenschaftliche Diskussionen und neue Ideen hinsichtlich möglicher Experimente.

Dr. Benjamin Odermatt, der maßgeblich an der Klonierungsstrategie und so manch schwieriger Entscheidung ganz zu Beginn dieser Arbeit mitgewirkt hat.

Dr. Mark Kibschull (University Toronto, Kanada) für so manchen fachlichen Rat und neuen Denkanstoß.

Prof. Dr. Thomas Magin, PD Dr. Frank Edenhofer und Prof. Dr. Karl Schilling (alle Bonn), PD. Dr. Julia Reichelt (Köln), Dr. Ekrem Dere (Düsseldorf), Prof. Dr. Heinz Breer und PD. Dr. Jörg Strotmann (Stuttgart-Hohenheim), Dr. Jim Nagy (Manitoba, Kanada), Fiona McCulloch und Dr. Janos Peti-Peterdi (Los Angeles, USA), Dr. Malcolm Hodgins (Glasgow, Großbritannien) für Diskussionen, Bereitstellung von Materialien, und die Bearbeitung wichtiger Teilaspekte dieser Arbeit.

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Gap Junctions	1
1.2	Connexine: Die Bausteine der Gap Junctions	4
1.2.1	Aufbau der Connexingene	5
1.3	Funktionen und Regulation der Gap Junctions	8
1.4	Funktion der Connexinen in der Haut	11
1.5	Connexin bedingte Hautkrankheiten	12
1.5.1	Erythrokeratoderma variabilis (EKV)	15
1.6	Funktionelle Aspekte der Cx31 und Cx30.3 Gen Mutationen	17
1.6.1	Die F137L Mutation	19
1.7	Erzeugung transgener Mäuse	19
1.7.1	Einfacher Genersatz	19
1.7.2	Konditionale Geninaktivierung	20
1.7.3	Zelltypspezifische Ausschaltung von Zielgenen	21
1.8	Ziele der Arbeit	22
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>24</b>
2.1	Chemikalien	24
2.2	Allgemeine Lösungen	24
2.2.1	Lösungen für die Nukleinsäure-Analytik	24
2.2.2	Lösungen für die Bakterienkultur	26
2.2.3	Lösungen für die Zellkultur und Blastozysteninjektion	26
2.2.4	Lösungen für Nachweisreaktionen	29
2.2.5	Lösungen für die Protein-Analytik	31
2.2.6	Gebrauchsfertige Lösungen	32
2.3	Allgemeine Materialien	33
2.3.1	Reagenziensätze (Kits)	33
2.3.2	Allgemeine Labormaterialien	34
2.3.3	Geräte	34
2.3.4	Plasmide	36

2.3.5	Größenstandards	37
2.3.6	Bakterienstämme	37
2.3.7	Eukaryotische Zelllinien	38
2.3.8	Startermoleküle (Oligonukleotid-Primer)	38
2.3.9	Mauslinien	40
2.3.10	Antikörper	41
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>42</b>
3.1	Nukleinsäure-Präparationen	42
3.1.1	Plasmid Präparationen aus Bakterien	42
3.1.1.1	Plasmid Mini Präparation	42
3.1.1.2	Plasmid Midi Präparation	43
3.1.1.3	Endotoxin freie Plasmid Maxi Präparation	43
3.1.2	Isolierung genomischer DNS	43
3.1.2.1	Isolierung genomischer DNS aus embryonalen Stammzellen	43
3.1.2.2	Isolierung genomischer DNS aus Schwanzspitzen von Mäusen	44
3.2	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	44
3.2.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	44
3.2.2	Konzentrationsabschätzung im Gel	45
3.3	Herstellung rekombinanter Plasmide	45
3.3.1	Gewinnung der gewünschten DNS Fragmente	45
3.3.1.1	Partielle Spaltung von Plasmiden	45
3.3.1.2	Elution von DNS-Fragmenten aus dem Gel	45
3.3.2	Modifikation und Ligation von DNS-Molekülen	46
3.3.2.1	Auffüllen klebriger Enden (blunten)	46
3.3.2.2	Dephosphorylierung von Vektorrückgraten	46
3.3.2.3	Ligation von DNS Fragmenten	46
3.4	Transformation	47
3.4.1	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	47
3.4.2	Transformation in XI-1 blue <i>E. coli</i> Bakterien	47

3.4.3	Transformation in MM294-Flp und MM294-Cre <i>E. coli</i> Bakterien	48
3.5	Sequenzierungen	48
3.5.1	Auftragssequenzierungen	48
3.5.2	Sequenzanalyse	48
3.6	Zellkultur	49
3.6.1	Zellkultur embryonaler Stammzellen	49
3.6.1.1	Embryonale HM1 Stammzellen der Maus	49
3.6.1.2	Allgemeine Kulturbedingungen	49
3.6.1.3	Transfektion von HM1 Zellen mittels Elektroporation	50
3.6.1.4	Selektion auf stabile Integration und homologe Rekombination	50
3.6.1.5	Karyotyp-Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone	51
3.6.1.6	Einfrieren von HM1 Zellen	52
3.6.1.7	Auftauen von HM1 Zellen	52
3.6.1.8	Transduktion von Cre-Protein (HTNC) in homolog rekombinierte HM1 Zellen	53
3.6.2	Zellkultur von HeLa Zellen	53
3.6.2.1	Kulturbedingungen für HeLa Zellen	53
3.6.2.2	Einfrieren von HeLa Zellen	54
3.6.2.3	Auftauen von HeLa Zellen	54
3.6.2.4	Transfektion von HeLa Zellen mithilfe der Kalziumphosphat Präzipitation	54
3.6.2.5	Selektion und Isolierung stabiler HeLa-Zellkone	55
3.6.3	Kopplungsanalysen an HeLa-Zellen	56
3.6.4	Mikroinjektionen in HeLa-Zellen	56
3.6.5	ATP-Freisetzungs-Untersuchungen	57
3.7	Untersuchungen an Mäusen	58
3.7.1	Wundheilungsanalysen von Maushaut	58
3.7.2	Schnittwunden am Mausschwanz	58
3.7.3	Präparation der Schnittwunden am Mausschwanz	58
3.8	Proteinanalytik	59
3.8.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	59

3.8.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	59
3.8.3	Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue	60
3.8.4	Elektrotransfer von Proteinen aus dem Gel auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)	61
3.8.5	Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	61
3.8.5.1	Ponceau-Färbung	61
3.8.5.2	Immunoblot-Analyse mittels Chemiluminiszenz (ECL)	61
3.8.6	Immunfluoreszenz-Analysen	62
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
4.1.1	Klonierung des Mausvektors	63
4.1.2	Überprüfung der Funktionalität der frt- und loxP-Erkennungsstellen in <i>E.coli</i>	64
4.2	Untersuchungen von Cx31 und Cx31F137L Molekülen in HeLa Zellen	65
4.3	Embryonale Stammzellen	66
4.3.1	Etablierung der ES-Zell-PCR	66
4.3.2	Transfektion von ES-Zellen mit dem Cx31F137L-Mausvektor	67
4.3.3	Southern Blot zum Nachweis der homologen Rekombination	68
4.3.4	Karyotypanalyse von ES Zell Klonen	70
4.3.5	Transiente Transfektion von ES-Zellen mit dem Plasmid pCrePac	70
4.3.6	Kopplungsanalysen der F137L-ES-Zellen	71
4.3.7	ATP-Freisetzungs-Untersuchung	72
4.4	Herstellung der Cx31+/F137L Maus	72
4.4.1	Blastozysten Injektion	72
4.4.2	Nomenklatur der Mauslinien und der Genotypen	73
4.4.3	Untersuchungen von Embryonen aus Verpaarungen zweier Cx31+/F137L Tiere	74
4.4.4	Erzeugung der Cx31-/F137L Mauslinie	74
4.4.5	Nachweis der Genotypen der untersuchten Mäuse	75
4.4.6	Nachweis der Mutation	75

4.4.7	Proteinmenge der Connexine in der Epidermis der Cx31+/F137L Mäuse	77
4.4.8	Immunfluoreszenzanalyse der Connexine in der Mausepidermis	78
4.4.9	Schnellere Wundheilung bei Cx31+/F137L Schwanzhaut	78
4.4.10	Akanthose	79
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>81</b>
5.1	Generelle Ausgangssituation bei der Herstellung eines Mausmodells für EKV	81
5.2	Untersuchung der Cx31F137L Mutation in HeLa Zellen	82
5.3	Konstruktion des Vektors zur homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen	84
5.4	Charakterisierung der Cx31+/F137L ES-Zellen	86
5.5	Die Cx31+/F137L Maus	88
5.6	Akanthose	89
5.7	Expression von Cx31F137L in der Epidermis	90
5.8	Expression der Connexine 26, 30, 30.3, 43 in der Cx31+/F137L Epidermis	90
5.9	Verkürzte Wundheilung in Cx31+/F137L Mäusen	91
5.10	Vergleich der Cx31-/F137L Tiere mit Cx31-/- und Cx31F137L/F137L Mäusen	92
5.11	Untersuchung der Cx31F137L Mutation in <i>Xenopus</i> Oozyten	93
5.12	Effekte der F137L Mutation auf die Struktur von Cx31	93
<b>6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>95</b>
6.1	Weitere Charakterisierung der Cx31F137L Gap Junctions	95
6.2	Wundheilung von Schnittwunden an der Schwanzhaut von Mäusen	95
6.3	Untersuchungen zur Expression des Cx31 oder des Cx31F137L während der Embryonalentwicklung	96
6.4	Weitere phänotypische Charakterisierung der Cx31+/F137L Tiere	97
6.5	Künstliche Hautmodelle zur weiteren Untersuchung der Connexine	97

<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	100
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	101
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	123
	Klonierungsstrategie des Cx31F137L Mausvektors	123
	Klonierungsstrategie des Cx31F137L PCR-Kontrollvektors	126
	Vektorkarten der HeLa Vektoren	127
	PCR-Programme	128
	Lebenslauf	135
	Kongressteilnahmen	137
	Erklärung	138

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	DEPC	Diethylpyrocarbonat
Abb.	Abbildung	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
abs.	absolut	Dnase	Desoxyribonuklease
ADH	Alkohol-Dehydrogenase	DNS	Desoxyribonukleinsäure
AK	Antikörper	dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
Amp	Ampizillin(-Resistenzgen)	dTTP	Desoxytymidintriphosphat
AS	Aminosäure	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ATP	Adenosintriphosphat	ED	Embryonaltag
A <sub>x</sub>	Absorption bei der Wellenlänge x in nm	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
BES	N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethanschwefel-säure	eGFP	enhanced green fluorescent protein (verstärkt grün fluoreszierendes Protein)
bp	Basenpaare	EKV	<i>Erythrokeratoderma variabilis</i>
bzw.	beziehungsweise	et al.	et altera (und andere)
°C	Grad Celcius	EtOH	Ethanol
C	Cytosin	FCS	fötales Kälberserum
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	µg	Mikrogramm
CK	Casein Kinase	G	Guanin
CKII	Casein Kinase II	g	Gramm
CL	zytoplasmatische Schleife	h	Stunde(n)
cm	Zentimeter	hnRNS	heteronukleäre RNS
CMTX	X-chromosomal vererbte Charcot-Marie-Tooth Krankheit	kb	Kilobasenpaare (1000 bp)
CMV	Cytomegalovirus	kDa	Kilodalton (1000 Da)
cpm	Zerfälle pro Minute	konz.	konzentriert
C-Terminus	carboxyterminales Ende eines Peptids	µl	Mikroliter
Cx	Connexin	l	Liter
Da	Dalton	LB-Medium	Luria-Bertani Medium
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	Lsg.	Lösung
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	M	molar
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser	mA	Milliampere
deion.	deionisiert	MCS	Vielfachklonierungsstelle
		mg	Milligramm
		min	Minute(n)

ml	Milliliter	SSC	Trinatriumcitrat
mM	millimolar	SV40	Simian Virus 40
MOPS	3-(N-Morpholino)- Propansulfonsäure	T	Thymin
mRNS	Boten-RNS	TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
N	normal	TE	Tris-EDTA Puffer
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid-adenindinukleotid	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin
Neurobiotin	N-[2-aminoethyl]-biotinamid	TM	Trans-Membran-Domäne
N-Terminus	aminoterminales Ende eines Peptids	Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
ODDD	Okkulodentodigitale Dysplasie	tRNS	Transfer-RNS
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei Wellenlänge x in nm	U	Enzymeinheit (Unit)
P0	postnatal	ÜN	über Nacht
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung	Upm	Umdrehungen pro Minute
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	UTR	untranslatierter Bereich
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration	u.U.	unter Umständen
PKC	Proteinkinase C	UV	ultraviolett
poly(A)/pA	Polyadenylierungssignal/ Polyadenylierungsstelle	v/v	Volumen pro Volumen
Poly-A	polyadenyliert	Vol.	Volumen
Puro	Puromyzin(-Resistenzgen)	w/v	Gewicht pro Volumen
RNase	Ribonuklease	WT	Wildtyp
RNS	Ribonukleinsäure	YFP	yellow fluorescent protein (gelb fluoreszierendes Protein)
rRNS	ribosomale RNS		
RT	Raumtemperatur		
RT	Reverse Transkription		
s.o.	siehe oben	z.B.	zum Beispiel
SAP	alkalische Phosphatase aus Krabben (Shrimp Alkaline Phosphatase)	z.T.	zum Teil
SDS	Natriumdodecylsulfat		
sec	Sekunde		
snRNS	kleine, nukleäre RNS		



## Einleitung

### 1 Einleitung

Der Organismus eines erwachsenen Menschen besteht aus rund 100 Billionen Zellen, die trotz unterschiedlichster Funktionen alle nach einem einheitlichen Bauplan konstruiert sind. Die meisten chemischen Reaktionen des Stoffwechsels der Zelle laufen im Zytoplasma ab. Nach außen ist eine Zelle durch die Plasmamembran begrenzt, welche überwiegend aus einer Lipiddoppelschicht aufgebaut ist. Die Doppellipidmembran ermöglicht eine Abgrenzung, so dass wasserlösliche Stoffe die Zelle weder verlassen, noch in sie eindringen können. Das Zytoplasma darf jedoch nicht vollständig von der Umgebung abgeschlossen sein, da sonst benötigte Nährstoffe nicht aufgenommen und Stoffwechselprodukte nicht abgegeben werden könnten. Gap Junctions sind regulierte Zellverbindungen, die die Zytoplasmata zweier benachbarter Zellen miteinander verbinden. Man spricht auch von einer „Kopplung“ der Zellen über Gap Junctions.

#### 1.1 Gap Junctions

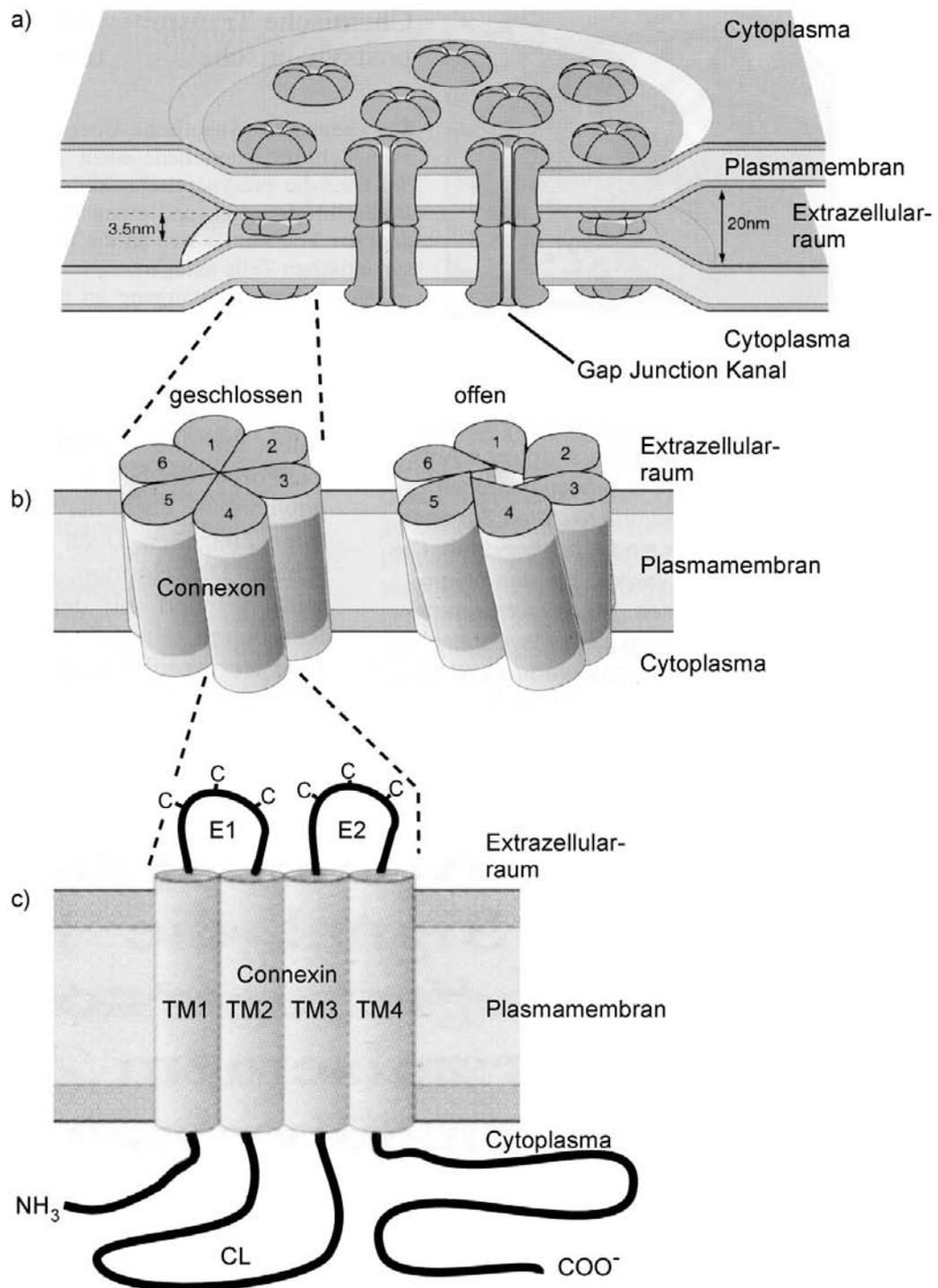
Erste Hinweise auf direkte Zell-Zell-Verbindungen (z. B. Weidmann, 1952) bestanden lange bevor man etwas Genaueres über Gap Junctions wusste. An Riesenmotorneuronen des Flusskrebsses wurde 1959 von Furshpan und Potter erstmals eine direkte elektrische Kopplung zweier Zellen nachgewiesen. Die für Gap Junctions typischen Membranstrukturen - mit einer Annäherung der gegenüberliegenden Zellmembranen, verursacht durch in Plaques auftretende Zell-Zellproteinvollkanäle - wurden erstmals 1966 von Loewenstein und Kanno beschrieben. Diese Reduktion des Abstandes zweier Zellmembranen von normalerweise 20 – 30 nm bis auf einen Spalt (engl. gap) von 3 – 4 nm, welche an dieser Stelle über bestimmte Proteinkanäle Verbindungen (engl. junction) aufbauen, prägte den Begriff der „Gap Junctions“ (Revel und Karnovsky, 1967).

Gap Junctions sind direkte, regulierbare Zell-Zell-Verbindungen (Kanäle), die die zytoplasmatischen Kompartimente zweier benachbarter Zellen miteinander verbinden. Sie treten einzeln oder als Ansammlung von bis zu mehreren tausend in so genannten Gap Junction-Plaques auf. Im Tierreich sind sie weit verbreitet und bereits bei Coelenteraten beschrieben (Fraser et al., 1987). In Vertebraten sind Gap Junctions in fast allen Geweben mit Ausnahme differenzierter Skelettmuskeln, Erythrozyten und Spermien beschrieben (Gilula, 1978). Eine Gap Junction-Kopplung zwischen gleichen Zellen wird als homolog, zwischen verschiedenen Zelltypen als heterolog bezeichnet. Über Gap Junction-Kanäle werden die Zellen zu einem funktionellen Synzytium verbunden, welches den passiven Austausch polarer Moleküle von bis zu 1,8 kDa erlaubt (Neijssen et al., 2005).

## Einleitung

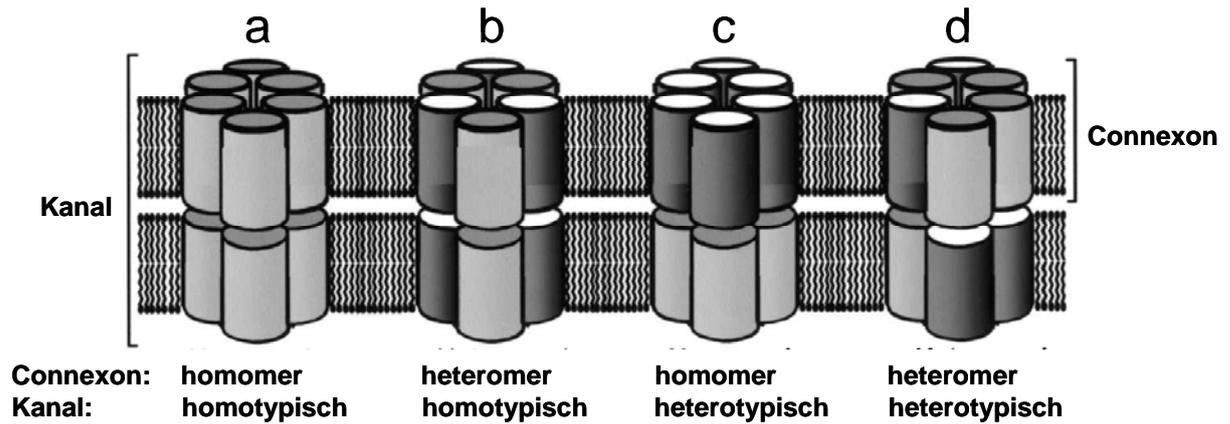
Gap Junction-Kanäle der Vertebraten werden aus Connexin-Proteinen aufgebaut, während bei Invertebraten - wahrscheinlich durch konvergente Evolution entstanden – die Innexine ihre Aufgabe übernehmen. Deren Aufbau und Funktion ist denen der Connexine der Vertebraten ähnlich (Phelan und Starich, 2001). Pannexine hingegen sind die Innexin-ähnlichen Proteine der Vertebraten (Panchin et al., 2000; Bruzzone et al., 2003). Im Folgenden wird ausschließlich auf die aus Connexin-Isoformen bestehenden Gap Junctions der Säugetiere näher eingegangen.

Ein Gap Junction Vollkanal besteht aus je zwei gleichen oder verschiedenartig aufgebauten Halbkanälen, den Connexonen (homo- bzw. heterotypischer Kanal; Goodenough, 1976; Elfgang et al., 1995; Abb. 1). Jede der miteinander verbundenen Zellen bildet ein Connexon aus. Die Connexone besitzen in ihrem Inneren eine hydrophile Pore von ca. 2 nm Durchmesser (Perkins et al., 1997 und 1998), welche reversibel geschlossen werden kann (Simpson et al., 1977). Die Connexone durchspannen die jeweilige Zellmembran und bestehen aus je sechs Transmembranproteinen (siehe Abb. 1), Die als Connexine bezeichnet werden und radial die Connexonpore umgeben (Yeager et al., 1998; Unger et al., 1999). Wird ein Connexon nur aus einer Sorte Connexin-Proteine aufgebaut, nennt man es homomer, werden verschiedenartige Connexine verwendet, so spricht man von einem heteromeren Connexon (Jiang und Goodenough, 1996; Abb. 2). Connexone benachbarter Zellen „koppeln“ über die extrazellulären Domänen der an ihrem Aufbau beteiligten Connexine und verbinden so die Zytoplasmata der beiden Zellen, schirmen ihr Zytoplasma allerdings auch von dem extrazellulärem Raum ab (Kumar und Gilula, 1996; Yeager und Nicholson, 1996). Die für Connexine typischen, konservierten Cysteinreste der extrazellulären Schleifen scheinen hierfür essentiell zu sein (Foote et al., 1998). Sie bilden intramolekulare Disulfid-Brücken zwischen den Schleifen zur Stabilisierung innerhalb eines Connexins aus, interagieren aber nicht mit anderen Connexinen des Connexons (John and Revel, 1991).



**Abbildung 1:**

Modell von Gap Junction-Kanälen und Connexinen in einem Gap Junction-Plaques. Schematische Darstellung eines Gap Junction-Plaques zwischen zwei Zellen und den die Plasmamembranen durchspannenden Gap Junction-Kanälen (a). Modell des Connexonaufbaus aus sechs Connexinen im geöffneten und geschlossenen Zustand beim so genannten Irisblendenmodell (b). Verallgemeinertes Modell eines Connexins (c). Das Polypeptid durchspannt mit vier  $\alpha$ -Helizes (TM1 bis TM4) die Zellmembran. In beiden extrazellulären Schleifen (E1 und E2) sind drei konservierte Cysteinreste (-C) angedeutet. Die zyttoplasmatische Schleife ist mit CL gekennzeichnet (modifiziert nach Kandel et al., 1996).



**Abbildung 2:**

Schema des unterschiedlichen Aufbaus der Gap Junction-Kanäle. Durch die Beteiligung sechs gleicher oder unterschiedlicher Connexin-Isoformen werden homo- bzw. heteromere Connexone gebildet. Diese wiederum können homo- oder heterotypische Kanäle bilden (Evans und Martin, 2002). a: homotypisch, homomer; b: homotypisch, heteromer; c: heterotypisch, homomer; d: heterotypisch, heteromer.

## 1.2 Connexine: Die Bausteine der Gap Junctions

Über Connexine als Gap Junction Proteine gewann man 1979 erste Erkenntnisse. Verschiedene Gap Junction Proteine konnten durch differenzielle Zentrifugation Gap Junction reicher Membranfraktionen angereichert und biochemisch analysiert werden (Hertzberg und Gilula, 1979; Henderson et al., 1979; Traub et al., 1982).

Antikörper gegen diese Proteine reagieren spezifisch mit Gap Junction-Plaques (Willecke und Traub, 1990). 1986 wurde mittels degenerierter Oligonukleotide, welche von einer bekannten Aminosäuresequenz abgeleitet waren, die erste cDNS Sequenz eines Connexins isoliert (Heynkes et al., 1986; Cx32). Dies ermöglichte die weitere Suche nach neuen Connexingenen in genomischen und cDNS-Bibliotheken unter verringerter Hybridisierungs-Stringenz (Hennemann et al., 1992) oder über PCR-Amplifikationen mit degenerierten Startermolekülen (Haefliger et al., 1992; Söhl et al., 1998).

Seit 1987 werden Connexine mit der Abkürzung „Cx“ und der über die cDNS-Sequenz vorhergesagten Molekülmasse des Proteins in kDa (gerundet auf ganze Werte; bei Konflikten mit bereits beschriebenen Connexinen gerundet auf die erste Nachkommastelle) bezeichnet (Beyer et al., 1987). Wenn nötig, wird die jeweilige Spezies (abgekürzt mit dem kleinen Anfangsbuchstaben der englischen Bezeichnung) zur besseren Unterscheidung vorangestellt. In einer anderen Nomenklatur werden die Connexine mit GJ (Gap junction membrane channel protein) abgekürzt und nach Sequenzidentität in der Aminosäureabfolge der zytoplasmatischen Schleife jeweils in verschiedene Gruppen unterteilt ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ) und der zeitlichen Abfolge ihrer Entdeckung entsprechend nummeriert (Gimlich et al., 1990; Söhl et al., 1998). Daher rührt beispielsweise die alternative Bezeichnung für z. B. das Connexin

## Einleitung

Cx31 als GJ $\beta$ 3. In dieser Arbeit wird die Nomenklatur nach Beyer et al., (1987) verwendet (siehe auch Söhl und Willecke, 2003).

Über Northern Blot-Analysen und immunhistochemische Methoden konnten verschiedene Gewebe auf die jeweilige Connexin-Expression getestet werden. Bisher ist kein Connexin bekannt, welches ubiquitär vorhanden ist; vielmehr zeigen alle Connexine ein gewebe- und entwicklungsspezifisches Ausprägungsmuster. Derzeit sind 20 Connexine im Genom der Maus und 21 Connexine im Genom des Menschen identifiziert und teilweise bereits charakterisiert worden (siehe Tab. 2; Willecke et al., 2002).

Trotz der unterschiedlichen Molekülgrößen und Aminosäuresequenzen besitzen alle bisher beschriebenen Connexine einen sehr ähnlichen Aufbau (siehe Abb. 1). Ein verallgemeinerbares Hydrophobizitätsprofil (Kyte und Doolittle, 1982) des Cx32 (Paul, 1986) ergab, dass jedes Connexin vier  $\alpha$ -helikale Transmembranregionen, zwei extrazelluläre Schleifen sowie drei im Zytoplasma liegende Proteindomänen besitzt (Aminoterminus, zytoplasmatische Schleife, Carboxyterminus; siehe Abb. 1C). Die Aminosäuresequenzen der extrazellulären Schleifen (ca. 25 Aminosäuren) sind unter den Connexinen besonders konserviert (60 - 90 %), wobei die konservierte Lage der Cysteinreste - mit Ausnahme von Cx31 (Hoh et al., 1991) und Cx23 (Gustincich et al., 2003; als Connexin ähnlich beschrieben) - besonders auffällt (E1: CX<sub>6</sub>CX<sub>3</sub>C; E2: CX<sub>4</sub>CX<sub>4</sub>C). Die größte Variabilität im Aufbau der Connexin-Proteine zeigt sich in Länge und Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Schleife und des C-Terminus, woraus sich die unterschiedlichen Größen der Connexine ergibt.

### 1.2.1 Aufbau der Connexingene

Die Connexingene zeigen einen recht einfachen genomischen Aufbau (Willecke et al., 2002). Die meisten Connexin-mRNS-Moleküle bestehen aus einem untranslatierten Exon I, welches durch einen unterschiedlich langen Intronbereich von Exon II getrennt ist. Auf Exon II befindet sich das komplette Leseraster des Connexins und das PolyA-Signal. Neuere Analysen (Söhl und Willecke, 2003) zeigten jedoch für mehrere Connexin-Gene Abweichungen von dieser Regel. Datenbankanalysen zeigen für Cx23 ein auf drei Exone verteiltes offenes Leseraster (Dr. Goran Söhl, pers. Mitteilung). Bei Cx29 liegt zwar die gesamte kodierende Region auf Exon II, jedoch liegt die zur Translation notwendige Kozak-Konsensus-Sequenz (Kozak, 2001) auf Exon I. Für Cx30 und Cx32 sind alternative Promotoren und ein alternatives Spleißen des Exon I bekannt (Neuhaus et al., 1995; Söhl et al., 2001b; Dr. Goran Söhl, pers. Mitteilung). Ausnahmen zeigen auch das Cx36-Gen (Söhl et al., 1998) sowie mCx39 bzw. hCx40.1, bei denen die kodierende Region auf Exon 1 und 2 zu finden ist. Für das Maus-Cx45-Gen (mCx45) wurde das alternative Einspleißen eines zusätzlichen Exons (im 5'-UTR Bereich) beschrieben, wobei dann Exon III das

## Einleitung

gesamte Leseraster des Cx45 enthält (Beyer et al., 2000; Krüger et al., 2000). Das mCx57 enthält in der kodierenden Region des C-Terminus eine zusätzliche funktionelle Spleiß-Donor-Stelle, welche zumindest in der Retina verwendet wird. Hierdurch werden die letzten 25 Aminosäuren (Manthey et al., 1999) durch zwölf andere eines dritten Exons ersetzt (Hombach et al., 2004).

Wie die Mitglieder anderer Genfamilien sind die verschiedenen Connexingene wahrscheinlich durch Genduplikation und anschließende Mutationen entstanden. Dennoch liegen die bisher entdeckten Connexingene der Maus meist auf verschiedenen Chromosomen und nicht in engen Kopplungsgruppen, wie z. B. bei der Hox- oder Globin-Genfamilie. Eine Ausnahme bilden die Connexine 37, 31, 30.3 und 31.1, die in sehr geringem Abstand auf Chromosom 4 der Maus bzw. Chromosom 1 des Menschen liegen (siehe Tabelle1).

Mensch:

Größe CR Cx37	1002
Abstand Cx37 – Cx31	8638
Größe CR Cx31	813
Abstand Cx31 – Cx30.3	22707
Größe CR Cx30.3	801
Abstand Cx30.3 – 31.1	3102
Größe CR Cx31.1	822

Maus:

Größe CR Cx37	1002
Abstand Cx37 – Cx31	12956
Größe CR Cx31	813
Abstand Cx31 – Cx30.3	24608
Größe CR Cx30.3	801
Abstand Cx30.3 – 31.1	3387
Größe CR Cx31.1	816

(Alle Angaben in Basenpaaren [bp])

**Tabelle 1:**

Vergleich des Abstands und der Größe der kodierenden Regionen der Connexingene auf Chromosom 1 des Menschen, bzw. Chromosom 4 der Maus.

## Einleitung

Connexin der Maus	Vorkommen in der Maus (Beispiele)	orthologes Cx (Mensch)	Referenzen
mCx23 <sup>1)</sup>	<i>noch unbekannt</i>	hCx23 <sup>1)</sup>	Gustincich et al., 2003
---	---	hCx25	Bondarev et al., 2001; Söhl et al., 2003
mCx26	Leber, Niere, Haut, Gehirn, Plazenta, Cochlea	hCx26	Zhang und Nicholson, 1989; Yotsumoto et al., 2003
mCx29	Schwann-Zellen, Oligodendrozyten	hCx30.2 hCx31.3 <sup>2)</sup>	Altevogt et al., 2002 Eiberger et al., 2006
mCx30	Haut, Gehirn, Cochlea, Niere	hCx30	Dahl et al., 1996; Teubner et al., 2003; McCulloch et al., 2005
mCx30.2	Herz	hCx31.9	Nielsen und Kumar, 2003; Kreuzberg et al., 2005
mCx30.3	Haut, Niere, Riechepithel, Vomeronasalorgan	hCx30.3	Hennemann et al., 1992; Richard et al., 2003 ; Zheng-Fischhöfer et al., eingereicht
mCx31	Haut, Plazenta, Hoden	hCx31	Hennemann et al., 1992; Mhatre et al., 2003
mCx31.1	Haut, Hoden, Riechepithel, Hirn, Vomeronasalorgan	hCx31.1	Hennemann et al., 1992; Al Moustafa et al., 2002 ; Zheng-Fischhöfer et al., eingereicht
mCx32	Leber, Schwann-Zellen und Oligodendrocyten	hCx32	Zhang und Nicholson, 1989 Hanemann et al., 2003
mCx33	Hoden	---	Haefliger et al., 1992
mCx36	Neuronen in Retina und Gehirn, Pankreas, Riechepithel	hCx36	Condorelli et al., 1998 Meyer et al., 2002
mCx37	Lunge, Niere, Blutgefäße	hCx37	Willecke et al., 1991; Kumari et al., 2000
mCx39	embryonale Muskulatur	hCx40.1	Eiberger et al., 2001; von Maltzahn et al., 2004
mCx40	Herz, Lunge, Niere, Blutgefäße	hCx40	Willecke et al., 1990; Nao et al., 2003
mCx43	fast ubiquitär, besonders Herz, Gehirn, Astrozyten, Gefäße	hCx43	Beyer et al., 1989; van Veen et al., 2001
mCx45	Herz, Lunge, Blutgefäße, Niere, Neuronen im Gehirn, Retina	hCx45	Hennemann et al., 1992; Krüger et al., 2000; Maxeiner et al., 2003
mCx46	Linse, Herz	hCx46	Paul et al., 1991; Pal et al., 2000
mCx47	Rückenmark, Oligodendrozyten	hCx47	Teubner et al., 2001; Odermatt et al., 2003
mCx50	Linse	hCx50	White et al., 1992; Berthoud et al., 2003
---	---	hCx59	Söhl et al., 2003
mCx57	Horizontalzellen der Retina, Thymus	hCx62	Manthey et al., 1999; Hombach et al., 2004

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der bisher identifizierten Connexine der Maus und des Menschen sowie deren Haupt-Expressionsorte (modifiziert nach Willecke et al., 2002)

<sup>1)</sup> Cx23 als Cx-ähnlich <sup>2)</sup> mögliche Spleißisoform des hCx30.2

### 1.3 Funktionen und Regulation der Gap Junctions

Um die Funktion der Gap Junctions besser zu verstehen, wendet man derzeit unterschiedliche Versuchsansätze an. Kopplungseigenschaften verschiedener Gap Junctions werden in Zellkulturexperimenten ermittelt. Kopplungsdefiziente HeLa oder andere Zellen können durch Transfektion dazu gebracht werden, dass sie Gap Junction-Proteine exprimieren. Anschließend können die Kopplungseigenschaften analysiert werden (Elfgang et al., 1995). Es ist ebenfalls möglich, künstlich in Liposomen eingebrachte Gap Junctions in zellfreier Umgebung zu untersuchen (Nikaido und Rosenberg, 1985; Ahmad et al.; 1999). Die Gap Junction-Expression in *Xenopus* Oozyten-Paaren nach *in vitro*-Transkription bieten sich für elektrophysiologische Untersuchungen an (Swenson et al., 1989). Ein weiterer Ansatz zur Aufklärung der Funktionen der Gap Junctions *in vivo* - zusätzlich zu Analysen am Wildtyp Organismus - ist die Erzeugung transgener Mäuse (Nagy A. et al., 2003). Die Erzeugung transgener Mäuse ist mittels Vorkerninjektion von DNS in befruchtete Eizellen (Gordon und Ruddle, 1981; Palmiter et al., 1982) ebenso möglich wie mit der embryonalen Stammzell-Technik (Johnson et al., 1989; Gossen und Vlieg, 1993).

Eine Gap Junction vermittelte Kopplung erlaubt einen metabolischen, signalvermittelnden und/oder elektrischen Austausch (Simon und Goodenough, 1998). Als metabolische Kopplung bezeichnet man den Gap Junction-vermittelten Austausch von Stoffwechselprodukten wie zum Beispiel Aminosäuren, Nukleinsäurevorstufen oder Zuckern (Rieske et al., 1975). Über Metabolitenaustausch können gekoppelte Zellen Konzentrationsunterschiede ausgleichen und so beispielsweise Zellen ernähren, welche nicht direkt an Blutgefäßen liegen, wie dies in den Faserzellen der Augenlinse sowie bei den Blutschranken im Gehirn oder der Plazenta der Fall ist (Gabriel et al., 1998).

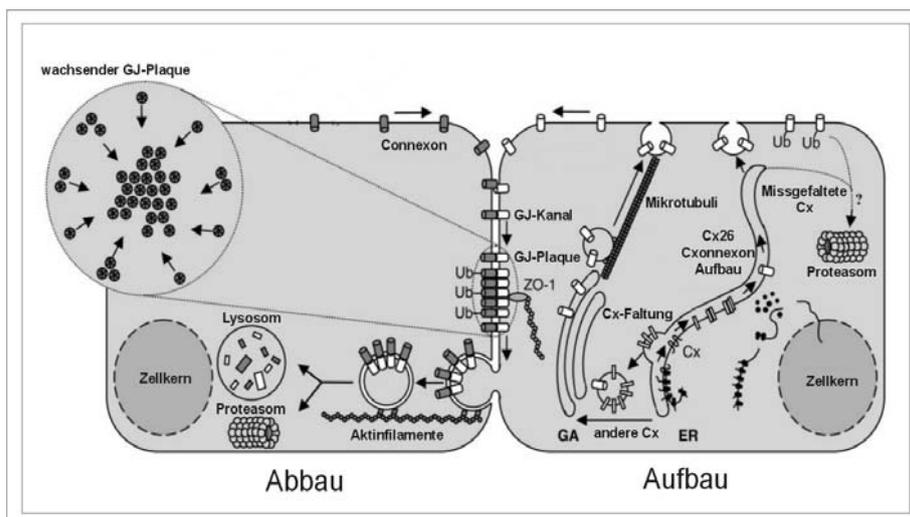
Signalvermittelnde Kopplung kann über den Austausch von Zweitbotenstoffen (second messenger) wie cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat),  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen,  $\text{IP}_3$  (Inositol-1,4,5-trisphosphat; Sáez et al., 1989) oder  $\text{NAD}^+$  (Nikotinamidadenindinukleotid; Bruzzone et al., 2001) erfolgen. Dies ermöglicht den gekoppelten Zellen, eingehende extrazelluläre Signale weiterzuleiten und im Gewebeverband Antworten zu koordinieren bzw. zu synchronisieren. Hierdurch ergeben sich Wachstumskontrollfunktionen der Gap Junctions durch ihre Beteiligung an der Ausbreitung sekundärer Botenstoffe z. B. während der Embryogenese (Valdimarsson und Kidder, 1995; Reuss et al., 1997) oder der Karzinogenese (Holder et al., 1993; Temme et al., 1997; Trosko und Ruch, 1998).

Durch elektrische Synapsen in neuralem Gewebe (Bennett und Zukin, 2004) wird eine direkte Reizweiterleitung (Bruzzone und Ressot, 1997) sowie eine Synchronisation intrinsischer Oszillationen (De Zeeuw et al., 2003) ermöglicht. Im Herzmuskel dienen Gap Junctions zur Erregungsweiterleitung zwischen den Herz-

## Einleitung

muskelzellen und gewährleisten so eine koordinierte Herzkontraktion (Gros und Jongasma, 1996; Kirchhoff et al., 1998). Zusätzlich haben Gap Junctions homöostatische Pufferfunktionen in neuronalen Geweben (Giaume und Venance, 1998; De Pina-Benabou et al., 2001). Gekoppelte Astrozyten nehmen nach neuronaler Aktivität freigesetzte  $K^+$ -Ionen aktiv aus dem Extrazellularraum auf und verteilen sie zum Abbau des entstandenen elektrochemischen Gradienten über Gap Junctions an benachbarte Astrozyten (Enkvist und McCarthy, 1994; Ransom, 1995). Teilweise sind Gap Junction-Verbindungen während der Entwicklung auf bestimmte Zellgruppen beschränkt. Hierdurch entstehende Kopplungskompartimente konzentrieren somit die direkte Kommunikation auf bestimmte Bereiche (Levin, 2002). Darüber hinaus kann der Gap Junction-vermittelte Stoffaustausch eine asymmetrische Charakteristik annehmen, indem heterotypische Mischkanäle als Gleichrichter auftreten (Robinson et al., 1993; Brink et al., 1997).

Die Regulation Gap Junction-vermittelter Kopplung kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Regulationsmöglichkeiten bestehen bei der Verfügbarkeit der Kanäle, also der Transkription und der Translation der Connexingene. Aber auch der Aufbau und Transport der Connexone kann gesteuert werden (siehe Abb. 3; Yeager et al., 1998). Hierbei gibt es Hinweise auf die Beteiligung von Zelladhäsionsproteinen wie E- und N-Cadherin bei der Plauebildung. Die Lebensdauer der Gap Junction-Kanäle kann über die Regulation proteasomaler und ubiquitinabhängiger Abbauewege reguliert werden (Laird, 1996; Laing et al., 1997; Leithe und Rivedal, 2004). Die Stabilität und somit Lebensdauer des Connexin-Transkripts kann, cAMP vermittelt, erhöht werden (Fujita et al., 1987; Atkinson et al., 1995). Die Halbwertszeit der Connexin-Proteine liegt im allgemeinen unter fünf Stunden und erlaubt somit nur recht langsame, aber dennoch dynamische regulatorische Eingriffe.



**Abbildung 3:**

Auf- und Abbaueite der Gap Junction (GJ) Plaques von der Transkription (unten rechts) bis zur Degeneration (unten links) der Connexine. Im endoplasmatischen Reticulum (ER) werden die Connexine gefaltet und zu Connexonen zusammengesetzt. Während Cx26 Connexone direkt in die Plasmamembran eingebracht

werden, werden die anderen Connexone (gezeigt für Cx32 und Cx43; Evans und Martin, 2002) über den Golgi-Apparat (GA) und Vesikel zur Membran transportiert. Connexone in der Membran können dann ubiquitiniert (Ub) und dem Abbau in Lysosomen und Proteasomen zugeführt werden. Abbildung verändert nach Sáez et al., 2003.

## Einleitung

Zusätzlich zu den eher langsamen Regulationsmechanismen über die Anzahl der Gap Junction-Kanäle kann auch der Öffnungszustand eines Gap Junction-Kanals reguliert werden. Es wird vermutet, dass die Öffnungszeiten der Kanäle von den zytoplasmatischen Domänen der Connexine bestimmt werden (Verselis et al., 1994). Zum Schließmechanismus der Gap Junction-Kanäle gibt es zwei Modelle, die auch als Kombination vorstellbar wären.

Ein möglicher Verschluss-Mechanismus ist das „Partikel-Rezeptor-“ oder auch „Ball-an-der-Kette-“ Modell, bei dem der C-Terminus des Connexins von der zytoplasmatischen Schleife gebunden wird und so die Kanalpore verschließt (Homma et al., 1998). Das „Irisblenden-“ Modell beschreibt bei Änderungen des Öffnungszustandes eine Rotation oder Konformationsänderung der Connexine im Connexon (Unwin und Ennis, 1983; Spray et al., 1985; Abb.1B). Auslöser des Verschließens der Gap Junction-Kanäle kann zum Beispiel der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration sein, wie er etwa bei Zellverletzungen auftritt (Loewenstein und Kanno, 1966; Spray et al., 1994).

Veränderungen der Spannungsdifferenzen über den Kanal ( $V_j$ ; Spray et al., 1991; Brink, 2000) oder Senkung des intrazellulären pH-Wertes können ebenfalls den Verschluss eines Gap Junction-Kanals verursachen (Wang et al., 1996; Francis et al., 1999; Trexler et al., 1999). Phosphorylierungen der Connexin-Proteine durch Proteinkinasen - hier kann man einen Rückkopplungsmechanismus bei manchen Signalübermittlungswegen vermuten - führen außerdem zu schnellen posttranslationalen Modifikationen der Connexine (Cruciani und Mikalsen, 2002). Solche Modifikationen können die Zusammensetzung der Connexone, deren Öffnungszustand und Halbwertszeit je nach Connexin und Zelltyp unterschiedlich beeinflussen (Bennett et al., 1991; Sáez et al., 1998; Cooper und Lampe, 2002).

Zusätzlich zu den beschriebenen Gap Junction-Vollkanälen wurde in letzter Zeit immer öfter auch von funktionellen und physiologisch wirksamen Gap Junction-Halbkanälen berichtet (Bennett et al., 2003; Sáez et al., 2003). Diese Halbkanäle verbinden das Zytoplasma der Zelle mit dem extrazellulären Medium und müssen daher in ihrem Öffnungszustand regulierbar sein (Li et al., 1996; Trexler et al., 1996). Die meisten Hinweise auf Connexin-Halbkanäle wurden bisher in Zellkultur gewonnen, wo auch die meisten Untersuchungen hierzu durchgeführt wurden (Contreras et al., 2003). Die Funktion der Connexin-Halbkanäle wird in Modellen hauptsächlich im Hinblick auf die Signalweiterleitung über das extrazelluläre Medium mittels ATP oder  $\text{NAD}^+$  diskutiert (Contreras et al., 2003).

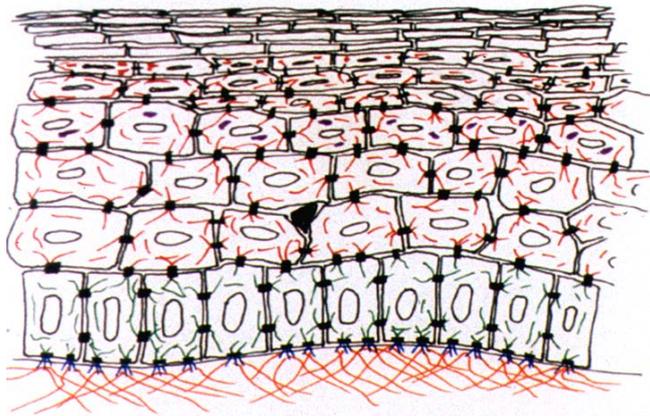
### **1.4 Funktion der Connexine in der Haut**

Die adulte Haut besteht aus zwei klar abgegrenzten Gewebeschichten, der Dermis, die mesodermalen Ursprungs ist, und der Epidermis, die sich aus dem Ektoderm entwickelt (Fuchs et al., 2000). Die primär aus Keratinozyten aufgebaute Epidermis ist wiederum in vier Schichten unterteilt: Die innere Basalschicht (stratum basale), die Stachelzellschicht (stratum spinosum), die Körnerschicht (stratum granulosum) und die äußere Körnerschicht (stratum corneum). Die Zellen der Basalschicht proliferieren ständig und differenzieren immer weiter, je mehr sie in Richtung Oberfläche wandern. Dort werden sie als Schuppen abgestoßen. Die Erhaltung einer konstanten Dicke der Epidermis erfordert eine genaue Regulation des Keratinozytenwachstums und ihrer Differenzierung. Von Bultjens et al. wurde 1988 vorgeschlagen, dass die Gap Junction vermittelte Kommunikation eine entscheidende Rolle bei diesem Differenzierungsprozess spielen könnte (Bultjens et al., 1988). Ultrastrukturelle Analysen von menschlicher (Caputo et al., 1977) und Nagerepidermis (Risek et al., 1992) haben gezeigt, dass Gap Junctions zwischen Keratinozyten der basalen spinösen und der granulären Schicht vorkommen, nicht jedoch in der oberen Körnerschicht. Diese Ergebnisse stimmen mit Farbstoff-Kopplungsexperimenten überein, die eine funktionelle Kopplung zwischen den inneren drei Epidermisschichten der neugeborenen Maus (Kam et al., 1986), der adulten Maus (Baker und Garrod, 1993) und des erwachsenen Menschen (Salomon et al., 1988) zeigen. Die epidermalen Keratinozyten scheinen dabei in kleinen Kommunikationseinheiten organisiert zu sein, die aus 20 bis 25 Zellen bestehen. Farbstoff-Übertragung wurde zwischen basalen und suprabasalen Keratinozyten innerhalb eines Kompartiments beobachtet, sie war jedoch zwischen Keratinozyten benachbarter Kompartimente reduziert. Die epidermalen Kommunikationskompartimente stimmen mit den epidermalen Proliferationseinheiten überein (Potten, 1981), was wiederum zu der Rolle der Gap Junction-vermittelten Zellkommunikation bei der Kontrolle des Keratinozytenwachstums konsistent ist (Kam et al., 1986 und Pitts et al., 1988).

Die molekulare Basis, der die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Kommunikationskompartimente zugrunde liegt, ist nicht bekannt. Es sind jedoch markante Änderungen der Connexin-Expression bei pathologisch oder experimentell induzierter Keratinozytenproliferation beobachtet worden. Bei normaler, gesunder Haut bewirkt eine Behandlung mit Retinsäure eine Verdickung der Epidermis und

## Einleitung

eine Erhöhung der Anzahl der Keratinozyten, begleitet von einer starken Hochregulation der Connexin26 Expression in allen epidermalen Schichten und einer etwas geringeren Erhöhung der Connexin43 Expression (Masgrau-Peya et al., 1997). Bei der Wundheilung scheinen Connexine ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen, da die Expression der Connexin Proteine stark reguliert wird. Während des Wundheilungsprozesses werden Cx31 und Cx43 herab und Cx26 und Cx30 hinaufreguliert (Kretz et al., 2003).



- stratum corneum
- stratum granulosum  
(Connexin 30.3, 31, 31.1, 37, (26), (30))
- stratum spinosum  
(Connexin 30.3, 31, 31.1, 37, 43)
- stratum basale  
(Connexin 43, 40, 37, (31))
- Dermis

### Abbildung 4:

Vorkommen der verschiedenen in der adulten Haut exprimierten Connexine. Die Connexine sind in der Schemazeichnung (verändert nach Vorlage von Prof. Dr. T. Magin) den jeweiligen Epidermisschichten zugeordnet. In rot dargestellt die beiden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig in diesen Schichten nachgewiesenen Connexine.

## 1.5 Connexin bedingte Hautkrankheiten

Die Wichtigkeit der Connexine in der Haut zeigt sich vor allem durch eine große Anzahl an Hauterkrankungen, die auf Mutationen in Connexin Genen zurückzuführen sind (siehe Tabelle 3). Bis heute sind Mutationen in fünf verschiedenen Connexin Genen bekannt, die zu Hautphänotypen führen. Dies sind Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx43. Einige der hervorgerufenen genetischen Defekte sind auf die Haut begrenzt, andere rufen ein weitaus komplexeres Krankheitsbild hervor. Unter anderem werden Symptome wie Hörverlust, Nagel- und Haarabnormalitäten, Keratitis oder Neuropathie auf Connexinmutationen zurückgeführt. Sogar innerhalb eines Gens können verschiedene distinkte Mutationen sehr unterschiedliche Phänotypen hervorrufen (vergl. Cx26: Richard et al., 2005). Im Gegensatz zum Innenohr, wo autosomal rezessive Null-Allele von Cx26, Cx30, Cx31 zu "nonsyndromic sensorineural hearing loss" (SNHL) führen (Nance, 2003), ist bei Verlust von einem Connexin in der Haut in der Regel keine Veränderung zu beobachten (Willecke et al., 2002). Dies lässt Vermutung zu, dass in der Haut eine hohe funktionelle Redundanz der verschiedenen Connexine vorliegt. Eine Ausnahme bildet das Cx43, welches, wenn es in der Haut von Mäusen ausgeschaltet wird, eine

## Einleitung

um einen Tag beschleunigte Wundheilung hervorruft (Kretz et al., 2003). Die Mehrzahl der pathogenen Connexin-Gen Mutationen mit Ausprägung in der Haut sind autosomal dominant.

## Einleitung

Erkrankung	Gen	Protein	klinisches Erscheinungsbild	Referenzen
Erythrokeratodermia variabilis (EKV)	GJB3, GJB4	Cx31 Cx30.3	Transiente rötliche Plaques und generelle Hyperkeratose oder klar abgegrenzte hyperkeratotische Plaques, PPK (palmoplantare Keratodermata) in ca. 50% der Patienten	Richard et al., 1998; Wilgoss et al., 1999; Macari et al., 2000; Richard et al., 2003; Morley et al., 2004; Gotfried et al., 2002; Terrinoni et al., 2004
Diffuse palmoplantare Keratoderma mit sensorineuralem Hörverlust (SNHL)	GJB2	Cx26	Starke bis schwere Ausprägung sensorineuralen Hörverlusts, diffuse oder plaque ähnliche PPK	Richard et al., 1998; Heathcote et al., 2000; Loffeld and Kelsell, 2000; Rouan et al., 2001; Uyguner et al., 2002
Vohwinkel Syndrom	GJB2	Cx26	Mildes bis moderates SNHL; diffuse PPK mit Honigwaben ähnlicher Oberfläche; hyperkeratotische Plaques auf distalen Extremitäten; Zirkuläre Zusammenschnürungsbanden an den Fingern (Pseudainhum)	Maestrini et al., 1999; Kelsell et al., 2000
Bart-Pumphrey Syndrom (BPS)	GJB2	Cx26	Starke bis schwere Ausprägung von SNHL, variabler Grad von diffusen PPK; Leukonychia; hyperkeratotische Plaques an den Fingergelenken	Richard et al., 2004
Keratitis-Ichthyosis-Taubheits Syndrom (KIDS)	GJB2 GJB6	Cx26 Cx30	Starke bis schwere Ausprägung von SNHL, Erytheme, hyperkeratotische Plaques im Gesicht und an den Extremitäten und/oder follikuläre Hyperkeratosen; Keratitis und corneare Neovaskularisation; erhöhte Anfälligkeit für mucocutane Infektionen und Karzinome; variable Nagel Störungen, Haarausfall oder spärlicher Haarwuchs	Richard et al., 2002; van Geel et al., 2002; van Steensel et al., 2002; Alvarez et al., 2003; Wassermann et al., 2003; Yotsumoto et al., 2003; Montgomery et al., 2004; Jan et al., 2004
Hidrotic ectodermal dysplasie (Clauston Syndrom)	GJB6	Cx30	Milde, diffuse PPK; hypo- oder hypertrophische Nageldystrophie, schütteres oder nicht vorhandenes Haar; durchschnittliche Transpiration und gewöhnlich normales Hörvermögen	Lamertine et al., 2000; Smith et al., 2002; van Steensel et al., 2003; Zhang et al., 2003
Oculo-dento-digitale Dysplasie (ODDD)	GJA1	Cx43	PPK; schütteres Haar, Schädel und limbale Dystrophie; Nagel Dystrophie; neurologische und kardiale sowie ophthalmologische Anormalitäten	Paznekas et al., 2004; Kjaer et al., 2004; Richardson et al., 2004 van Steensel et al., 2004; Kellermayer et al., 2004

**Tabelle 3:** Übersicht über Connexin-assoziierte Erkrankungen, die (auch) die Haut betreffen (nach Richard, 2005)

### **1.5.1 Erythrokeratoderma variabilis (EKV)**

*Erythrokeratoderma variabilis* (EKV) ist eine autosomal dominante Genodermatose mit unterschiedlicher intra- und interfamiliärer Ausprägung die zur genetisch heterogenen Gruppe der Erythrokeratosen gehört. Das Merkmal der EKV ist eine transienten Rötung sowie einer begrenzten oder generellen Hyperkeratose. Häufig überwiegt eines dieser Merkmale oder ein Merkmal wird nicht ausgeprägt (Richard et al., 2000). Diese Rötungen bei EKV zeigen sich als gut abgegrenzte Flecken von unterschiedlicher Intensität. Manchmal sind sie umgeben von farblosen Höfen. Sie können auch zu großen unterschiedlich geformten Plaques zusammengesetzt erscheinen oder sehen zielscheibenähnlich aus. Weiterhin können sie sowohl auf normaler Haut als auch in hyperkeratotischen Plaques auftreten (Richard et al., 2000). Die einzelne Erythematose dauert gewöhnlich einige Stunden bis Tage und kann durch ein brennendes Gefühl angekündigt oder begleitet werden. Die beachtliche Variabilität der erythematösen Flecken hinsichtlich ihrer Anzahl, Größe, Form, ihres Auftretens und auch bezogen auf die Dauer ihres Erscheinens, ist eine typische Eigenschaft der EKV, die sich in der Bezeichnung *variabilis* im Namen der Erkrankung widerspiegelt. Die Hyperkeratose kann lokal begrenzt sein oder auch generell auftreten, scheint jedoch innerhalb einer Familie konsistent zu sein (Richard et al., 2000). Die generalisierte Form der Hyperkeratose zeigt sich als dauerhafte gelb-braun-graue Verdickung der Haut mit akzentuierten Hautverfärbungen und seltenerem Ablösen der Hautschichten. Die lokale Form ist durch scharf abgegrenzte, hyperkeratotische Plaques charakterisiert. Relativ stabile Läsionen über den Knien, Ellenbogen, der Achillessehne, dem Fußrücken und in der Leiste sind weit verbreitet und können über Monate bis hin zu Jahren andauern. Individuelle Plaques scheinen sich auch in Größe und Form zu verändern oder sich zurückzubilden und normale Haut zu hinterlassen. Der Mechanismus hierbei ist bis heute unklar. Sowohl die Hyperkeratose als auch die Rötungen scheinen durch interne wie externe Faktoren ausgelöst zu werden. Diese können zum Beispiel Stress, plötzliche Temperaturveränderungen, mechanische Beanspruchung und Exposition gegenüber Sonnenlicht sein. Üblicherweise zeigt sich EKV zur Geburt oder im frühen Kindesalter und persistiert während des gesamten Lebens. EKV kann ernsthaft entstellend sein und so traumatische psychologische Schäden verursachen.



**Abbildung 5:**

Verschiedene Ausprägung der Erkrankung Erythrokeratodermia variabilis in Patienten. Verdickungen der Epidermis, die zum Abplatzen der Epidermis führen (A) sind ebenso zu beobachten wie gleichmäßige (C) oder unregelmäßige (B) Verfärbungen der Haut. Ein weiteres häufig auftretendes Merkmal ist die Verdickung der Hornhaut der Fußsohlen (D). (Abbildung aus Richard et al., 2000)

Bis heute sind Connexin-Mutationen in 18 miteinander nicht verwandten EKV Patienten und Familien mit vornehmlich nordeuropäischer Herkunft beschrieben worden. Dabei sind sieben Mutationen im Cx31 Gen und fünf Mutationen im Cx30.3 Gen beschrieben worden. Das klinische Erscheinungsbild dieser unterschiedlichen Mutationen ist generell nicht unterscheidbar. Art und Ort der Mutationen sind in beiden Genen sehr vergleichbar. Alle Mutationen betreffen Aminosäuren, die in der  $\beta$ -Gruppe der Connexine hochkonserviert sind. Es wird angenommen, dass sie einen dominant negativen Effekt auf die koexprimierten Wildtyp Connexine ausüben. Auch ein transdominant-negativer Effekt auf andere Connexinproteine wird diskutiert (Richard et al., 2003). Mit Ausnahme einer mehrmals nachgewiesenen Mutation in Cx31, die im zytoplasmatischen, carboxy-terminalen Rest von Cx31 liegt (L209F; Morley et al., 2005; Feldmeyer et al., 2005), befinden sich alle anderen Mutations-Cluster entweder im zytoplasmatischen Amino-Terminus (G12D, G12R) oder aber in den membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helizes des Cx31 (R42P, C86S, F137L) oder Cx30.3 (R22H, T85P, F137L, F189L; Abbildung 5; Richard et al., 1998, 2000, 2003;

## Einleitung

Wilgoss et al., 1999; Macari et al., 2000). Es gibt Spekulationen darüber, dass Mutationen in den Transmembrandomänen zu einer veränderten Regulation der elektrischen Kopplung zwischen den Zellen führen oder die Kinetik des Verschlusses der Kanäle verändern können. Der verbleibende hochkonservierte Glyzin-Rest an Position zwölf wird entweder durch einen positiv (G12R) oder negativ (G12D) geladenen Rest ersetzt. Diese Mutationen sollen einen Einfluss auf die Flexibilität dieser Domäne haben und damit auf die Connexin-Selektivität oder die durchgehenden Ladungen der Gap Junction-Kanäle haben (Lagree et al., 2003). Zusätzlich zu den bisher beschriebenen dominanten Connexin-Mutationen wurden auch zwei Mutationen für eine rezessive Variante der EKV beschrieben (Gottfried et al., 2002; Terrinoni et al., 2004). Es handelt sich dabei um homozygot auftretende Mutationen in Cx31, zum einen die Mutation L34P in der ersten Transmembrandomäne, zum anderen E100K in der zytoplasmatischen Schleife. Die gesunden Eltern trugen diese Mutationen jeweils heterozygot.

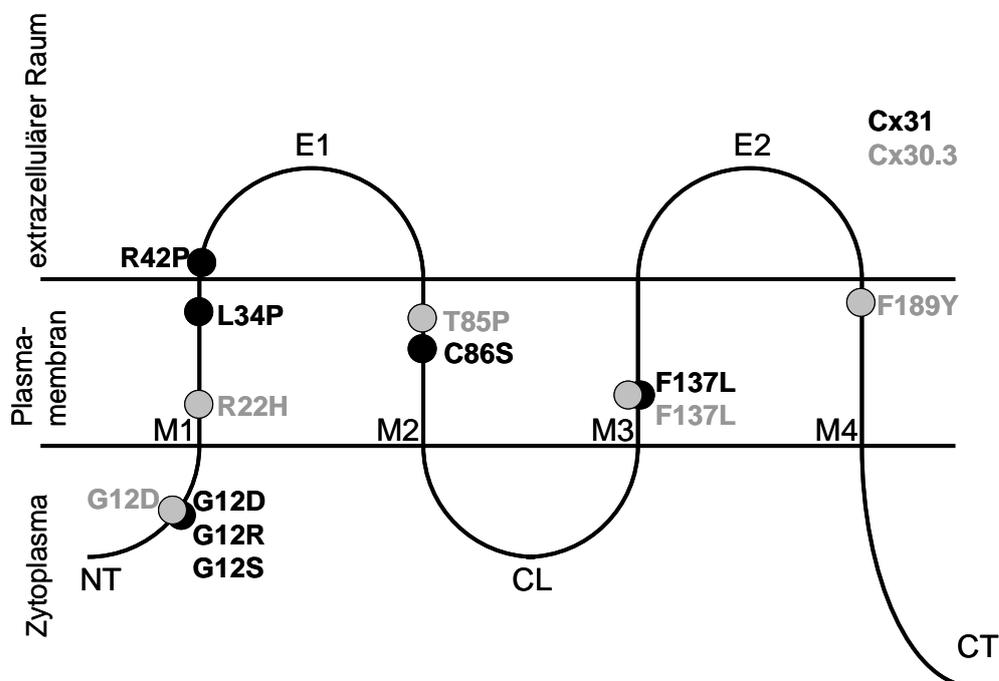
Weiterhin gibt es noch eine Reihe von Sequenzvarianten der kodierenden Regionen von Connexin31 oder Connexin30.3, die zu keinem Phänotyp führen. So ist zum Beispiel die Mutation R32W in Cx31 mit bis zu 17% in der Bevölkerung verbreitet (Lopez-Bigas et al., 2000). Es wurden sogar Patienten beschrieben, die einen faktischen Cx30.3 Knock-out aufweisen. Eine dieser Personen litt an frühem Hörverlust, aber es gibt keinen Nachweis dafür, dass ein eingeschränktes Hörvermögen durch Cx30.3-Defekte hervorgerufen werden muss, da es etliche Patienten gibt, die an Hörverlust leiden, aber ein nicht mutiertes Cx30.3 Gen besitzen (Lopez-Bigas et al., 2002). Ein zweiter Patient hatte keinerlei Hörschwierigkeiten, zeigte allerdings einen EKV-Phänotyp, der allerdings auch auf die Kombination mit der zusätzlich vorhandenen R32W Mutation in Cx31 zurückgeführt werden kann. Transgene Mäuse, die defizient für Cx30, Cx31 oder Cx43 sind, zeigen ebenso keinen Hautphänotyp (Willecke et al., 2002) wie Mäuse, die defizient für Cx31.1 und Cx30.3 sind (eigene Ergebnisse in Zusammenarbeit mit Dr. Qingyi Zheng-Fischhöfer, unveröffentlicht).

### **1.6 Funktionelle Aspekte der Cx31 und Cx30.3 Gen-Mutationen**

*In vitro* Expressions-Analysen haben gezeigt, dass Aminosäuresubstitutionen in Cx30.3 und Cx31 die intrazelluläre Verarbeitung und den Transport der Gap Junction-Proteine zur Plasmamembran stören oder verhindern. Es wurde diskutiert, dass die mutierten Proteine nicht korrekt gefaltet sein könnten und daraufhin von der intrazellulären Qualitätskontrolle erkannt und degradiert werden könnten (VanSlyke et al., 2000). Dieses führte dann zu einem Verlust der Gap Junction-Plaques und zu einer gestörten interzellulären Kommunikation (Di et al., 2002; Plantard et al., 2003; Rouan et al., 2003). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Expression einiger

## Einleitung

verschiedener Cx31 Mutationen, wie G12R (Diestel et al., 2002), G12D, G12R, R42P, C86S (Di et al., 2002; Common et al., 2003) und F137L (Rouan et al., 2003 und diese Arbeit) zum Tod der transfizierten HeLa Zellen führt. Ob diese Beobachtung eine Relevanz für die Expression dieser Mutationen in der Epidermis bei EKV hat, muss noch geklärt werden. Nichtsdestotrotz ging der Zelltod, der durch die Mutation G12R in Cx31 hervorgerufen wurde, mit einer verdoppelten Durchlässigkeit des Gap Junction Kanals für Farbstoffe in HeLa Zellen einher (Diestel et al., 2002). Im Gegensatz zu den Connexin31 Mutationen wurden bei den Cx30.3 Mutationen keine reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit festgestellt. Dies gilt ebenfalls für die Cx31F137L Mutation. Dies ist erstaunlich, da diese Mutation kotransfiziert mit Cx31 mit einem transdominant negativen Mechanismus in Zusammenhang gebracht wird (Plantard et al., 2003; Rouan et al., 2003). Es wurde durch Plantard et al. (2004) erstmals ein direkter Nachweis dafür erbracht, dass Cx31 und Cx30.3 in heteromeren Hemikanälen gemeinsam vorkommen und diese im Vergleich zu homomeren Kanälen stabiler und funktionell aktiver zu sein scheinen. Diese Ergebnisse lassen mögliche Erklärungen für ähnliche Phänotypen bei Mutation zu, die entweder Cx31 oder Cx30.3 betreffen. Allerdings ist anzunehmen, dass noch eine weit größere Komplexität vorliegt, da mehr als zwei Connexine an diesen Interaktionen und heteromeren Kanälen beteiligt sein könnten.



**Abbildung 6:**

Position der EKV auslösenden Mutationen in Connexin31 und Connexin30.3. Die Positionen 12 und 137 sind in beiden Connexinen von Mutationen betroffen. Bis auf eine Ausnahme (R42P in Cx31) liegen alle Mutationen in den Transmembran-Regionen oder im N-Terminus des Connexins.

## Einleitung

### 1.6.1 Die F137L Mutation

Die F137L Mutation tritt sowohl in Cx31 als auch in Cx30.3 auf und ruft einen EKV-Phänotyp in menschlichen Patienten hervor. Die Veränderung der Aminosäure ist auf eine Punktmutation der Base an Position 409 von T nach C zurückzuführen, so dass das entsprechende Basen-Triplett statt für Phenylalanin (F) für Leucin (L) kodiert. Daher kommt es zu der Bezeichnung F137L, da an der Aminosäure-Position 137 ein Phenylalanin (F) gegen ein lipophiles Leucin (L) ausgetauscht ist. Das Phenylalanin an Position 137 ist in Cx31 und vergleichbaren Positionen in verschiedenen Connexinen unterschiedlicher Spezies hoch konserviert (siehe Abb. 7). Die Patienten, die Träger einer F137L Mutation sind, haben im Vergleich zu Patienten mit anderen Mutationen recht stark ausgeprägte Symptome der EKV (Dr. Gabriele Richard, persönliche Mitteilung).

	125		137		150
mCx30.3	G G L W W T Y L L S L I	F	K A A V D S G F L Y I F H C I Y K D Y		
hCx30.3	G G L W W T Y L L S L I	F	K A A V D A G F L Y I F H R L Y K D Y		
mCx31	G G L W W T Y L F S L I	F	K L I I E L V F L Y V L H T L W H G F		
hCx31	G G L W W T Y L F S L I	F	K L I I E F L F L Y L L H T L W H G F		
mCx31.1	G G L W W T Y V F S L S	F	K A T I D I I F L Y L F H A F Y P R Y		
hCx31.1	G G L W W T Y V C S L V	F	K A S V D I A F L Y V F H S F Y P K Y		
hCx26	G S L W W T Y T S S I	F	F R V I F E A A F M Y V F Y V M Y D G F		
hCx30	G S L W W T Y T S S I	F	F R I I F E A A F M Y V F Y F L Y N G Y		
hCx32	G T L W W T Y V I S V	V	F R L L F E A V F M Y V F Y L L Y P G Y		

**Abbildung 7:**

Sequenzvergleiche der Aminosäuresequenz an Position 137 in Cx31, Cx30.3 und Cx31.1 und anderen Connexinen, bei denen die Aminosäure Phenylalanin dort konserviert ist.

### 1.7 Erzeugung transgener Mäuse

Zur *in vivo* Analyse von Säugetiergenen werden häufig Mausmutanten genutzt. Die genaue Funktionsanalyse eines Gens ist an transgenen Tieren möglich, die mittels Injektion gezielt veränderter embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) in Blastozysten erzeugt werden (Übersicht in: Nagy et al., 2003). ES-Zelllinien werden aus der Inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981) und behalten unter entsprechender Behandlung ihre Totipotenz (Williams et al., 1988; Hilton et al., 1991) *in vitro* bei. Transgene Mäuse lassen sich auch nach längere Kultur von ES-Zellen erzeugen (Fedorov et al., 1997)

#### 1.7.1 Einfacher Genersatz

Bei dieser Methode erfolgt zunächst *in vitro* der gezielte Austausch eines Gens ("Gene Targeting") durch homologe Rekombination mit einem Zielgenvektor in ES-Zellen (Hooper et al., 1987; Capecchi, 1989; Deng et al., 1993). Durch ein doppeltes

## Einleitung

Überkreuzen („Crossing over“) der flankierenden Bereiche mit den endogenen Homologiebereichen kann die Zielgenesequenz durch die transgenen Sequenzen chromosomal ersetzt werden. Auf Grund der geringen Rekombinationsfrequenz (ein Ereignis in ca. 5 Millionen Fällen) werden homolog rekombinierte ES-Zellen durch Selektion auf eingebrachte Selektionsgene angereichert. Die Effizienz der homologen Rekombination kann durch die Verwendung isogener (aus demselben Mausstamm stammend) Homologiesequenzen gesteigert werden (Riele et al., 1992). In der ursprünglichen Anwendung dieser Methode wird die kodierende Region eines Gens durch das Einbringen des Selektionsgenes soweit zerstört, dass es zu keiner funktionellen Genexpression mehr kommt („Knock out“). Es ist jedoch ebenfalls möglich das Zielgen gegen eine mutierte oder anderweitig veränderte kodierende Form auszutauschen („knock in“).

### 1.7.2 Konditionale Geninaktivierung

Im Falle von Cx43 (Reaume et al., 1995) und Cx45 (Krüger et al., 2000) führt die generelle Geninaktivierung zu embryonaler oder postnataler Letalität. Mit Hilfe konditionaler Geninaktivierung in Mäuse ist es möglich, die funktionelle Bedeutung von Zielgenen in adulten Tieren oder einzelnen Zelltypen zu untersuchen. Dazu stehen zwei Systeme zur Verfügung: Cre-loxP und Flp-frt (Kühn und Schwenk, 1997; Lewandoski, 2001), die beide auf Rekombinasen (Cre bzw. Flp) beruhen, die zwei 34 bp lange DNA-Sequenzen (loxP- bzw. frt-Sequenzen), die das Zielgen flankieren, erkennen und binden können. Die Erkennungssequenzen loxP (engl.: „locus of X-crossing over of P1“) bzw. frt (engl.: „flp-recombinase recombination target“) bestehen aus zwei 13 bp langen invertierten Sequenzwiederholungen, die eine 8 bp lange Kernsequenz umgeben. Die Cre bzw. Flp vermittelte Rekombination resultiert in der Deletion der markierten DNA-Sequenz, sofern die Orientierung der Erkennungsstellen gleich ist. Eine Inversion des markierten Bereichs tritt bei gegenläufig orientierten loxP-, bzw. frt-Sequenzen auf. Befinden sich die loxP-Sequenzen auf unterschiedlichen DNA-Strängen, kann eine Translokation erfolgen (Übersicht in: Nagy, 2000; Tronche et al., 2002). Eine Zielgenesequenz wird dann als „gefloxt“ bzw. „geflixt“ bezeichnet, wenn sie durch zwei Erkennungssequenzen eingerahmt wird und durch die Aktivität der jeweiligen Rekombinase genomisch deletiert werden kann. Die Cre-Rekombinase (engl.: „causes recombination“) stammt aus dem Bakteriophagen P1 (Hoess und Abremski, 1984; Hamilton und Abremski,

## Einleitung

1984; Sauer, 1987), während die Flp-Rekombinase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert wurde (Buchholz et al., 1998). Sowohl die Flp-, als auch die Cre-Rekombinase sind als Dimere aktiv und benötigen keine Hilfsproteine (Lewandoski, 2001).

### **1.7.3 Zelltypspezifische Ausschaltung von Zielgenen**

Die Regulation der ortsspezifischen Rekombination erfolgt nicht nur durch die Positionierung der loxP- bzw. frt-Stellen, sondern vor allem durch die Regulation der Cre- bzw. Flp-Aktivität. Um eine regulierte Aktivität der Rekombinasen zu erreichen, werden Promotorkonstrukte, die die zelltypspezifische Expression der Rekombinase kontrollieren, eingesetzt. Dabei kann die kodierende Region der jeweiligen Rekombinase über Vorkerninjektion oder, um mögliche Positionseffekte bei der Genintegration an zufälliger Stelle im Genom zu minimieren, durch homologe Rekombination in das Genom eingebracht werden (z.B. SMCreERT2, (Kühbandner et al., 2000). Mittlerweile sind für sehr viele Zelltypen spezifische Cre-Mäuse erzeugt worden (Übersicht: <http://www.mshri.on.ca/nagy/Cre.html>).

### 1.8 Ziele der Arbeit

Das Gap Junction-Protein Connexin31 kommt in der Epidermis des Menschen und der Maus in den suprabasalen Schichten vor. Im Menschen wurde nachgewiesen, dass Mutationen im Connexin31 Gen für die Ausprägung der Erbkrankheit *Erythrokeratoderma variabilis* (EKV) verantwortlich sind. In dieser Arbeit sollte ein konditionales Mausmodell für die humane Erbkrankheit *Erythrokeratoderma variabilis* erzeugt werden.

Durch Plum et al. (2002) wurde nachgewiesen, dass eine Deletion des Cx31 Gens in der Maus nicht zu einem Hautphänotyp führt, d.h. es wurden keine Hautveränderungen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen festgestellt. Ein Ausschalten, teilweise hautspezifisch, von jeweils Cx30, Cx43, Cx30.3 und Cx31.1 in Mäusen (Willecke et al., 2002; eigene Ergebnisse in Kooperation mit Dr. Zheng-Fischhöfer) führte ebenso nicht zu einem Hautphänotyp, obwohl Mutationen in diesen Genen die Ursache für Hauterkrankungen beim Menschen sind. Die Deletion des Cx31 in Mäusen führt, aufgrund eines Plazenta-Defektes, zu einer geringeren Geburtswahrscheinlichkeit homozygoter Cx31KO Mäuse (Plum et al., 2002).

Um einen potentiell embryonal letalen Effekt der Mutation zu vermeiden, wurde ein konditionaler „Knock-in“-Ansatz gewählt, da von Richard et al. (2002) ein transdominant negativer Effekt der Mutation Cx31F137L postuliert wurde. Dieser Ansatz ermöglicht eine gewebespezifische Deletion des Wildtyp Cx31 verbunden mit einer gleichzeitigen Aktivierung der Cx31F137L Variante. Es sollte im ersten Schritt ein konditionaler Mausvektor hergestellt werden, der eine homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus ermöglicht. Dieser Vektor sollte in die embryonalen Stammzellen transfiziert werden, um dann diese ES-Zellen in Blastozysten zu injizieren und damit letztlich transgene Mäuse zu erzeugen. Im Mausmodell sollte untersucht werden, ob durch die Mutation im Cx31 Gen Veränderungen in der Epidermis hervorgerufen werden, die mit der humanen Erkrankung EKV in Zusammenhang gebracht werden können.

Es sollten makroskopische Effekte, aber auch die Verteilung und Expressionsstärke der Connexine in der Epidermis erfasst werden. Diese Untersuchungen sollten an heterozygoten Tieren durchgeführt werden, da Patienten mit F137L EKV ebenfalls ein Wildtyp Allel und ein mutiertes Allel für Cx31 oder Cx30.3 tragen.

## Einleitung

Weiterhin sollten die Eigenschaften der Cx31F137L Mutation in Zellkultur und die Kanaleigenschaften in HeLa Zellen sowie die Auswirkungen der Mutation hinsichtlich der Interaktionen mit anderen Connexinen und der Ausbildung heterotypischer oder heteromerer Kanäle untersucht werden.

## Material

### 2. Material

#### 2.1 Chemikalien

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

#### 2.2 Allgemeine Lösungen

PBS <sup>-</sup>	137 mM	8,00 g	NaCl (Merck #1.06404)
	2,7 mM	0,20 g	KCl (Merck #1.04936)
	8,1 mM	1,44 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O (Merck #1.06576)
	1,5 mM	0,20 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck #1.04873)
	ad 1 l mit ddH <sub>2</sub> O, pH 7,2		

##### 2.2.1 Lösungen für die Nukleinsäure-Analytik

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und bei RT gelagert. Lösungen, welche man für Arbeiten mit RNS benötigte, wurden durch Zugabe von 2 % (v/v) Dimethylpyrocarbonat (DMPC) (Sigma #D-5520), anschließendem Rühren ÜN bei RT und abschließendem einstündigen Autoklavieren von RNasen befreit.

TE-Puffer	10 mM	121,0 mg	Tris (ICN #819623)
	1 mM	37,2 mg	EDTA (Sigma #E-5134)
	ad 100 ml, pH 8,0, 1 h autoklavieren		
Partialverdau-Stop-Lsg.	10 mM	37,2 mg	EDTA (Sigma #E-5134)
ad 10 ml, pH 8,0			
TBE (10x)	900 mM	109,00 g	Tris (ICN #819623)
	900 mM	55,60 g	Borsäure (Merck #1.00165)
	25 mM	0,93 g	EDTA (Sigma #E-5134)
	ad 1 l, pH 8,3		
DNS-Ladepuffer (6x)	0,25 %	125 mg	Bromphenolblau (Serva #15375)
	0,25 %	125 mg	Xylenzanol (Sigma #X-2751)
	30 %	15 ml	Glyzerin (Sigma #G-7757)
	ad 50 ml		
Natriumacetat	3 M	24,6 g	Natriumacetat (Merck #1.06268)
ad 100 ml, pH 4,8, 1 h autoklavieren			
RNase 2000	0,2 %	20 mg	RNase A (Roche #109142)
	2000 U/ml	20.000 U	RNase T1 (Roche #109193)

## Material

			ad 10 ml mit ddH <sub>2</sub> O; Aliquots à 1 ml bei –20°C lagern
Alkali-Lsg. 1	50 mM	4,5 g	D(+)-Glucose (Merck #1.08337)
	25 mM	1,51 g	Tris (ICN #819623)
	10 mM	1,86 g	EDTA (Sigma #E-5134)
			ad 500 ml; vor Gebrauch Zugabe von 3 µl/ml RNase 2000
Alkali-Lsg. 2	0,2 M	4 g	NaOH (J.T. Baker #0402)
	1 %	50 ml	SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
			ad 500 ml
Alkali-Lsg. 3	3 M	147,3 g	Kaliumacetat (Merck #1.04820)
	5 M	57,5 ml	Essigsäure (Merck #1.00062)
			ad 500 ml
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml	1 g	Proteinase K (Roche #1092766)
			ad 50 ml; Aliquots à 1 ml bei –20°C lagern
ES-Lysis-Puffer	50 mM	0,3 g	NaCl (Merck #1.06404)
	20 mM	0,24 g	Tris (ICN #819623)
	100 mM	3,72 g	EDTA (Sigma #E-5134)
	0,5 %	500 µl	SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
	2 mM	29 mg	CaCl <sub>2</sub> (Merck #1.02382)
			ad 100 ml, pH 8,0, sterilfiltrieren; vor Gebrauch Zugabe von 50 µl Proteinase K-Lösung und 100 µl RNase 2000 pro ml
Laird-Puffer	0,1 M	12,1 g	Tris (ICN #819623)
	5 mM	1,86 g	EDTA (Sigma #E-5134)
	0,2 M	11,69 g	NaCl (Merck #1.06404)
	0,2 %	20 ml	SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
			ad 1 l; zur Schwanzspitzenlyse in 400 µl frische Zugabe von 3 µl Proteinase K-Lösung
Lysis-Puffer	0,2 M	2,42 g	Tris (ICN #819623)
	0,1 M	3,72 g	EDTA (Sigma #E-5134)
	1 %	10 ml	SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
			ad 100 ml, pH 8,0; vor Gebrauch je ml Zugabe von 10 µl Proteinase K-Lösung
NaCl-Lösung	3 M	17,5 g	NaCl (Merck #1.06404)
			ad 100 ml
Depurinierungs-Lsg.	0,25 M	29 ml	Salzsäure, 32 % (Merck #1.00319)
			ad 1 l
Denaturierungs-Lsg.	1,5 M	175,3 g	NaCl (Merck #1.06404)
	0,5 M	40 g	NaOH (J.T. Baker #0402)
			ad 2 l
20x SSC	3 M	175,3 g	NaCl (Merck #1.06404)
	0,3 M	107,15 g	Trinatriumcitrat ·5,5H <sub>2</sub> O (Merck #1.06431)
			ad 1 l, pH 7,0

## Material

Sephadex G50 zu 30 g Sephadex G50 (Pharmacia #17-0573-02) werden 300 ml TE-Puffer gegeben, ÜN bei RT quellen gelassen und schließlich der überschüssige TE-Puffer durch frischen ersetzt (1:1); 1 h autoklavieren

### 2.2.2 Lösungen für die Bakterienkultur

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

LB-Agar  
1 l LB-Medium  
1,5 % 15 g Dunkel-Agar (Difco #0138-17-6)  
20 min autoklavieren; ggf. Zugabe von Antibiotika bei 55°C

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

Tetrazyklin-Stammlsg. 2,5 % 1,25 g Tetrazyklin (Sigma #T-3258)  
ad 50 ml mit Ethanol; Aliquots bei -20°C lagern;  
Endkonzentration in Selektionsmedien 12,5 µg/ml

TFB I  
30 mM 295 mg Kaliumacetat (Merck #1.04820)  
50 mM 809 mg MnCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Merck #1.05934)  
100 mM 1,47 g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Merck #1.02382)  
100 mM 1,21 g RbCl (Roth #4471.1)  
15 % 15 ml Glyzerin (Sigma #G-7757)  
ad 100 ml mit ddH<sub>2</sub>O, pH 5,8; Lagerung bei 4°C

TFB II  
10 mM 209 mg Na-MOPS (Sigma #M-9381)  
75 mM 1,1 g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Merck #1.02382)  
10 mM 121 mg RbCl (Roth #4471.1)  
15 % 15 ml Glyzerin (Sigma #G-7757)  
ad 100 ml mit ddH<sub>2</sub>O, pH 7,0; Lagerung bei 4°C

### 2.2.3 Lösungen für die Zellkultur und Blastozysten-Injektion

β-ME-Stock 0,7 % 0,3 ml 2-Mercaptoethanol (Sigma #M-7522)  
ad 42,6 ml mit ZK-Wasser (Sigma #W3500), steril-  
filtrieren, Aliquots à 1,2 ml bei -20°C ca. 1 Jahr lagerbar

1% Gelatine-Stock 5 g Gelatine (Sigma #G-6144)  
Zugabe von 500 ml ZK-Wasser (Sigma #W3500), 1 h auto-  
klavieren, die Lösung mischen und nochmals 1 h autoklavieren;  
Lösung ist bei 4°C ca. ein Jahr lagerbar. Zur Herstellung der  
0,1 %igen Arbeitslösung wird eine Verdünnung in ZK-Wasser  
(Sigma #W3500) hergestellt.

ES-EDTA-Lösung 5 mM 0,925 g EDTA (Sigma #E-5134)  
zu 500 ml ES-PBS<sup>-</sup> (Sigma #D8537), pH 7-8 durch  
Zugabe von 200 µl 10 N NaOH, 1 h autoklavieren

## Material

ES-Trypsin		400 ml	ES-PBS <sup>-</sup> (Sigma #D8537)
	1 mM	100 ml	ES-EDTA-Lösung
	1 %	5 ml	Chicken Serum (Gibco BRL #16110-003)
	0,025 %	5 ml	Trypsin, 2,5 % (Gibco BRL #25090-028)
ES-WT-Medium		500 ml	Glasgow-MEM (Biochrom AG #F 0525)
	5 %	28 ml	FCS, ES-Zellkultur-getestet (Sigma #F-2442)
	5 %	28 ml	NCS, ES-Zellkultur-getestet (Sigma #N-4637)
	1 mM	5,4 ml	Na-Pyruvat, 100 mM (Sigma #S8636)
	1 x	5,4 ml	Pen/Strep, 100x (Sigma #P0781)
	2 mM	5,4 ml	Glutamin, 200 mM (Sigma #G7513)
	1 x	5,4 ml	Aminosäuren, 100x (Sigma #M7145)
	0,1 %	550 µl	LIF (Güldenagel, Doktorarbeit 2001)
	0,007 %	550 µl	β-ME-Stock
			Aliquots à 50 ml bei -20°C lagern
			Aliquotierte Zutaten unter einer Sterilbank zugeben;
			Lagerung bei 4°C ca. 4 Wochen; vor Gebrauch erwärmen
HBS-Puffer		100 ml	ES-PBS <sup>-</sup> (Sigma #D8537)
	20 mM	2 ml	HEPES, 1 M (Gibco BRL #15630-056)
	2,5 M	240 µl	Glucose, 100x (Gibco BRL #19004-019)
			Aliquots à 10 ml bei -20°C lagerbar
ES-Einfriermedium		17,5 ml	ES-WT-Medium
	20 %	2,5 ml	FCS, ES-Zellkultur-getestet (Sigma #F-2442)
	20 %	5 ml	Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck #1.16743)
			Aliquot bei -20°C ca. 1 Jahr lagerbar
G418-Stock		50 mg/ml aktiv	G418 Sulfat (PAA #P27-011)
	100 mM		PIPES (Sigma #P-3768)
			lösen von 10 g G418 und ausgerechneter Menge
			PIPES, so dass eine Lösung entsteht mit 100 mM
			PIPES und <i>aktivem</i> G418 von 50 mg/ml, sterilfiltrieren;
			Aliquots à 10 ml bei -20°C lagern
ES-Selektionsmedium		579 ml	ES-WT-Medium
	350 µg/ml	4 ml	G418-Stock
			Lagerung bei 4°C ca. 4 Wochen; vor Gebrauch erwärmen
isotonische KCl-Lsg.	0,56 %	0,56 g	Kaliumchlorid (Merck #1.04936)
			ad 100 ml mit ZK-Wasser, Lagerung bei 4°C
Puromyzin-Stock	0,05 %	100 mg	Puromyzin (Sigma #P-8833)
			lösen in 200 ml ZK-Wasser, sterilfiltrieren; Aliquots à
			1 ml bei -20°C lagern
ES-Puro-Medium		579 ml	ES-WT-Medium
	1,2 µg/ml	1,25 ml	Puromyzin-Stock
			Lagerung bei 4°C ca. 4 Wochen; vor Gebrauch erwärmen

## Material

HeLa-D10-Medium	500 ml	DMEM (Sigma #D6046)
10 %	55 ml	HeLa-FCS (Biochrom #S0115)
1 x	5 ml	Pen/Strep, 100x (Sigma #P0781)
		Zutaten unter einer Sterilbank zugeben; Lagerung bei 4°C ca. 4 Wochen; vor Gebrauch erwärmen
Puck'sches Salin	137 mM	8 g NaCl (Merck #1.06404)
	5,4 mM	0,4 g KCl (Merck #1.04936)
	5,5 mM	1 g D(+)-Glucose (Merck #1.08337)
	4,2 mM	0,35 g NaHCO <sub>3</sub> (Merck #1.06329)
		ad 1 l, sterilfiltrieren; bei -20°C lagern
HeLa-Trypsin	0,04 %	20 mg Trypsin (Sigma #T-4799)
	0,5 mM	10 mg EDTA-Natriumsalz (Serva #11280)
		ad 50 ml mit Puck'scher Saline, pH 7,5, sterilfiltrieren; Langzeitlagerung bei -20°C, sonst bei 4°C
2-fach BBS	50 mM	533 mg BES (Sigma #B-6266)
	280 mM	800 mg NaCl (Merck #1.06404)
	1,5 mM	28 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O (Merck #1.06576)
		ad 50 ml, pH 6,95, sterilfiltrieren; Aliquots à 1 ml bei -20°C etwa 3 Monate haltbar
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	250 mM	1,84 g CaCl <sub>2</sub> (Merck #1.02382)
		ad 50 ml, sterilfiltrieren; Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern
KM (Kulturmedium)	40 ml	DMEM (Gibco BRL #41965-039)
10 %	4,4 ml	FCS, ES-Zellkultur-getestet (Sigma #F-2442)
1 mM	440 µl	Na-Pyruvat, 100 mM (Gibco BRL #11360-039)
1 x	440 µl	Pen/Strep, 100x (Sigma #P0781)
2 mM	440 µl	Glutamin, 200 mM (Sigma #G7513)
		Drei Aliquots (für eine Woche BCI) à 1,9 ml bei 4°C eine Woche lagerbar; der Rest wird zur Herstellung von TM benötigt
TM (Transfermedium)	40 ml	KM (Kulturmedium)
33 mM	1,32 ml	HEPES, 1 M (Gibco BRL #15630-056)
		Auf Aliquots aufgeteiltes Medium (für eine Woche BCI) bei -20°C eine Woche lagerbar
IM (Injektionsmedium)	5 ml	TM (Transfermedium)
200 U/ml	100 µl	DNase, 10.000 U (Roche #776-785)
		Sterilfiltrieren, Aliquots à 100 µl in Einfrierampullen bei -20°C ca. 6 Monate haltbar
isotonische NaCl-Lsg.	0,9 %	4,5 g NaCl (Merck #1.06404)
		ad 500 ml, 1 h autoklavieren, bei 4°C lagern
FSH-Lösung	50 U/ml	5000 U Pregnant Mare Serum (Calbiochem #367222)
		ad 100 ml mit isotonischer NaCl-Lösung, sterilfiltrieren; Aliquots à 1 ml bei -20°C ca. 1 Jahr haltbar
hCG-Stock	500U/C	5000 U Predalon (Organon #P 770-3, rezeptpflichtig)
	ap	

## Material

ad 1 ml mit isotonischer NaCl-Lösung, Aliquots à 100 µl lyophilisieren, Pulver bei -70°C ca. 1 Jahr haltbar

hCG-Lösung	50 U/ml	1 Cap hCG-Stock	ad 10 ml mit isotonischer NaCl-Lösung, sterilfiltrieren; Aliquots à 1 ml bei -20°C maximal 1 Monat haltbar
Rompun-Ketamin (Narkotikum)	0,2 % 0,5 %	4,25 ml isotonische NaCl-Lösung 0,5 ml Rompun, 2 % (Bayer AG #R1061) 0,25 ml Ketavet, 100 mg/ml (Pharmacia & Upjohn #89984)	Lösung mischen, Aliquots bei 4°C mind. 1 Woche haltbar; zur Narkose werden 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal gespritzt

### 2.2.4 Lösungen für Nachweisreaktionen

4% PFA	4 %	20 g Paraformaldehyd (Sigma #P-6148)	Zugabe von 430 ml ddH <sub>2</sub> O, erhitzen auf 60°C, Zugabe von 1-2 Tropfen 1 N NaOH bis die Lösung klar wird, nach Abkühlen Zugabe von 50 ml 10x PBS <sup>-</sup> , pH 7,2 einstellen, ad 500 ml mit ddH <sub>2</sub> O, sterilfiltrieren, Aliquots bei -20°C ca. 1 Jahr lagerbar
Perfusions-Lösung		0,1 g Natrium Nitroprusside (Sigma #S-0501)	ad 100 ml mit PBS <sup>-</sup> ; Lösung immer frisch ansetzen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung	0,5 M	44,5 g Dinatriumhydrogenphosphat (Merck #1.06580)	ad 500 ml (sollte pH ~ 9 sein)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung	0,5 M	34,5 g Natriumdihydrogenphosphat (Merck #6346)	ad 500 ml (sollte pH ~ 4,7 sein)
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	50 mM	2,03 g Magnesiumchlorid (Merck #5833)	ad 200 ml
EGTA-Lösung	100 mM	7,6 g EGTA (Sigma #E-3889)	Zugabe von 170 ml ddH <sub>2</sub> O, Zugabe von 1-2 Tropfen 10 N NaOH bis Lsg. klar wird, pH 8,0, ad 200 ml
Deoxycholat-Lösung	10 %	10 g Natriumdeoxycholat (ICN #102906)	ad 100 ml
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]-Lösung	0,5 M	8,23 g Kaliumhexacyanoferrat(III) (Merck #1115305)	ad 50 ml, dunkel bei 4°C lagern
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]-Lösung	0,5 M	10,56 g Kaliumhexacyanoferrat(II) (Merck #4982)	ad 50 ml, dunkel bei 4°C lagern
X-Gal-Lösung	4 %	2 g X-Gal (Roth #2315.3)	ad 50 ml mit N,N'-Dimethylformamid (Merck #1.03053), lichtgeschützt bei -20°C lagern

## Material

LacZ-Basislösung	100 mM 1,25 mM 2 mM	170 ml ~ 30 ml 25 ml 20 ml	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung, 0,5 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung, 0,5 M MgCl <sub>2</sub> -Lösung, 50 mM EGTA-Lösung, 100 mM	nur Phosphatpuffer mit pH 7,4, anschließend Zugabe der anderen Lösungen, schließlich ad 1 l
LacZ-Fixierlösung	0,2 %	400 µl	Glutaraldehyd, 30 % (Sigma #G-6257)	ad 50 ml mit LacZ-Basislösung; Lösung immer frisch ansetzen
LacZ-Waschlösung	0,01 % 0,2 %	1 ml 2 ml	Deoxycholat-Lösung, 10 % Nonidet P40 (Roche #1754599)	ad 1 l mit LacZ-Basislösung
LacZ-Färbelösung	5 mM 5 mM 80 mg/ml	5 ml 5 ml 10 ml	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]-Lösung, 0,5 M K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]-Lösung, 0,5 M X-Gal-Lösung, 4 %	ad 500 ml mit LacZ-Waschlösung; Lösung ohne X-Gal lagerbar bei RT, nach Zugabe von X-Gal dunkel und bei 4°C lagern; Lösung sterilfiltriert mehrfach verwendbar
Hoechst-Lösung	0,05 %	25 mg	Hoechst 33258 (Sigma #B-2883)	ad 50 ml, Aliquots à 1 ml bei -20°C lagerbar
Propidiumjodid-Lösung	10 mg/ml	10 mg	Propidium Iodide (Sigma #P-4170)	ad 1 ml mit PBS <sup>-</sup> , Aliquots bei 4°C dunkel lagern
Eosin-Färbelösung	0,1 %	0,5 g	Eosin Y (Sigma #E4382)	ad 500 ml, filtriert mehrfach verwendbar
Fixierlösung	0,2 %	400 µl	Glutaraldehyd, 30 % (Sigma #G-6257)	ad 50 ml mit PBS <sup>-</sup> ; Lösung immer frisch ansetzen
Kryoschutz-Lösung	30 %	15 g	Sucrose (Sigma #S-9378)	ad 50 ml mit PBS <sup>-</sup>
endogene PO-Lösung	10 % 0,01 %	45 ml 5 ml 150 µl	PBS <sup>-</sup> Methanol (Riedel-de-Haën #32213) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 % (Merck #1.08597)	Lösung immer frisch ansetzen
TBS-Puffer	10 mM 150 mM	0,6 g 4,38 g	Tris (ICN #819623) NaCl (Merck #1.06404)	ad 500 ml, pH 7,5
Diaminobenzidin-Lösung	0,06 %	1Tablette	Diaminobenzidin (Sigma #D-5905)	ad 15 ml mit TBS, sterilfiltrieren; Lagerung bei -20°C
DAB-Färbelösung	0,01 %	3 µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 % (Merck #1.08597)	ad 10 ml mit Diaminobenzidin-Lösung, immer frisch ansetzen

## Material

### 2.2.5 Lösungen für die Protein-Analytik

RIPA-Puffer	10 mM	1,5 ml	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung, 0,5 M
		~ 0,5 ml	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung, 0,5 M
	0,1 %	1 ml	SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
	40 mM	0,168 g	Natriumfluorid (Merck #1.06450)
	2 mM	74,4 mg	EDTA (Sigma #E-5134)
	1 %	1 ml	Triton X-100 (Serva #37240)
			Phosphatpuffer pH 7,2, ad 100 ml, 1 h autoklavieren; immer frisch zugeben
	0,1 %	1 ml	Deoxycholat-Lösung, 10 %
RIPA-Waschpuffer	10 mM	8 ml	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung, 0,5 M
		~ 2 ml	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung, 0,5 M
	1 M	29,22 g	NaCl (Merck #1.06404)
	40 mM	0,84 g	Natriumfluorid (Merck #1.06450)
	10 mM	1,86 g	EDTA (Sigma #E-5134)
	0,2 %	1 ml	Triton X-100 (Serva #37240)
			Phosphatpuffer pH 7,2, ad 500 ml, mit 10 N NaOH auf pH 7,0; 1 h autoklavieren
Complete (25x)		1Tablett	Complete (Roche #1697498)
		e	
			ad 2 ml, bei -20°C lagern
CL4B Sepharose	500 µl		Sepharose CL4B (Amersham #17-0120-01)
			Gel überschichten mit gleichem Volumen TBS-Puffer; bei 4°C etwa 6 Monate lagerbar
ProteinA Sepharose	150 mg		ProteinA Sepharose CL-4B (Amersham #17-0780-01)
			ad 500 µl mit TBS-Puffer, 2 h bei 4°C auf dem Sonnenrad quellen lassen, nach Zentrifugation (5 min, 4.000 Upm, 4°C) Überstand abnehmen und mit gleichem Volumen TBS-Puffer überschichten; bei 4°C etwa 6 Monate lagerbar
Sammelgelpuffer	0,5 M	30,25 g	Tris-Base (Sigma #T-1503)
	0,4 %	20 ml	SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
			ad 500 ml, (sollte pH 6,8 sein); sterilfiltrieren, bei 4°C lagern
Trenngelpuffer	1,5 M	91 g	Tris-Base (Sigma #T-1503)
	0,4 %	20 ml	SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
			ad 500 ml, (sollte pH 8,8 sein); sterilfiltrieren, bei 4°C lagern
APS	10 %	1 g	Ammoniumpersulfat (Sigma #A-3678)
			ad 10 ml; Lagerung bei -20°C max. 1 Jahr

## Material

1x Laemmli-Probenpuffer	62,5mM	0,757 g	Tris (ICN #819623)
	3 %	30 ml	SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
		oder 3 g	SDS (Sigma #L-4509)]
	10 %	10 ml	Glyzerin (Sigma #G-7757)
	0,01 %	10 mg	Bromphenolblau (Serva #15375)
	5 %	5 ml	2-Mercaptoethanol (Sigma #M-7154)
			ad 100 ml, pH 6,8; Lagerung bei RT ohne 2-Mercaptoethanol, nach Zugabe 3 Monate verwendbar
SDS-running buffer	0,25 M	15 g	Tris-Base (Sigma #T-1503)
	1,92 M	72 g	Glycin (Merck #1.04201)
	1 %	50 ml	SDS-Lösung, 10 % (Fluka #71736)
			ad 5 l, pH 8,3
Coomassie-Färbelösung	0,25 %	1,25 g	Coomassie Brilliant Blue R-250 (ICN #821616)
	10 %	50 ml	
	50 %	250 ml	Essigsäure (Merck #1.00062)
			Methanol (Riedel-de-Haën #32213)
			ad 500 ml, filtrieren durch Faltenfilter; bei RT lichtgeschützt lagern; Lösung kann mehrfach wiederverwendet werden
Coomassie-Entfärber	10 %	50 ml	Essigsäure (Merck #1.00062)
	30 %	150 ml	Methanol (Riedel-de-Haën #32213)
			ad 500 ml
5x Transferpuffer	50 mM	15,4 g	Tris-HCl (Sigma #T-3253)
	0,1 M	18,5 g	Tris-Base (Sigma #T-1503)
	0,8 M	144,2 g	Glycin (Merck #1.04201)
			ad 2 l, (sollte pH 8,3 sein)
1x Transferpuffer		200 ml	5x Transferpuffer
	20 %	200 ml	Methanol (Riedel-de-Haën #32213)
			ad 1 l
Waschblotbuffer	8,5 mM	2,68 g	Tris-HCl (Sigma #T-3253)
	1,7 mM	0,4 g	Tris-Base (Sigma #T-1503)
	50 mM	5,8 g	NaCl (Merck #1.06404)
	0,1 %	2 ml	Tween 20 (Merck #8.22184)
			ad 2 l
Western-Blockbuffer	5 %	1 g	Magermilchpulver (Sucofin)
			ad 20 ml mit Waschblotbuffer, Lösung immer frisch
IF-Blockpuffer	4 %	1 g	BSA, Fraktion V (PAA #K41-001-500)
	0,1 %	25 µl	Triton X-100 (Serva #37240)
			ad 25 ml mit PBS <sup>-</sup> ; Lösung immer frisch ansetzen

### 2.2.6 Gebrauchsfertige Lösungen

Acrylamid-Stammlösung Rotiphorese Gel 30 für SDS-PAGE-Gele (Roth #3029.1)

Benzyl Benzoate (Sigma #B-6630)

Benzylalkohol (Sigma #B1,620-8)

## Material

Chloroform (Merck #1.02445)

Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako #002627)

Demecolcine Solution (Colchizin) für ES-Zell Karyotypanalyse (Sigma #D-1925)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck #1.02950)

ES-PBS<sup>-</sup> (Dulbecco's Phosphate buffered saline) für ES-Zellkultur (Sigma #D8537)

Eisessig (Merck #1.00063)

Entellan (Merck #1.07961)

Ethanol (Serva #11093)

Ethidiumbromid, 1 % (Merck #1.11608)

Formaldehyd, 37% (Merck #1.04003)

Giemsa Färbelösung (Sigma #GS-500)

Isopropanol (Merck #1.09634)

Methanol (Riedel-de-Haën #32213)

Mineral Oil als PCR-Öl (Sigma #M-5904)

QuickHyb (Stratagene #201220)

Roti-Block (10x) (Roth #A151.1)

Roti-Phenol/Chloroform (Roth #A156.2)

TEMED (Sigma #T-9281)

Tissue-Tec (Sakura #4583)

TRIzol (Gibco BRL #15596-018)

## 2.3 Allgemeine Materialien

### 2.3.1 Reagenziensätze (Kits)

Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination (Sigma #BCA-1)

ECL+Plus (Amersham #RPN 2132)

Expand Long Template PCR-System (Roche #1681834)

GC-RICH PCR-System (Roche #2140306)

Jetstar 2.0 Plasmid MIDI Kit (Genomed #210050)

M.O.M.<sup>TM</sup> Immunodetection Kit, Peroxidase (Vector Laboratories #PK-2200)

Multiprime-DNA labelling system (Amersham #RPN 1601Z)

Perfectpret Gel Cleanup Kit (Eppendorf #0032007.759)

REDTaq<sup>TM</sup> ReadyMix<sup>TM</sup> PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub> (Sigma #R 2523)

Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen #12362)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen #28706)

Material

### 2.3.2 Allgemeine Labormaterialien

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

Agarose (Gibco BRL #15510-027)

Faltenfilter (Schleicher & Schuell)

Glaswolle, silikonisiert [durch Schwenken in Silikonisierer (Roth #6287.1) 1:60  
in ddH<sub>2</sub>O, 1 Woche abdampfen lassen und 10 min bei 120°C backen]

Hybond-ECL Nitrozellulose Membran (Amersham #RPN2020D)

Hybond-N- sowie Hybond-N<sup>+</sup>-Membran (Amersham #RPN203N sowie #RPN203B)

Objektträger Superior (Marienfeld #1000200)

SuperFrost Plus Objektträger (Menzel-Gläser #041300)

Röntgenfilme X-OMAT AR (Sigma #Z35,849-5)  
BIOMAX AR und BIOMAX MR (Kodak)

Sterilfilter 0,4 µm und 0,2 µm (Schleicher & Schuell)

Whatman 1,2 mm-Papier GB 002 (Schleicher & Schuell #10426693)

Whatman 3 mm-Papier GB 005 (Schleicher & Schuell #10426994)

### 2.3.3 Geräte

Axiophot; Mikroskop mit Epifluoreszenz (Zeiss)

Binokular MS5 (Leica)

Blotting Chamber Mighty-Small II [Western-Elektroblot] (Bio-Rad)

Elektrophoresekammer Mighty Small II SE250/SE260 [SDS-PAGE] (Hoefer)

Elektrophoresekammern Pharmacia GNA-100 und -200 [Nukleinsäuren] (Pharmacia)

ImageMaster VDS [zur Dokumentation von EtBr-Agarosegelen] (Pharmacia Biotech)

Inkubatoren für die eukaryotische Zellkultur mit CO<sub>2</sub>-Regelung (Heraeus)

Kryostat HM5000M (Microm)

Laser Scan Mikroskop (Zeiss)

Paraffin-Gewebeinfiltrationsautomat TP 1020 (Leica)

Paraffinausgießstation EG 1140H (Leica)

Paraffin-Schnitt-Transfersystem mit Rotationsmikrotom HM 360 (Leica)

PCR Maschine PTC-100 und PTC 200 Programmable Thermal Controller (BioZym)

Primus 96 plus Thermocycler (MWG Biotech AG)

## Material

Semidry Blotting Chamber (Bio-Rad)

Spektralphotometer DU 640 (Beckman)

Szintillationszähler LS 1801 (Beckman)

Ultraschallbad Transonic T460, ELMA und Ultraschallspitze Sonifer B-12 (Branson)

UV Stratalinker 2400 (Stratagene)

Vibratom VT1000S (Leica)

Zentrifugen: Biofuge A (Heraeus); Kühlzentrifugen 2-MK und ZK15 (Sigma);

Kühlzentrifuge Minifuge RF [15/50 ml Röhrchen] (Heraeus)

## Material

### 2.3.4 Plasmide

*Von hier aufgeführten Plasmiden sowie den Vektoren für alle Zwischenschritte befinden sich im Anhang Abbildungen der Vektorkarten.*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz/Firma</b>
pBluescript II SK(+) (pBSK)	Klonierungsvektor	Stratagene (#212205) Short et al., 1988
pCDNA3.1	Eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen
Gx1	Eukaryotischer Expressionsvektor, der einen großen Teil der 3'-Homologie von Connexin31 enthält	Plum et al., 2001
Gx2	Eukaryotischer Expressionsvektor, der die codierende Region von Connexin31 enthält, ebenso wie einen großen Teil der 5'-Homologie und einen Teil der 3'-Homologie	Plum et al., 2001
pBEHpac18	Eukaryotischer Expressionsvektor	Horst et al., 1991
pCre-Pac	Eukaryotischer Expressionsvektor, der für die Cre-Rekombinase und die Puromylin-N-Acetyltransferase (Pac) kodiert	Taniguchi et al., 1998
pBSK:p(A)	pBluescript mit einem einklonierten SV40 Polyadenylierungs-Signal	erhalten von Joachim Degen
lox-HPRT-lox del XbaI bei SpeI	Klonierungsvektor auf der Basis von pBluescript, der die HPRT Kasette mit flankierenden loxP Stellen enthält	erhalten von Joachim Degen
pBSK:frt-NEO-frt	Klonierungsvektor auf der Basis von pBluescript, der eine Neomycin-Resistenz-Kasette enthält, die von frt-Stellen flankiert ist	erhalten von Joachim Degen
pMJ-Green	Eukaryotischer Expressionsvektor; verbesserte Kombination aus den beiden Vektoren pBEHpac18 und pEGFP-N1	erhalten von Joachim Degen

## Material

### 2.3.5 Größenstandards

Bezeichnung	Fragmentgrößen
DNS 100 bp-Leiter (Gibco BRL #15628-019)	100, 200, 300, 400, 500, <b>600</b> , 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, <b>2.072</b> bp
DNS 1 kb-Leiter (Gibco BRL #15615-024)	134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1.018, <b>1.639</b> , 2.036, 3.054, 4.072, 5.090, 6.108, 7.126, 8.144, 9.162, 10.180, 11.198, 12.216 bp
$\lambda$ -DNS, <i>Hind</i> III (Roche #745782 gespalten mit <i>Hind</i> III)	Bei 200 ng Auftrag entspricht jede Bande einer Masse von (ng): 125 (0,5), 564 (2,3), 2.027 (8,4), 2.322 (9,58), 4.361 (18), 6.557 (27), 9.416 (38,8), 23.130 bp (95,37 ng)
RNS-Leiter (Gibco BRL #15620-016)	240, 1.350, 2.370, 4.400, 7.460, 9.490 bp
Protein-Leiter SeeBlue Plus2 (Invitrogen #LC5925)	4, 6, 16, 22, 36, 50, 64, 98, 148, 250 kDa

### 2.3.6 Bakterienstämme

Bezeichnung	Eigenschaften und Verwendung	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-blue MRF	Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, $\Delta$ (mcr)A183, $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR- mrr)173, supE44, relA1, lac[F'proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> 12,5 $\mu$ g/ml)]; Vermehrung von Plasmiden	Bullock et al., 1987
MM294-Cre (Cre- <i>E. coli</i> )	Genotyp: F <sup>-</sup> , $\lambda$ , supE44, endA1, thi-1, hsdR17, lacZ::cl857-Cre, Cre- Rekombinase exprimierende <i>E. coli</i> Bakterien; Herstellung und Vermehrung rekombinanter Plasmide	Buchholz et al., 1996
MM294-Flp (Flp- <i>E. coli</i> )	Flp-Rekombinase exprimierende <i>E.</i> <i>coli</i> Bakterien; Herstellung und Vermehrung rekombinanter Plasmide	Buchholz et al., 1996

Material

### 2.3.7 Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Eigenschaften und Verwendung	Referenz
HeLa (ATCC CCL 2)	Aneuploide, epitheloide Cervixkarzinom Linie aus menschlichem Gewebe als untransfizierte Wildtyp-Zellen (HeLa-WT)	Jones et al., 1971
HM1	Embryonale Stammzellen der Maus, gewonnen aus dem Mausstamm Sv129P2/OlaHsd	Magin et al., 1992
Cx31 F137L Klon 158	HM1-Ausgangszellen für BCI, heterozygot für mutiertes Cx31-Allel durch homologe Rekombination mit dem Austauschvektor „Cx31 F137L“	diese Arbeit

### 2.3.8 Startermoleküle (Oligonukleotid-Primer)

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

Primername	Sequenz
Eco_mCx31_F	G GAA TTC GGC ACC ATG GAC TGG AAG AAG CTC
mCx31F137LP2	GAT GAG CTT GAG GAT GAG GCT
mCx31F137LP3	AGC CTC ATC CTC AAG CTC ATC
Xba_mCx31_V5_R	TGC TCT AGA TCA CGT AGA ATC GAG ACC GAG GAG AGG GTT AGG GAT AGG CTT ACC AAT GGG GGT CAG GCT GGG CGC TGA
Xba_mCx31_His_R	TGC TCT AGA TCA ATG GTG ATG GTG ATG ATG AAT GGG GGT CAG GCT GGG CGC TGA
Xba_mCx31_R	TGC TCT AGA AAT GGG GGT CAG GCT GGG CGC TGA
For 3534 mCx31	CCA TCT ATA AAT TGG GAG GGG
Rev 5256 mCx31	ACA ATT GGC TAG CTT AGT GAA
Ktr. For.	GCC TGG GCT TCC AGC CTC AAT
Ktr. Rev.	TGA GTG CGA AGC TGG CCT AGT
Eco_mCx31_R	G GAA TTC AAT GGG GGT CAG GCT GGG CGC TGA
Mausprimer_For Genotyp_Cre_For	CTC AAA GCT AGT CTG AGA TGC
Mausprimer_Rev_1 Cx31_hom_Rev	TAG TTC TAG AGC GGC CAA TTC
Mausprimer_Rev_2 Genotyp_Cre_Rev	GCA TCA CAA GGC TCC TAA GAA
Cx31CR_For	GTT CCC TCA GGT GGG CAC AGC
Cx31CR_Rev	CGG CTT CAC CCC TTC TCT AGC
Cx31_hom_for3	CGA AGA TTC TTG CAG TAA TCC A
int_probe_5`_dig	CTG TTG CGA CAT CAA TGA GGA
ext_probe_dig_rev	CTT CCT TCA TCA ACA CCA AAC
Probe_int_for	CCA CGT GGT TGC TAG TAT TCG
Probe_int_rev	GAG AAT CTG ATA ATC AAA CGA C

Material

Probe_ext_for	GTT GTC TCT AGA TCT ATA ACC
Probe_ext_rev	GTG TTC TAG AAT GAA TGA AGA C

<b>Interne Sonde mit:</b>	
Probe_int_for	CCA CGT GGT TGC TAG TAT TCG
Probe_int_rev	GAG AAT CTG ATA ATC AAA CGA C

<b>externe Sonde mit:</b>	
Probe_ext_for	GTT GTC TCT AGA TCT ATA ACC
Probe_ext_rev	GTG TTC TAG AAT GAA TGA AGA C

<b>ES-Zell-PCR mit:</b>	
Cx31_hom_Rev	TAG TTC TAG AGC GGC CAA TTC
Cx31_hom_for3	CGA AGA TTC TTG CAG TAA TCC A

<b>Cx31-F137L-PCR:</b>	
Mausprimer_For Genotyp_Cre_For	CTC AAA GCT AGT CTG AGA TGC
Mausprimer_Rev_1 Cx31_hom_Rev	TAG TTC TAG AGC GGC CAA TTC
Mausprimer_Rev_2 Genotyp_Cre_Rev	GCA TCA CAA GGC TCC TAA GAA

<b>Neo-PCR:</b>	
Neo_For_neu	CGT ATA TCC TTG ACA TAT CCA
Neo_Rev_1	GAA GTT TTT CCT GTC ATA CTT
Neo_Rev_2	TTC GAG GTC GAC TCC ACC GCG

**2.3.9 Mauslinien**

<b>Stamm</b>	<b>Kurzbeschreibung</b>	<b>Referenz</b>
C57BL/6	Wildtyp-Mausstamm mit schwarzer Fellfarbe für Züchtungen und Rückkreuzungen; Weibchen als Blastozysten-Spendertiere für BCI	Charles River; eigene Zucht
NMRI	Wildtyp-Mausstamm, albino, Weibchen als Empfängertiere für BCI, vasektomierte Männchen zur Erzeugung von schein-schwangeren Leihmüttern (Foster)	Charles River; eigene Zucht
deleter-Flp	Transgene Mauslinie, welche die Flp-Rekombinase ubiquitär unter der Kontrolle des menschlichen $\beta$ -Aktin Promotors exprimiert	Rodríguez et al., 2000
PGK-Cre	Transgene Mauslinie, welche die Cre-Rekombinase ubiquitär unter der Kontrolle des PGK Promotors exprimiert	Lallemand et al., 1998
Cx31KO	Transgene Mauslinie, welche statt des Cx31 Gens ein LacZ-Reportergen trägt	Plum et al., 2002

**2.3.10 Antikörper**

Polyklonale Antikörper			
Antikörper	Verwendung	Spezifität	Referenz/Firma
$\alpha$ -Cx31	IP (2 $\mu$ l) WB (1:500) [IF (1:200)]	Kaninchen anti Connexin31 C-terminale Domäne, affinitätsgereinigt	Zytomed (#51-6300)
$\alpha$ -Cx30.3	IF (1:1000)	Kaninchen anti Maus Cx30.3, affinitätsgereinigt	erhalten von Jim Nagy, unpubliziert
$\alpha$ -Cx30	IF (1:500) WB (1:250)	Kaninchen anti Maus Cx30	Zymed (#71-2200)
$\alpha$ -Cx26	IF (1:1000) WB (1:8000)	Kaninchen anti Maus Cx26	Zymed (#51-2800)
$\alpha$ -Cx43	IF (1:1000) WB (1:2000)	Kaninchen anti Maus Cx43, affinitätsgereinigt	Christian Schlicker, Diplomarbeit
$\alpha$ -Kaninchen- HRP	WB (1:30.000)	Ziegen-IgG gegen F <sub>c</sub> - Kaninchen gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase	Dianova (#111-035-114)
$\alpha$ -Kaninchen- Alexa 594 (rot)	IF (1:2.000)	Ziegen-IgG (H+L) gegen F <sub>c</sub> -Kaninchen gekoppelt mit Alexa 594	MoBiTec (#A-11037)
$\alpha$ -Kaninchen- Alexa 488 (grün)	IF (1:2.000)	Ziegen-IgG (H+L) gegen F <sub>c</sub> -Kaninchen gekoppelt mit Alexa 488	MoBiTec (#A-11008)
Monoklonale Antikörper			
Antikörper	Verwendung	Spezifität	Referenz/Firma
$\alpha$ -NeuN	IHC (1:100)	gegen neuronal nuclei (NeuN)	Chemicon (#MAB 337)
M.O.M.-Kit	IHC (1:400)	Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent	Vector Lab (#M0315)
IF	= Immunfluoreszenz	IHC	= Immunhistochemie
IP	= Immunpräzipitation	IB	= Immunoblot

### **3 Methoden**

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

#### **3.1 Nukleinsäure Präparationen**

##### **3.1.1 Plasmid Präparationen aus Bakterien**

###### **3.1.1.1 Plasmid Mini Präparation**

Die Plasmid Mini Präparation ist eine Methode, um schnell Plasmid-DNS aus Bakterien zu isolieren. Eine Einzelkolonie wird über Nacht im Schüttelinkubator bei 250 bis 300 Upm in 2,5 ml antibiotikahaltigem LB-Medium inkubiert. Von der Bakteriensuspension werden 1,5 ml in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und die Bakterien durch Zentrifugation (10.000 Upm, 1 min) sedimentiert. Der Überstand wird dekantiert und das zurückbleibende Bakterienpellet in 100 µl Alkali-Lsg. 1 resuspendiert. Anschließend werden 200 µl Alkali-Lsg. 2 zugegeben und der Gesamtansatz durch Invertieren gemischt. Nach einer fünf minütigen Inkubation werden zu dem Ansatz 150 µl Alkali-Lsg. 3 gegeben und ebenfalls durch Invertieren gemischt. Die anschließende Zentrifugation (13.000 Upm, 6 min) dient der Sedimentation der Bakterienzelltrümmer und der daran anhaftenden genomischen DNS, so dass der Überstand ausschließlich Plasmid-DNS enthält. Der Überstand wird in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt, in welches zuvor 500 µl 70% EtOH vorgelegt wurde. Der Ansatz wird erneut gemischt und ein weiterer Zentrifugationsschritt (13.000 Upm, 10 min) sorgt für das Sedimentieren der Plasmid-DNS. Nach einem Waschschriff mit 70% EtOH und anschließender Zentrifugation kann nach Abnahme des Überstandes und kurzem Trocknen des Sediments die DNS in 100 µl TE-Puffer aufgenommen werden. Die isolierte DNS ist rein genug, um mit ihr analytische Reaktionsspaltungen, Klonierungen und Retransformationen durchführen zu können.

## Methoden

### **3.1.1.2 Plasmid Midi Präparation**

Diese Methode ermöglicht eine schnelle Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien. Es wird jedoch eine größere Menge DNS (50 bis 200 µg) als bei der Plasmid Mini Präparation isoliert. Dazu werden 50 ml Bakteriensuspension verwendet. Die Aufreinigung erfolgt entweder wie unter Plasmid Mini Präparation beschrieben unter Anpassung der Zentrifugationsgeschwindigkeiten (6.000 Upm) und Lösungsvolumina (Alkali-Lsg. 1: 1,66 ml; Alkali-Lsg. 2: 3,3 ml; Alkali-Lsg. 3: 2,5 ml; absolutes EtOH 7,5 ml) oder alternativ durch Einsatz des Jetstar 2.0 Plasmid MIDI Kit der Firma Genomed.

### **3.1.1.3 Endotoxin-freie Plasmid Maxi Präparation**

Zur Präparation großer Mengen an Plasmid-DNS (bis zu 500 µg) mit höchstem Reinheitsgrad ohne Verunreinigungen durch bakterielle Proteine oder RNS wird der EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Quiagen verwendet. Die Isolierung der zur Transfektion embryonaler Stammzellen benötigten Plasmide erfolgt nach Herstellerangaben unter Verwendung von Einmal-Kunststoffpipetten. Die isolierte und sedimentierte Plasmid-DNS wird unter sterilen Bedingungen in endotoxin-freiem TE-Puffer aufgenommen und weiterverwendet.

## **3.1.2 Isolierung genomischer DNS**

### **3.1.2.1 Isolierung genomischer DNS aus embryonalen Stammzellen**

Um ES-Zellen mit Hilfe der PCR schnell auf homologe Rekombination testen zu können, wird von einer mit HM1-Zellen konfluent bewachsenen 48-Loch-Kulturschalenvertiefung nach dem Trypsinieren die Hälfte der Zellsuspension in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min) sedimentiert. Die Zellen werden nach Absaugen des Überstandes durch Zugabe von 100 µl H<sub>2</sub>O mit 1 µl Proteinase K-Lösung und einer Inkubation von 30 min bei 55°C lysiert. Dieses Lysat wird vor dem Einsatz zur PCR kurz auf dem Strudelmischer gemischt.

Für eine Southern-Blot Analyse wird ein konfluent bewachsener T25-Kolben eingesetzt. Es erfolgen zwei Waschschrte mit PBS<sup>-</sup> und anschließend eine Inkubation mit ES-Lysispuffer für 1 h auf dem Schüttler. Anschließend wird das Lysat in ein 13 ml Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt und 2 Tage bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Es wird nach Abkühlen ein gleiches Volumen Isopropanol

## Methoden

zugegeben und durch Invertieren mit dem Lysat vermischt. Die DNS fällt dabei als Flocke aus. Sie kann mittels einer sterilen Pipettenspitze in ein anderes Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt werden in dem 5 ml 70% EtOH vorgelegt wurde. Die DNS-Flocke wird durch Abzentrifugieren (6.000 Upm, 5min) und erneuter Zugabe von 5 ml 70% EtOH gewaschen, bevor sie bei RT 15 min getrocknet und anschließend in 100 bis 400µl TE-Puffer aufgenommen wird. Zum vollständigen Lösen wird der Ansatz 1 h bei 55°C im Wasserbad inkubiert, bevor etwa 10 µl des Ansatzes zur Restriktionsspaltung und anschließender Southern-Blot Analyse eingesetzt werden.

### **3.1.2.2 Isolierung genomischer DNS aus Schwanzspitzen von Mäusen**

Für die Genotypisierung von Mäusen wird eine 0,5 bis 1 cm lange Schwanzbiopsie in 400 µl Laird-Puffer (Laird et al., 1991) mit 3 µl Proteinase K-Lösung bei 55°C ÜN lysiert. Haare und unlösliche Zellrückstände werden durch Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min) abgetrennt und der klare Überstand in ein neues, mit der Tiernummer beschriftetes Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und mehrmaligem Invertieren wird die DNS als Flocke sichtbar. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 Upm, 15 min) wird der Überstand entfernt. Die DNS wird durch Zugabe von 500 µl 70% EtOH und Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min) gewaschen. Der Überstand wird wiederum sorgfältig entfernt, die DNS 5 min bei RT getrocknet, anschließend in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und ÜN bei 55°C in Lösung gebracht. Für PCR-Analysen wird 1 µl DNS-Lösung eingesetzt.

## **3.2 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren**

### **3.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung**

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

Die Absorptionen von Nukleinsäurelösungen werden bei 260 nm und 280 nm gegen TE-Puffer als Referenz gemessen (Quarzküvetten). Eine Absorptionseinheit entspricht bei einem Strahlengang von 1 cm Länge einer Konzentration von 50 µg/ml (DNS) bzw. 40 µg/ml (RNS). Der Quotient A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der Lösung und sollte für DNS zwischen 1,8 und 2,0 bzw. für RNS

## Methoden

zwischen 1,9 und 2,2 liegen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung durch UV-absorbierende Stoffe (Proteine, Phenole) hin.

### **3.2.2 Konzentrationsabschätzung im Gel**

Der Vorteil dieser Methode liegt neben der Konzentrationsabschätzung auch in der Kontrolle der Qualität der Nukleinsäuren anhand des Bandenmusters. Außerdem können im Gel Nukleinsäurekonzentrationen dargestellt werden, welche für eine photometrische Bestimmung zu gering sind.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über einen Bandenintensitätsvergleich der Probe unbekannter Konzentration mit einer Probe bekannter Nukleinsäurekonzentration (200 ng  $\lambda$ -DNS, *Hind*III). Hierbei wird die zur Konzentration proportionale Leuchtintensität einer Bande in einem Ethidium-Bromid-Agarosegel mit derjenigen des Referenzstandards verglichen.

## **3.3 Herstellung rekombinanter Plasmide**

### **3.3.1 Gewinnung der gewünschten DNS-Fragmente**

#### **3.3.1.1 Partielle Spaltung von Plasmiden**

Soll Plasmid-DNS mit einem Enzym gespalten werden, dessen Erkennungssequenz mehrfach in dem Vektor vorhanden ist, so ist eine partielle Spaltung notwendig um das benötigte Fragment zu erhalten. Dazu werden etwa 20  $\mu$ g Plasmid-DNS mit bis zu 10 U Restriktionsenzym in einem 20  $\mu$ l Ansatz versehen und bei optimaler Temperatur inkubiert. Diese kann je nach verwendetem Enzym unterschiedlich sein. Nach 10 sec, 20 sec, 30 sec, 45 sec, 1 min, 90 sec, 2 min, 3 min, 5 min und 10 min werden jeweils 2  $\mu$ l des Ansatzes abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt, in dem 5  $\mu$ l Partialverdau-Stop-Lsg. und 3  $\mu$ l DNS-Ladepuffer vorgelegt sind, welches anschließend sofort in flüssigen Stickstoff überführt wird. Die Analyse der Partialsplattungen erfolgt über eine Agarosegelelektrophorese unter Berücksichtigung der Agarosekonzentration in Bezug auf die erwarteten DNS-Fragmentlängen.

#### **3.3.1.2 Elution von DNS-Fragmenten aus dem Gel**

DNS-Fragmente verschiedener Länge können nach einer Agarosegelelektrophorese aus den Agarosegelen isoliert werden. Das gewünschte DNS-Fragment wird mit einem Skalpell unter Verwendung einer Handlampe mit langwelligem UV-Licht (365

## Methoden

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

### **3.3.2 Modifikationen und Ligation von DNS-Molekülen**

#### **3.3.2.1 Auffüllen klebriger Enden (blunten)**

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

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

#### **3.3.2.2 Dephosphorylierung von Vektorrückgraten**

Die aus einer Restriktionsspaltung oder einer Auffüllreaktion erhaltenen DNS-Moleküle besitzen an ihren 5'-Enden Phosphatgruppen. Diese ermöglichen es dem Vektor, auch ohne Integration eines einzuklonierenden Fragmentes (Passagier-DNS) nach der Ligation vermehrungsfähige Plasmide zu erzeugen. Um eine Religation zu minimieren und den Anteil der Passagier-DNS tragenden Plasmide zu erhöhen, werden die freien 5'-Phosphatgruppen durch Dephosphorylierung mit einer alkalischen Phosphatase aus Krabben (SAP = shrimp alkaline phosphatase) entfernt. Dazu werden zu 30 µl geleluiertem DNS-Fragment 3 µl SAP-Puffer und 1 µl (1 U) SAP (Roche #1758250) gegeben und der Ansatz 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird nochmals 1 µl SAP zugefügt und der Ansatz wiederholt inkubiert (15 min, 37°C). Durch eine Inkubation von 20 min bei 65°C wird die Phosphatase hitzeinaktiviert. Die so dephosphorylierte DNS kann bei -20°C gelagert werden.

#### **3.3.2.3 Ligation von DNS-Fragmenten**

Mit Hilfe der T4-Ligase lassen sich intra- bzw. intermolekulare Verknüpfungen freier DNS-Enden durchführen, wodurch rekombinante Plasmide aus Vektor- und

## Methoden

Passagier-DNS entstehen können. Die Ligation kann zwischen kohäsiven oder glatten DNS-Enden erfolgen.

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

### 3.4 Transformation

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

#### 3.4.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Mit einer Einzelkolonie des erwünschten Bakterienstammes werden 2 ml LB-Medium ÜN bei 37°C und 250 Upm kultiviert. Am nächsten Tag werden 70 µl der stationären Kultur in 7 ml LB-Medium überführt und 2-3 h bei 37°C und 250 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 in eine exponentielle Wachstumsphase gebracht. Von dieser Vorkultur werden 5 ml zu 100 ml vorgewärmtem LB-Medium gegeben und so lange bei 37°C und 250 Upm kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 erreicht ist. Die Kultur wird anschließend in zwei 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und etwa 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend werden die Bakterien durch Zentrifugation (5 min, 5.000 Upm, 4°C) sedimentiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen werden vorsichtig auf Eis in je 10 ml eiskaltem Transformationspuffer TFB I resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) und Verwerfen des Überstandes werden die Zellen in je 2 ml sterilem, eiskaltem Transformationspuffer TFB II resuspendiert und in Aliquots zu jeweils 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so hergestellten kompetenten Bakterien können bei -70°C etwa ein Jahr gelagert werden.

#### 3.4.2 Transformation in XI-1 blue *E. coli* Bakterien

Ein Aliquot im Eisbad aufgetauter kompetenter Bakterien wird auf den Ligationsansatz gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz

## Methoden

1 min bei 42°C inkubiert und sofort 5 min auf Eis abgekühlt. Zu dem Ansatz werden 450 µl LB-Medium pipettiert und 1 h inkubiert (37°C, 250 Upm). Dies ermöglicht die Ausprägung des auf dem Plasmid kodierten Resistenzgens. Anschließend werden 100 µl und 900 µl der Bakteriensuspension auf zwei antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausplattiert und gewendet ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach können die Platten bei 4°C etwa 2 Monate gelagert werden.

### **3.4.3 Transformation in MM294-Flp und MM294-Cre *E. coli* Bakterien**

Die Besonderheit dieses Bakterienstammes liegt darin, dass die ortsspezifische Rekombinase Flp bzw. Cre stabil in das Bakteriengenom integriert wurde (Buchholz et al., 1996). Dies ermöglicht über die Transformation von Plasmiden einen Funktionalitätsnachweis der in den Vektor inserierten *frt*- bzw. *loxP*-Sequenzen durch die Deletion des flankierten DNS-Abschnittes. Die Transformation erfolgt wie oben beschrieben. Die Inkubation einer entsprechenden Flüssigbakterienkultur erfolgte wie für eine analytische Mini-Plasmid Präparation, jedoch abweichend bei 30°C statt 37°C.

## **3.5 Sequenzierung**

### **3.5.1 Auftragssequenzierungen**

DNS-Sequenzen wurden von den Firmen Agowa sequenziert. Zu diesem Zweck wurden die zu sequenzierenden Plasmid-DNS oder mittels PCR amplifizierte DNS, jeweils wie von der Firmen Agowa vorgegeben, präparativ isoliert. Als Startermoleküle für die Sequenzierung dienten entweder die Standardstartermoleküle wie z. B. T7 oder T3 oder sie wurden von der Firma Agowa aus vorgegebenen Sequenzen abgeleitet.

### **3.5.2 Sequenzanalyse**

Die Auswertung der ermittelten Sequenzen erfolgte durch das Sequenzanalyse-Programm „Heidelberg Unix Sequenz Analysis Resources“ (HUSAR), welches auf dem Genius-Rechner des deutschen Krebsforschungszentrums im Internet zur Verfügung steht (<http://genome.dkfz-heidelberg.de>). Weiterhin wurden Sequenzvergleiche und Promotoranalysen im Internet mit Hilfe der Datenbanken des „National Center for Biotechnology Information“ durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### **3.6 Zellkultur**

#### **3.6.1 Zellkultur embryonaler Stammzellen**

##### **3.6.1.1 Embryonale HM1 Stammzellen der Maus**

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

##### **3.6.1.2 Allgemeine Kulturbedingungen**

HM1 Zellen werden in ES-WT-Medium gehalten, welches täglich gewechselt wird. Bei geringer Zelldichte kann es auch, z. B. nach der Isolierung von Einzelklonen, sinnvoll sein das Medium erst nach zwei bis drei Tagen zu wechseln. Gesplittet werden HM1 Zellen durch Trypsinisierung bei einer Konfluenz von 80 bis 100%. Anschließend werden sie mit einer Verdünnung von 1:2 bis 1:5 wieder ausplattiert. Bei Kultur der Zellen in 48- oder 24-Loch-Kulturschalen werden die Zellen ohne Zentrifugation gesplittet, bei größeren Kulturvolumina werden sie nach dem Trypsinieren abzentrifugiert. Für eine Trypsinierung wird das verbrauchte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal in ES-PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend etwa 1/10 des Kulturvolumens an ES-Trypsin zugegeben. Danach werden die Zellen 5 min bei 37°C inkubiert, anschließend wird ES-WT-Medium zugegeben und die Zellen gründlich vereinzelt. Die sich in Suspension befindlichen Zellen werden in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und mittels einer Zentrifugation (5 min, 800 Upm, RT) pelletiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen in einer entsprechenden Menge ES-WT-Medium aufgenommen. Die ES-Zellen werden dann angemessen verdünnt auf gelatinisierte (Inkubation von 5 min mit 0,1%iger Gelatine Arbeitslösung) Kulturschalen ausplattiert. Die Volumina der Medien in den Kulturschalen werden auf die für das entsprechende Gefäß übliche Menge mit ES-WT-Medium aufgefüllt. Auf den Zellkulturgefäßen wird die nach jeder Trypsinierung um eins erhöhte Passagenzahl notiert.

### **3.6.1.3 Transfektion von HM1 Zellen mittels Elektroporation**

Als Transfektion wird die Aufnahme freier Plasmid-DNS durch eukaryotische Zellen bezeichnet. Bei der stabilen Transfektion wird auf das Ereignis der stabilen Integration der transfizierten DNS in das Genom der Ausgangszellen selektioniert. Die stabile Transfektion von HM1 ES-Zellen erfolgt mittels der Elektroporation von linearisiertem Plasmid. Dazu werden 200 bis 300 µg des Austauschvektors eingesetzt. Dieser wurde zuvor mittels des Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit aufgereinigt, durch Restriktionsspaltung linearisiert, durch Isopropanolzugabe gefällt, zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. HM1 ES-Zellen werden mit möglichst niedriger Passagenzahl unter Standardbedingungen kultiviert und bis zur Konfluenz eines T75-Kolbens herangezogen. Die ES-Zellen werden wie zur Passage trypsinisiert und die Zellkonzentration der Einzelzellsuspension in einer Neugebauer-Zählkammer bestimmt. Nach einer Zentrifugation (5 min, 800 Upm) und Abnehmen des Überstandes werden die Zellen in so viel HBS-Puffer aufgenommen, dass in 800 µl  $3 \times 10^7$  Zellen enthalten sind. 800 µl Zellsuspension werden mit 100 µl linearisiertem Austauschvektor vermischt und luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand überführt. Die eigentliche Elektroporation erfolgt durch Anlegen einer Spannung von 0,8 Kilovolt mit einer Kapazität von 3 Mikروفarad mittels des Biorad Gene Pulser (Biorad, München). Nach einer Inkubation von 10 min bei RT werden die Zellen vorsichtig in 20 ml ES-WT-Medium resuspendiert und auf mehrere gelatinisierte 10 cm-Zellkulturschalen mit 10 ml ES-WT-Medium unterschiedlicher Verdünnungen ausplattiert. Dabei variiert man die Zellmenge im Bereich von  $1,5 \times 10^6$  Zellen (1 ml) pro Schale.

### **3.6.1.4 Selektion auf stabile Integration und homologe Rekombination**

Man selektioniert auf die Anwesenheit des im Austauschvektor integrierten Selektionsmarkers Neomycin. Diese Selektion erfolgt indem man das ES-WT-Medium 24 h nach der Elektroporation durch ES-Selektionsmedium ersetzt. Dieses wird alle zwei Tage gegen frisches ES-Selektionsmedium ausgetauscht und damit auch die abgestorbenen Zellen entfernt. Kolonien resistenter Zellen lassen sich als Klone nach etwa fünf Tagen mikroskopisch erkennen, erreichen jedoch erst nach etwa zehn Tagen eine Größe, welche die Isolierung der einzelnen Zellklone ermöglicht. Dazu werden die Klone jeweils mit Hilfe einer Kolbenhubpipette und

## Methoden

gelben Spitzen unter dem Mikroskop von der Kulturschale abgeschabt, in 150  $\mu$ l Kulturmedium aufgesaugt und in eine Vertiefung einer gelatinisierten 48-Loch-Kulturschale überführt. Die Zellen werden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Abschließend erfolgt die Zugabe von ES-WT-Medium, das alle zwei Tage gewechselt wird, bis der Zellklon eine ausreichende Konfluenz besitzt, um auf eine größere Kulturfläche umgesetzt zu werden.

Bei einem ersten Trypsinierungsschritt der vereinzelt resistenten ES-Zellklone von der Ausgangs 48-Loch- auf eine frische 48-Loch-Kulturschale wird ein Drittel der Zellsuspension abgenommen, daraus die genomische DNS der Zellen isoliert und zur Genotypisierungs-PCR eingesetzt. Die Expansion der in der PCR als erfolgreich 5' homolog rekombiniert identifizierten Klone erfolgt schrittweise über eine 24-, 12- und 6-Loch-Kulturschale und schließlich über einen konfluent gewachsenen T25 Kolben zu einem T75 Kolben (2/3 der Zellen des T25 Kolbens) und zwei T25 Kolben (je 1/6 der Zellen). Die Zellen des T75 Kolbens werden jeweils gedrittelt (so ergibt sich eine ausreichende Menge für einen T25 Kolben) und für eine eventuelle spätere Blastozysten-Injektion eingefroren. Die Zellen der beiden T25 Kolben werden zur Gewinnung genomischer DNS für eine anschließende Southern-Blot Hybridisierung und für eine Karyotypanalyse eingesetzt.

### **3.6.1.5 Karyotyp-Analyse homolog rekombierter ES-Zellklone**

Es ist wichtig, dass die ES-Zellen ihren normalen Karyotyp von 40 akrozentrischen Chromosomen während der Kulturphase beibehalten. Dies ist für die Gewinnung von keimbahngängigen Chimären nach der Blastozysteninjektion der ES-Zellen essentiell. Daher werden alle potentiell für die BCI einzusetzenden ES-Zellklone einer vorherigen Karyotypanalyse unterzogen.

Durch eine Inkubation von 50 min (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) mit 0,1  $\mu$ g/ml Demecolcine (2 ml ES-WT-Medium + 40  $\mu$ l Demecolcine) werden die Zellen eines konfluent bewachsenen T25-Kolbens in der Metaphase der Mitose arretiert. Die Zellen werden anschließend mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, trypsiniert und in einem 50 ml Röhrchen pelletiert. Durch Klopfen werden die Zellen in 1 ml isotonischer KCl-Lösung resuspendiert. Die Zugabe von weiteren 3 ml isotonischer KCl-Lösung und vorsichtiges Mischen für 10 min bei RT bringt die ES-Zellen zum osmotischen Schwellen. Anschließend werden die Zellen sedimentiert (5 min, 700 Upm, RT), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet durch tropfenweise Zugabe von eiskaltem,

## Methoden

frisch angesetztem Methanol/Eisessig (3:1) durch Klopfen resuspendiert. Bei einer Inkubation von 5 min bei RT findet eine erste Fixierung statt, die nach erneuter Sedimentation (5 min, 1.200 Upm, RT) zweimal in dem Methanol/Eisessig-Gemisch wiederholt wird. Abschließend werden die Zellen in 1 ml Methanol/Eisessig-Gemisch aufgenommen und zum Aufplatzen der Zellkerne mit einer Pasteurpipette aus 80 bis 100 cm Höhe auf saubere Objektträger getropft. Die Chromosomen werden durch eine Inkubation in Giemsa Färbelösung (Roth) angefärbt und die Objektträger unter Leitungswasser gespült. Nach Lufttrocknung der Objektträger werden die Zellen / Chromosomen mit Entellan (Merck) unter Deckgläsern eingedeckelt. Mindestens 15 auswertbare Chromosomen-Anhäufungen einzelner mitotisch arretierten Zellen werden pro ES-Zellklon an einem Zeiss-Axiophot mit Phasenkontrastoptik ausgezählt.

### **3.6.1.6 Einfrieren von HM1 Zellen**

Zum Einfrieren werden die ES-Zellen eines T25 Kolbens nach dem Trypsinieren in 10 ml ES-WT-Medium aufgenommen. In einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen werden die Zellen für 5 min bei 800 Upm und Raumtemperatur sedimentiert, in 1,5 ml ES-WT-Medium aufgenommen und gut resuspendiert. In drei beschriftete Einfrierampullen wird jeweils 500 µl ES-Einfriermedium vorgelegt, anschließend ebenfalls je 500 µl der Zellsuspension zugegeben und gründlich vermischt. Die Ampulle wird in einer Zell-Einfrier-Box bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren, durch die Bauart der Box wird eine Abkühlung von  $10^{\circ}\text{C}$  pro Stunde gewährleistet. Nach 48 h wird die Ampulle in flüssigen Stickstoff überführt.

### **3.6.1.7 Auftauen von HM1 Zellen**

Zum Auftauen wird eine Ampulle aus dem flüssigem Stickstoff in ein  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad überführt. Die aufgetauten Zellen werden dann in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, in dem 9 ml ES-WT-Medium vorgelegt wurden. Nach einer Zentrifugation (5 min, 800 Upm, RT) wird das Zellsediment in 5 ml ES-WT-Medium aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf einer gelatinisierten 6-Loch-Schale rekultiviert.

### **3.6.1.8 Transduktion von Cre-Protein (HTNC) in homolog rekombinierte HM1 Zellen**

Bei der Transduktion wird statt DNS direkt das gewünschte Protein, in diesem Fall die Cre-Rekombinase verwendet. Man umgeht so eine transiente Transfektion (durch Elektroporation) mit einem Cre-Vektor. In dieser Arbeit wurde sowohl die Transfektion als auch die Transduktion verwendet, um die Cre-Rekombinase in die Zellen einzubringen. Die zu transduzierenden Zellen werden auf gelatinisierten 24-Vertiefungs-Kulturschalen in 500  $\mu$ l ES-WT-Medium ausplattiert, so dass sie eine Konfluenz von 70 bis 90 Prozent besitzen. Vier Stunden nach dem Aussäen wird zum ES-WT-Medium 2,5  $\mu$ M (4,2  $\mu$ l); 5  $\mu$ M (8,3  $\mu$ l); 10  $\mu$ M (16,6  $\mu$ l) Cre-Protein (HTNC) zugegeben. Nach weiteren 16 h Kultur wird das Medium gegen ES-WT-Medium ausgetauscht. Nach weiteren 4-8 h Kultur werden die Zellen auf gelatinisierten 10 cm-Kulturschalen in Verdünnungen von 1:100; 1:1000; 1:2500; 1:5000 ausplattiert. Dies erreicht man durch Aufnahme der Zellen von einer 24-Loch-Schale in 20 ml Medium und Ausplattieren von 5 ml; 0,5 ml; 0,2 ml; 0,1 ml auf jeweils einer gelatinisierten 10 cm-Kulturschale. Dabei füllt man das Gesamtmediumvolumen jeweils auf 10 ml auf. Alle ein bis zwei Tage werden die Zellen mit frischem ES-WT Medium versorgt, bis nach einigen Tagen die Klone so weit gewachsen sind, dass sie auf gelatinisierte 48-Loch Kulturschalen überführt werden können. Bei der Weiterkultur von diesen Klonen wird beim Überführen von 48- auf 24-Loch-Kulturschalen etwa 200  $\mu$ l von der Zellsuspension zur PCR-Analyse eingesetzt.

### **3.6.2 Zellkultur von HeLa-Zellen**

#### **3.6.2.1 Kulturbedingungen für HeLa-Zellen**

Als Medium für die HeLa Wildtypzellen dient D10-Medium. Die Inkubation erfolgt bei 10 % CO<sub>2</sub> in Brutschrankatmosphäre. Bei stabil transfizierten HeLa Zelllinien wird als Selektionsdruck zusätzlich ein entsprechendes Antibiotikum hinzugefügt. HeLa-Zellen werden in unbeschichteten, verschieden großen Plastikzellkulturschalen (Falcon) kultiviert. Das Medium der Zellen (z. B. 10 ml bei einer 10 cm Schale) wird alle zwei bis drei Tage gewechselt, wobei meist nach diesem Zeitraum auch ein Aufteilen der Zellen stattfindet. Aufgeteilt werden HeLa-Zellen bei einer Konfluenz von etwa 90 % in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:15. Dazu wird das Medium mit Glas-Pasteur-Pipetten abgesaugt, die Zellen zweimal mit 10 ml PBS<sup>-</sup> gewaschen und

## Methoden

anschließend etwa 1 ml Trypsin-Lsg. zugegeben (Angaben für 10 cm Schale). Nach einer Inkubation von ca. 3 min bei 37°C lösen sich die Zellen von der Kulturschale ab. Anschließend wird das Trypsin durch Zugabe des entsprechenden Mediums inaktiviert und die sich in Suspension befindlichen HeLa-Zellen in der gewünschten Verdünnung neu ausplattiert. Die neuen Kulturschalen werden mit frischem Medium auf das Kulturvolumen aufgefüllt. Sollen die Zellen nicht aufgeteilt werden, so werden die Zellen zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und wieder frisches Medium zugegeben. Für Plastikgefäße anderer Größe werden die Medienmengen entsprechend skaliert.

### **3.6.2.2 Einfrieren von HeLa-Zellen**

Zum Einfrieren von HeLa-Zellen werden die Zellen einer zu 90 % konfluenten 10 cm Schale nach dem Trypsinieren in 6 ml Medium aufgenommen und in 15 ml Röhrchen überführt. Diese Suspension wird zentrifugiert (10 min, 800 Upm, RT), nach dem Absaugen des Überstandes die sedimentierten Zellen in 900 µl frischem D10-Medium (ohne Antibiotikum) aufgenommen und resuspendiert. Diese Suspension wird zu 100 µl DMSO pipettiert, welches in einer Einfrierampulle vorgelegt und nach Verschließen der Ampulle kurz gemischt wird. Die Ampulle wird sofort auf Eis gesetzt und anschließend in ein Einfriergefäß (Nalgene) transferiert. Nach einem Tag wird die Ampulle in die flüssige Phase des Stickstoffs überführt, in der eine Langzeitlagerung möglich ist.

### **3.6.2.3 Auftauen von HeLa-Zellen**

Zum Auftauen wird die Einfrierampulle möglichst kurz bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und der Inhalt in ein 15 ml Röhrchen pipettiert, in dem 9 ml D10-Medium vorgelegt sind. Nach Zentrifugation (10 min, 800 Upm, RT) wird der Überstand abgesaugt, die sedimentierten Zellen in frischem Medium resuspendiert und auf einer 10 cm Schale ausplattiert.

### **3.6.2.4 Transfektion von HeLa-Zellen mit Hilfe der Kalziumphosphat-Präzipitation**

Als Transfektion bezeichnet man die Aufnahme freier DNS von eukaryotischen Zellen. Als effizienteste Transfektionsmethode für HeLa-Zellen erwies sich der Einsatz von DNS-Kalziumphosphatpräzipitaten mit BBS-Puffer (Dr. Joachim Degen, persönliche Mitteilung). Die Kalziumphosphat-Präzipitation ist eine von Chen und

## Methoden

Okayama entwickelte Methode (Chen und Okayama, 1987). Für die Transfektionseffektivität ist vor allem der pH-Wert des BBS-Puffers entscheidend. Bei genau justiertem pH-Wert bildet sich ein feinkörniges DNS-Präzipitat, das von den Zellen effizient aufgenommen wird.

Die zu transfizierenden HeLa-Wildtypzellen werden acht bis zwölf Stunden vor der Transfektion auf 10 cm Kulturschalen ausplattiert, so dass nach dieser Zeit eine Konfluenz von etwa 60 % erreicht wird. Zur Transfektion werden 20 µg Plasmid-DNS pro 10 cm-Kulturschale in 500 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung gelöst und dieses Gemisch tropfenweise unter ständigem Schütteln in 500 µl 2-fach BBS (pH 6,95) pipettiert (15 ml Röhrchen). Das Gemisch wird 10 min bei RT inkubiert und schließlich vorsichtig tropfenweise in das Medium (D10; 10 ml) der zu transfizierenden Zellen pipettiert. Die so behandelten Zellen werden für 12 h (5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert und anschließend nach zweimaligem Waschen mit PBS<sup>-</sup> weitere 48 h (10 % CO<sub>2</sub>) in D10-Medium kultiviert.

### **3.6.2.5 Selektion und Isolierung stabiler HeLa-Zellklone**

Nach 48 h Inkubation in D10-Medium sollten alle transfizierten Zellen das auf dem Plasmid kodierte Resistenzgen exprimieren, wodurch eine Selektion mit D10-Antibiotika-Medium möglich ist. Die Zellen werden nach zweimaligem Waschen mit PBS<sup>-</sup> von den 10 cm-Kulturschalen trypsinisiert und in Verdünnungen von 1:5 bis 1:80 in antibiotikahaltigem Medium auf neue 10 cm-Kulturschalen verteilt und kultiviert. Nach vier bis fünf Tagen sollten die Zellen abgestorben sein, die den Vektor nicht aufgenommen haben und somit keine Resistenz gegen das jeweilige Antibiotikum besitzen. Nach etwa einer weiteren Woche in Kultur sollten die Zellen absterben, die den Vektor nicht in ihr Genom integriert haben. Nach etwa elf Tagen Kultur in Selektionsmedium sind auf einigen Kulturschalen, je nach Verdünnung, einzelne Zellsammlungen (Klone) zu erkennen, die auf eine einzelne Ausgangszelle zurückzuführen sind. Nachdem eine ausreichende Größe der HeLa-Klone erreicht ist, werden die Zellen eines einzelnen Klons mit Hilfe einer gelben Spitze von der Kulturschale vorsichtig abgeschabt und aufgesaugt. Die Isolierung der Zell-Klone erfolgt unter Beobachtung mit einem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung. Diese Zellen werden in eine Vertiefung einer Kulturschale mit 48 Vertiefungen (Falcon) pipettiert, in die 500 µl D10-Medium vorgelegt werden. Durch Mischen wird die Kolonie gut vereinzelt. Die auf diese Weise isolierten Klone werden im

## Methoden

Brutschrank weiter kultiviert und vermehrt, bis genügend Zellen zur Charakterisierung der einzelnen Klone sowie zum Einfrieren zur Verfügung stehen.

### **3.6.3 Kopplungsuntersuchungen an HeLa-Zellen**

Kopplungsstudien an HeLa-Cx-Transfektanten dienen in erster Linie zur funktionellen Charakterisierung von Gap Junction-Kanälen. Darüber hinaus sind sie jedoch auch immer ein indirekter Beleg für die Expression des transfizierten Connexin-Gens. Man unterscheidet homo- und heterotypische Kopplungsstudien. Im Fall der homotypischen Kopplungsstudien wird die Kopplung zwischen HeLa-Zellen untersucht, die das gleiche Connexin-Gen ausprägen; bei heterotypischen Kopplungsstudien handelt es sich um HeLa-Zellen, die verschiedene Connexine exprimieren und somit prinzipiell heterotypische Gap Junction-Kanäle ausbilden können.

### **3.6.4 Mikroinjektionen in HeLa-Zellen**

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).

Über Mikroinjektionsanalysen werden meist homotypische Kopplungsstudien durchgeführt. Für die Mikroinjektion mittels Iontophorese werden Kapillaren aus Borsilikatglas mit massivem Innenfilament verwendet (GB 100-F8P, Science Products GmbH). Die Injektionskapillaren werden mit Hilfe eines horizontalen Kapillarenziehgerätes (PD-5, Narishige) zu einem Spitzendurchmesser von 1-2  $\mu\text{m}$  ausgezogen. Die Kapillare wird mit dem stumpfen Ende in die Farblösung gestellt, so dass die gezogene Spitze durch die Kapillarkräfte mit Farblösung gefüllt wird. Anschließend wurde die Kapillare luftblasenfrei mit 1 M LiCl gefüllt und in den mit 1 M LiCl gefüllten Mikroelektrodenhalter eingesetzt. Der Mikroelektrodenhalter ist an einem steuerbaren Mikromanipulator angebracht und kann über ein Steuergerät bewegt werden. Die Injektion des Farbstoffes erfolgt durch Anlegen eines Stroms von 20 nA für 10 bis 15 Sekunden. Die Mikroinjektion wird mit einem inversen Mikroskop IM 35 (Zeiss; Fluoreszenzeinrichtung HBO 100 W) beobachtet. Die zu

## Methoden

untersuchenden HeLa-Zellen werden zwei Tage vor der Kopplungsmessung in 6 cm Schalen (Falcon) ausplattiert und haben zum Zeitpunkt der Analysen einen Konfluenzgrad von etwa 80 % bis 95 % erreicht. Die Farbstoffe Lucifer Yellow und DAPI werden in 1 M LiCl gelöst injiziert, die Ausbreitung des Farbstoffs kann direkt verfolgt und fotografisch dokumentiert werden. Die Zellen, in die sich der Farbstoff innerhalb von 2 min ausgebreitet hatte, wurden gezählt und dienen als Maß für die Kopplung. Hierbei wird zwischen koppelnden Zellen 1. Ordnung, also Zellen, die der injizierten Zelle unmittelbar benachbart sind und solchen 2. Ordnung, die den Zellen 1. Ordnung unmittelbar benachbart sind, unterschieden.

Damit der Injektionserfolg mit Neurobiotin beobachtet werden kann, wird der Neurobiotin-Lösung (in 1 M KCl) zusätzlich Rhodamin-3-Isothiocyanat Dextran zugegeben. Nach den Injektionen in verschiedene, entfernt voneinander liegende Zellen (10 bis 20 Injektionen pro Kulturschale innerhalb von 15 Minuten) werden die Kulturschalen zweimal mit PBS (RT) gewaschen und die Zellen mit Glutaraldehyd-Lösung (2 ml auf eine 6 cm-Schale; 5 min; RT) fixiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS (RT) werden sie in Triton X-100-Lösung ÜN bei 4°C permeabilisiert, zweimal mit PBS (RT) gewaschen und für 90 min mit 2 ml Meerrettich-PO-Lösung bei RT inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS (RT) erfolgt die Farbreaktion durch Inkubation von 30 sec in Diaminobenzidin-Lösung (2 ml auf eine 6 cm-Schale). Die Farbreaktion wird durch Absaugen der Diaminobenzidin-Lösung und dreimaligem Waschen mit PBS gestoppt. Die Zellen werden mit PBS überschichtet und die Anzahl der gefärbten Zellen pro Injektion kann unter einem Mikroskop ausgezählt werden.

### **3.6.5 ATP-Freisetzungs-Untersuchungen**

Die zu untersuchenden HM1 ES Zellen werden auf gelatinisierten 3,5 cm Schalen kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 40 bis 50 % erreicht haben. Dann werden sie zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend mit 500µl HBSS mit 1mM EGTA für 25 min bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Stimulation werden 100 µl des Überstandes abgenommen und für 20 min mit 100 µl des Nukleotid-Freisetzungs-Reagenzes (aus dem ViaLight™ HS Kit der Firma Cambrex) inkubiert. Abschließend wird die ATP Konzentration mit dem Berthold Microplate LB96V Luminometer gemessen. Dieses Gerät gibt automatisch 20 µl des ATP Nachweis-Reagenzes hinzu. Die ATP Freisetzung kann durch Zugabe von HBSS mit 1mM EGTA gesteigert

## Methoden

und durch Waschen der Zellen mit PBS<sup>-</sup> und Inkubation in ES-WT Medium bis auf das Basal-Level reduziert werden. Alle Ergebnisse der ATP Abgabe wurden nach der Gesamtproteinmenge normalisiert. Nachgewiesen und gemessen werden relative Luziferase Einheiten, die indirekte Rückschlüsse auf die ATP Menge liefern.

### **3.7 Untersuchungen an Mäusen**

#### **3.7.1 Wundheilungsanalysen von Maushaut**

Zur Untersuchung des Verlaufes der Wundheilung wurden Schnittwunden gesetzt. Als Schnittwunde wird in dieser Arbeit das Anbringen eines geraden Schnittes durch Epidermis und Dermis verstanden. Im Gegensatz dazu wird bei einer flächigen Wunde ein rundes Stück Haut mit einem Durchmesser von ca. 0,5 cm ausgeschnitten, so dass eine Wundfläche entsteht.

#### **3.7.2 Schnittwunden am Mausschwanz**

Wenn verschiedene Wundheilungsstadien untersucht werden sollen, wird für jeden zu untersuchenden Tag eine Maus benötigt. Diese Mäuse werden am Schwanz jeweils mit fünf bis sieben Schnittwunden im Abstand von etwa 0,5 cm versehen. Der dem Körper nächste Schnitt hat einen Abstand von etwa einem Zentimeter zum Rumpfansatz. Zur Ausführung der Schnitte wird die Maus an der Schwanzspitze festgehalten und mit einer neuen Skalpellklinge (Bayha) werden quer zum Schwanz etwas einen Zentimeter lange Schnitte gesetzt. Zur Schwanzspitze wird ebenfalls ein Abstand von mindestens einem Zentimeter gelassen, da bei den verwendeten Tieren bereits eine Schwanzspitzenbiopsie zur Genotypisierung vorgenommen wurde und die Wundheilung in diesem Bereich die Ergebnisse beeinflussen könnte. Die Wunden können anschließend zur Proteinanalytik, für Gefrierschnitte oder Paraffinschnitte eingesetzt werden.

#### **3.7.3 Präparation der Schnittwunden am Mausschwanz**

Jede der durch Wundsetzung vorbereiteten Mäuse wird am Tag der Untersuchung (Tag X nach Wundsetzung) mit dem Inhalationsnarkotikum Forene<sup>®</sup> betäubt und anschließend getötet. Da die Wunden recht leicht aufbrechen können ist ein Töten der Mäuse im wachen Zustand mittels Genickbruch nicht möglich. Anschließend wird der Schwanz möglichst dicht am Rumpf der Maus abgetrennt und ein Längsschnitt entlang der Unterseite des Schwanzes angebracht. Von diesem Längsschnitt

## Methoden

ausgehen wird die Haut vorsichtig vom restlichen Gewebe des Schwanzes abpräpariert. Es empfiehlt sich die Verwendung einer neuen, scharfen Skalpellklinge, da die Wunde, die häufig mit dem restlichen Gewebe verklebt, sonst sehr leicht aufreißt. Wenn die komplette Schwanzhaut vom restlichen Gewebe abgetrennt wurde werden die einzelnen Wunden ausgeschnitten und je nach weiterer Verwendung weiterbearbeitet. Zur Anfertigung von Gefrierschnitten werden die Wunden in TissueTek<sup>®</sup> eingebettet, und auf ein Stück Parafilm gelegt. Dieses wird dann in flüssigen Stickstoff getaucht. Dabei fällt das Parafilmstück ab und die Wunde kann in bereits eingebettetem Zustand gelagert werden, was die Weiterverarbeitung am Cryostaten erheblich vereinfacht. Zur Herstellung von Gewebelysaten werden die Wunden möglichst eng ausgeschnitten und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Falls eine Paraffineinbettung gewünscht ist, muss diese im unmittelbaren Anschluss an die Präparation erfolgen. Dabei werden die Wunden direkt in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und in Paraffin eingebettet, ohne zuvor gefroren zu werden.

### **3.8 Proteinanalytik**

#### **3.8.1 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Zur Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate wird der Reagenziensatz „Bichinonic Acid Kit for Protein Determination“ (Sigma) verwendet. Es werden 2 bzw. 5  $\mu\text{l}$  Lysat eingesetzt (Doppelbestimmung). Das Prinzip dieses Nachweises beruht auf der Fähigkeit von Proteinen, Kupfersulfat zu reduzieren. Das BCA (Bichinonic Acid) komplexiert das reduzierte Kupfer, die Absorption dieses Komplexes ist bei 562 nm fotometrisch nachweisbar, hierbei ist die Absorption proportional zur Proteinkonzentration. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben.

#### **3.8.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld unabhängig von ihrer Eigenladung. Die Proteinproben werden mit SDS, einem anionischen Detergenz, behandelt, welches sich an hydrophobe Aminosäuren anlagert, so dass die Eigenladung der Proteine vernachlässigt werden kann. Durch den Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden inter- und intramolekulare Disulfidbrücken reduziert.

## Methoden

Die Proteinauftrennung erfolgt mit einem Sammel- und einem Trenngel, die sich in ihrem pH-Wert und ihrer Porengröße unterscheiden. Hierdurch wird die Fokussierung der Proteine in scharfe Banden erreicht. Die SDS-Proteinkomplexe ordnen sich im großporigen Sammelgel (pH 6,8) zwischen den vorauslaufenden Chloridionen (Leitonen) und den Glyzin-Molekülen (Folgeionen) an, die bei diesem pH-Wert überwiegend als Zwitterionen mit einer Nettoladung von Null vorliegen. Im kleinporigen Trenngel (pH 8,8) erhält das Glyzin eine negative Gesamtladung und überholt die SDS-Proteinkomplexe, wodurch der Sammeleffekt aufgehoben wird. Nun trennen sich die SDS-Proteinkomplexe nach ihrer molekularen Masse. Sie können anschließend mit verschiedenen Färbemethoden sichtbar gemacht werden. Zunächst wird das Trenngel bis ca. 1 cm unterhalb der Auftragetaschen gegossen und mit 0,1 % SDS-Lösung überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wird das Sammelgel gegossen und der Auftragekamm eingesetzt. Das auspolymerisierte Gel wird in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Pufferkammer mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt. Die mit 4x Laemmli-Probenpuffer versetzten Proben (je 100 µg Protein) werden auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 4°C, zum Sammeln der Proben wird eine Stromstärke von 20 mA angelegt. Sobald die Bromphenolblaubande das Trenngel erreicht hat, wird die Stromstärke auf 25 mA erhöht.

Zusammensetzung	Sammelgel (4 %)	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)
Acrylamid-Stamm-Lsg.	1,0 ml	5,25 ml	6,0 ml
Sammelgelpuffer (4 x)	1,9 ml	-	-
Trenngelpuffer (4 x)	-	3,75 ml	3,75 ml
A. bidest	4,5 ml	5,25 ml	5,25 ml
TEMED	10 µl	9 µl	9 µl
APS (10 %)	45 µl	90 µl	90 µl

**Tabelle 4:**  
Zusammensetzung von SDS-PAGE-Gelen

### 3.8.3 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue™

Das Polyacrylamidgel wird in CoomassieBrillantBlue™-Färbelösung für mindestens 1 h bei RT auf einer Wippe und anschließend in Coomassie-Entfärber bei RT inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar sind. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 50 ng Protein pro Bande, daher ist diese Färbemethode auch für Gele nach dem Transfer der Proteine auf eine geeignete Membran geeignet. Unter Vakuum

## Methoden

kann das Gel auf einem 3MM-Papier im Geltrockner (80 min, 80°C) getrocknet werden.

### **3.8.4 Elektrotransfer von Proteinen aus dem Gel auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)**

Der Western-Blot ermöglicht den spezifischen Nachweis eines Proteins aus einem nach SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemisch mit Hilfe von Antikörpern. Hierzu werden die Proteine aus dem Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Membran wird mit der Antikörper-Lösung inkubiert und die gebundenen Antikörper über ECL sichtbar gemacht.

Nach der Gelelektrophorese wird ein „Sandwich“ aus folgenden Komponenten gebildet: Schaumstofflappen, 3MM-Papier, Polyacrylamidgel, Hybond-ECL-Nitrozellulose-Membran (Amersham), 3MM-Papier, Schaumstofflappen. Dieses „Sandwich“ wird mit zwei gelöcherten Plastikplatten zusammengehalten und in die mit 1 x Transferpuffer gefüllte Transferkammer gesetzt. Die Nitrozellulose-Membran ist zur Anode hin orientiert. Der Proteintransfer erfolgt bei 4°C und 100 V für 2 h.

### **3.8.5 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen**

#### **3.8.5.1 Ponceau-Färbung**

Der Nachweis von Proteinen auf der Nitrozellulose-Membran erfolgt reversibel, die Detektionsgrenze liegt bei 100 ng Protein pro Bande. Hiermit wird der Transfer von Proteinen aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulose-Membran nachgewiesen.

#### **3.8.5.2 Immunoblot-Analyse mittels Chemilumineszenz (ECL)**

Mit Hilfe der Immunoblot-Analyse kann ein spezifisches Protein auf einer Nitrozellulose-Membran, auf die das aufgetrennte Proteingemisch zuvor mittels Western-Blot transferiert wurde, nachgewiesen werden. Für die Immunoblot-Analyse mit Hilfe der Chemilumineszenz wird das SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate der Firma Pierce eingesetzt.

Nachdem die Proteine auf eine Hybond-ECL-Nitrozellulose-Membran transferiert wurden, wird die Nitrozellulose-Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungen der Antikörper in Blockpuffer für 1 h bei RT auf einer Wippe inkubiert. Es schließt sich die Inkubation der Nitrozellulose-Membran mit dem Primärantikörper verdünnt in Blockpuffer an (1 h RT oder ÜN 4°C). Durch Waschen mit Waschpuffer (2 x 5 min,

## Methoden

2 x 10 min, RT) werden die unspezifisch gebundenen Antikörper entfernt. Die Membran wird mit dem in Blockpuffer verdünnten Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert und anschließend die unspezifisch gebundenen Antikörper abgewaschen (2 x 5 min, 2 x 10 min, RT). Die Chemilumineszenz-Lösungen (Pierce) werden im Verhältnis eins zu eins gemischt und damit die Membran für 5 min bei RT inkubiert. Die Membran wird in eine Filmkassette eingelegt und ein RX-Film (Kodak) aufgelegt. Nach verschiedenen Expositionszeiten (10 sec bis 20 min) werden die Filme entwickelt.

### **3.8.6 Immunfluoreszenz-Analysen**

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

Die Gewebeschnitte werden für 10 min mit eiskaltem Ethanol (96 %) fixiert, darauf folgend dreimal in PBS<sup>-</sup> (5 min, RT) gewaschen und danach für 2 h bei RT oder ÜN bei 4°C mit den in Blockierungslösung verdünnten Primärantikörpern inkubiert. Es folgen drei Waschschrte mit PBS<sup>-</sup> (5 min, RT), die Gewebeschnitte werden daraufhin für 45 min bei RT mit in Blockierungslösung verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min, RT) mit PBS<sup>-</sup> kann eine Hoechst-Kernfärbung durchgeführt werden. Hierfür werden die Gewebeschnitte für 10 min bei RT in Hoechst-Färbelösung inkubiert. Nach drei Waschschrten (je 5 min, RT) mit PBS<sup>-</sup> werden die Gewebeschnitte mit Dako<sup>®</sup> Mounting Medium versehen und mit einem Deckglas verschlossen. Die Auswertung erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

## 4 Ergebnisse

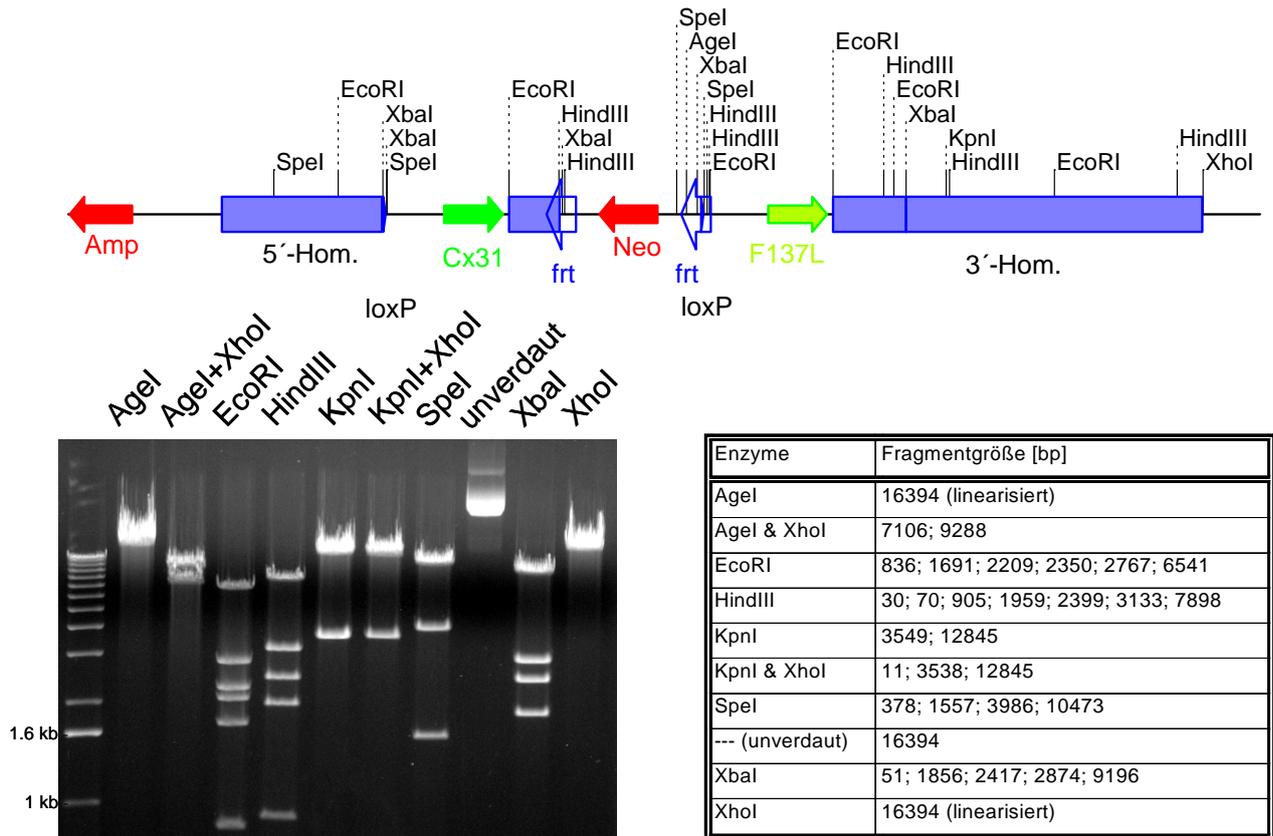
### 4.1.1 Klonierung des Mausvektors Cx31F137L

Um die Funktion der Mutation F137L im Connexin31 Gen der Maus *in vivo* untersuchen zu können, war es erforderlich, einen Vektor herzustellen, der einen Austausch der endogenen Connexin31 kodierenden DNS durch die des mutierten Gens erlaubt. Da Connexin31 in der Maus nicht nur in der Haut, sondern auch in der Plazenta und im acht Zellstadium der frühen Embryonalentwicklung (Plum et al., 2001) ausgeprägt wird, wurde ein konditionaler Ansatz gewählt. Dabei sollte eine zeitlich und räumlich kontrollierte Expression der Cre-Rekombinase die Expression des veränderten Cx31 Proteins selektiv in bestimmten Entwicklungsstadien erreicht werden, um auf diese Weise embryonal letale Effekte zu vermeiden. In dieser Arbeit wurde auf das Einbringen eines Reportergens und die Modifikation des mutierten Proteins mit Fluoreszenz- oder anderen Markern verzichtet, um auszuschließen, dass ein beobachteter Effekt auf die Reporterproteine zurückgeführt werden kann.

Durch den konditionalen Ansatz bedingt, verbleibt in jedem Fall eine loxP Erkennungsstelle im Genom. Daher musste sichergestellt werden, dass diese verbleibende Sequenz keinen Einfluss auf die Expression und Regulation des Cx31 Gens hat. Promoter-Bindungsanalysen von Achim Plum (Plum et al., 2001) zeigten, dass es eine Region des Introns gibt, in der eine Veränderung der Sequenz keinen Einfluss auf die Expression des Cx31 Gens hat. Diese Stelle wurde als Position der loxP-Erkennungssequenz ausgewählt, um einen regulatorischen Effekt durch diese Modifikation der Intronsequenz auszuschließen.

Eine Übersicht der Klonierungsstrategie des Cx31F137L-Vektors (A´BC) findet sich im Anhang dieser Arbeit. Die verwendeten Ausgangsvektoren waren kommerziell erhältlich (pBlueskript [Fermentas, Kanada]) oder in anderen Arbeiten (Gx1 und Gx2: Plum et al., 2001; lox-HPRT-lox del *Xba* und pBSK:frt-NEO-frt: Dissertation Joachim Degen, 2003) beschrieben. Das F137L *Bam*HI/*Xba*I-Fragment wurde durch ortsgerichtete PCR-Mutagenese erzeugt. Als Vorlage wurde hierbei der Vektor Gx2 (Plum et al., 2001) verwendet. Der Zielgenvektor (Abb. 7) wurde, bevor er zur homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen eingesetzt wurde, durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung (Firma Agowa, Berlin) charakterisiert, um sicherzustellen, dass keine zusätzlichen Veränderungen der Sequenz vorhanden waren.

## Ergebnisse



**Abbildung 8:**

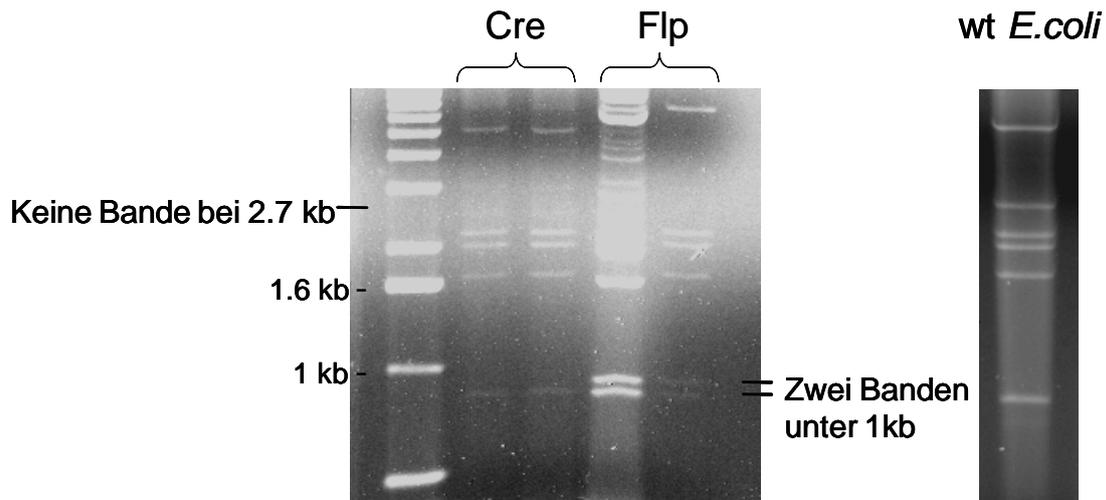
Schematische Darstellung des Cx31F137L-Zielgenvektors (oben) und Restriktionsanalyse des Cx31F137L-Zielgenvektors (unten links). In der Tabelle (unten rechts) sind die zu erwartenden Fragmentgrößen aus den Restriktionsanalysen aufgeführt. Die Homologiebereiche (5'-Hom. und 3'-Hom.) dienen der Anlagerung an die genomische Sequenz, um eine homologe Rekombination zu ermöglichen. Die Neomycinresistenzkassette (Neo) ist nötig, um ES-Zellen zu selektieren, die den Zielgenvektor aufgenommen haben.

### 4.1.2 Überprüfung der Funktionalität der frt- und loxP-Erkennungsstellen in *E. coli*

Die Funktionalität der frt- und loxP- Erkennungssequenzen wurde überprüft, indem eine Transformation transgener *E. coli* (Buchholz et al., 1996), die entweder die Flp-Rekombinase oder aber die Cre-Rekombinase konstitutiv exprimieren, mit dem Cx31F137L-Mausvektor durchgeführt wurde. Die Restriktionsereignisse ließen sich nach restriktionsendonukleolytischer Spaltung mit *EcoRI* erfolgreich nachweisen.

Die Aktivität der Cre-Rekombinase wird durch die nicht mehr vorhandene 2,7kb Bande (im Vergleich zu transformierten Wildtyp *E. coli*s) nachgewiesen. Die Aktivität der Flp-Rekombinase ist durch eine zusätzliche Bande (im Vergleich zu transformierten Wildtyp *E. coli*-Bakterien) bei 900 bp nachgewiesen (siehe Abbildung 9).

## Ergebnisse



**Abbildung 9:**

Nachweis der Funktionalität der *frt*- und *loxP*-Erkennungsstellen im Cx31F137L-Zielgenvektor nach Aktivität der Cre- und Flp-Rekombinase in transgenen *E.coli*. Die Kontrollrestriktion der aus den unterschiedlichen *E.coli* isolierten Vektor-DNSs mit *EcoRI* ergab das erwartete Bandenmuster. Das nicht mehr Vorhandensein der 2,7 kb Bande der aus den Cre-*E.coli* isolierten DNS weist das Ausschneiden der *loxP*-Erkennungsstellen flankierten DNS Sequenz nach. Das Ausschneiden an den *frt*-Erkennungsstellen wird durch das Auftreten der Doppelbande unter 1kb in Flp-*E.coli* nachgewiesen.

### 4.2 Untersuchung der Cx31 und Cx31F137L Kanäle in HeLa Zellen

Parallel zur Klonierung des Cx31F137L-Mausvektors wurden mehrere HeLa-Expressionsvektoren kloniert (siehe Anhang). Diese sollten dazu dienen, den Einfluss der Mutation F137L auf Cx31WT HeLa Zellen zu untersuchen. Außerdem sollten Kopplungsanalysen und elektrophysiologische Messungen der Connexinkanäle erfolgen. Es wurden in dieser Arbeit folgende Vektoren erzeugt: Cx31; Cx31V5; Cx31HIS; Cx31V5/HIS; Cx31F137L; Cx31F137LV5; Cx31F137LHIS, Cx31F137LV5/HIS. Alle diese Vektoren wurden in einer Ein-Schritt-Klonierung erzeugt, dabei wurde als Vektorrückgrat der Vektor pMJGreen verwendet und das Insert inklusive der verschiedenen Anhänge mittels PCR erzeugt. Eine Ausnahme bilden die Vektoren Cx31V5/HIS und Cx31F137LV5/HIS, bei denen das Vektorrückgrat aus dem kommerziell erhältlichen pcDNA3.1V5/HIS stammt, also lediglich die kodierende Region vor die, schon im Vektor vorhandenen, Marker kloniert werden musste. Mit diesen unterschiedlichen Vektoren wurden HeLa Zellen transfiziert. Es zeigte sich, dass bei mehrmaligen Transfektionen mit unterschiedlichen Konstrukten immer nur solche Zellen überlebten, welche mit Vektoren transfiziert wurden, die für eine Wildtyp Form des Connexin31 kodierten. Eine Markierung hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die Expression des Cx31. Alle Zellen, die Vektoren aufgenommen hatten, die die Cx31F137L kodierende

## Ergebnisse

Region enthielten, starben innerhalb zweier Tage, unabhängig davon, ob sie zusätzlich durch His<sub>6</sub>, V5, keine oder sogar beide Modifikationen verändert waren. Daher war die Charakterisierung der Kanaleigenschaften nicht möglich. Auch eine Transfektion von bereits Connexin31 exprimierenden HeLa Zellen mit Vektoren, die eine mutierte Form enthielten, führte zum Tod aller Zellen. Die Transfektionen wurden parallel durchgeführt, so dass methodische Fehler auszuschließen sind. Die Expression des Connexin31-Proteins wurde durch Immunoblot Analysen gegen Cx31, V5 und His<sub>6</sub> nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Verwendeter Vektor	Anzahl Klone 1. Transfektion	Anzahl Klone 2. Transfektion
Cx31	>100	>100
Cx31V5	>100	>100
Cx31His <sub>6</sub>	>100	>100
Cx31V5-His <sub>6</sub>	>100	>100
Cx31F137L	0	0
Cx31F137LV5	0	0
Cx31F137LHis <sub>6</sub>	0	0
Cx31F137LV5-His <sub>6</sub>	0	0
Cx31F137LV5 in Cx31-Hela Zellen	0	0

**Tabelle 5:**

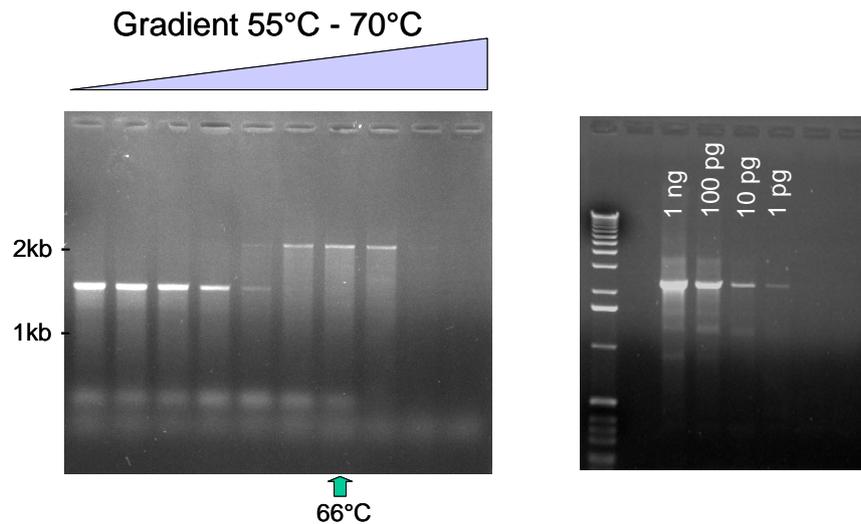
Transfektion der HeLa Zellen mit verschiedenen Cx31 Konstrukten. In den rechten Spalten ist jeweils die Anzahl der überlebenden Klone nach der Transfektion angegeben. Die Transfektionen erfolgten generell in Wildtyp HeLa Zellen, in der untersten Reihe wurden jedoch bereits stabil mit Cx31 transfizierte HeLa Zellen verwendet.

### 4.3.1 Embryonale Stammzellen

#### 4.3.1 Etablierung der ES-Zell-PCR

Der PCR-Testvektor, der sich durch eine, im Vergleich zum Cx31F137L-Zielgenvektor, verlängerte 5'-homologe Region auszeichnet, diente zur Etablierung einer PCR, um eine homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen nachzuweisen (Klonierungsstrategie im Anhang). Bei Etablierung der ES-Zell-PCR wurde erreicht, dass noch DNS-Mengen bis zu einem Pikogramm des PCR-Testvektors nachgewiesen werden können. Die optimale Reaktionstemperatur liegt bei 66°C (Abb. 10).

## Ergebnisse



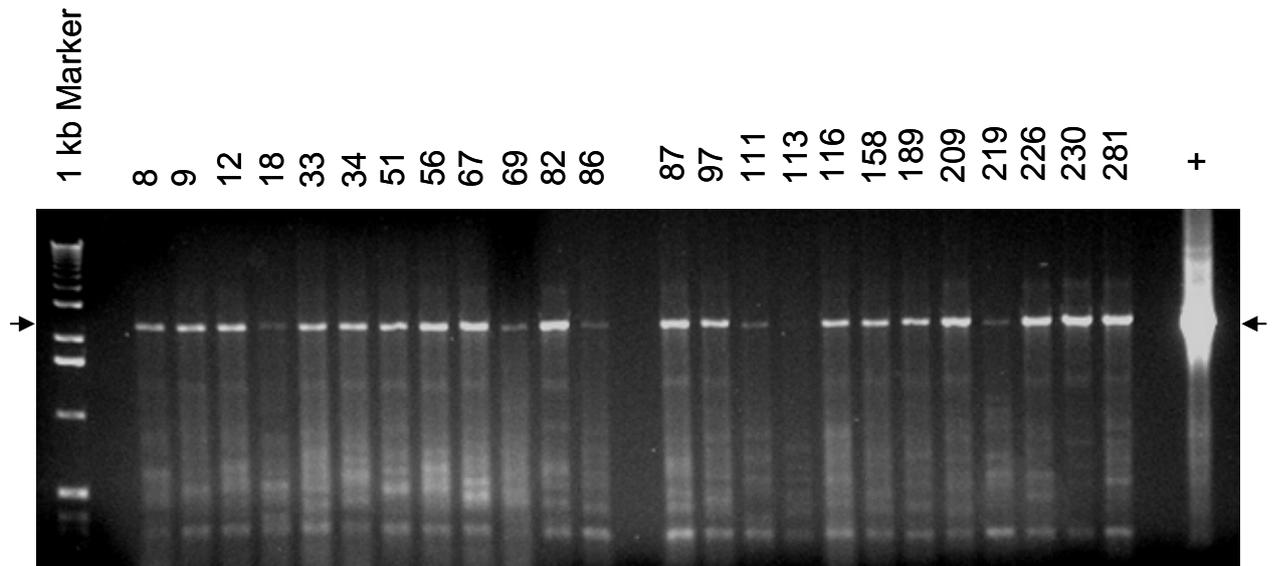
### Abbildung 10:

Der Test der optimalen Anlagerungstemperatur der Primer in der ES-Zell-PCR ergibt einen Wert von 66°C (links). Der Test der Empfindlichkeit der etablierten ES-Zell-PCR ergibt, dass noch eine DNS Menge von 1 pg mit dieser PCR nachweisbar ist.

### 4.3.2 Transfektion der ES-Zellen mit dem Cx31F137L-Zielgenvektor

Die Transfektionen der ES Zellen mit dem Zielgenvektor lieferten über 1000 Klone, von denen 750 ausgewählt wurden. Alle Klone wuchsen an und ließen sich weiterkultivieren. Nach Untersuchung von 280 Klonen wurden 42 ES-Zell-PCR positive Klone identifiziert und auf eine Untersuchung weiterer Klone verzichtet. Alle ES-Zell-PCR-Analysen wurden mit jedem Klon zweimal durchgeführt und nur doppelt positive Klone als homolog rekombiniert bezeichnet (siehe Abbildung 11). Das Ausmaß der homologen Rekombination liegt damit bei 15% aller überlebender Klone.

## Ergebnisse



**Abbildung 11:**

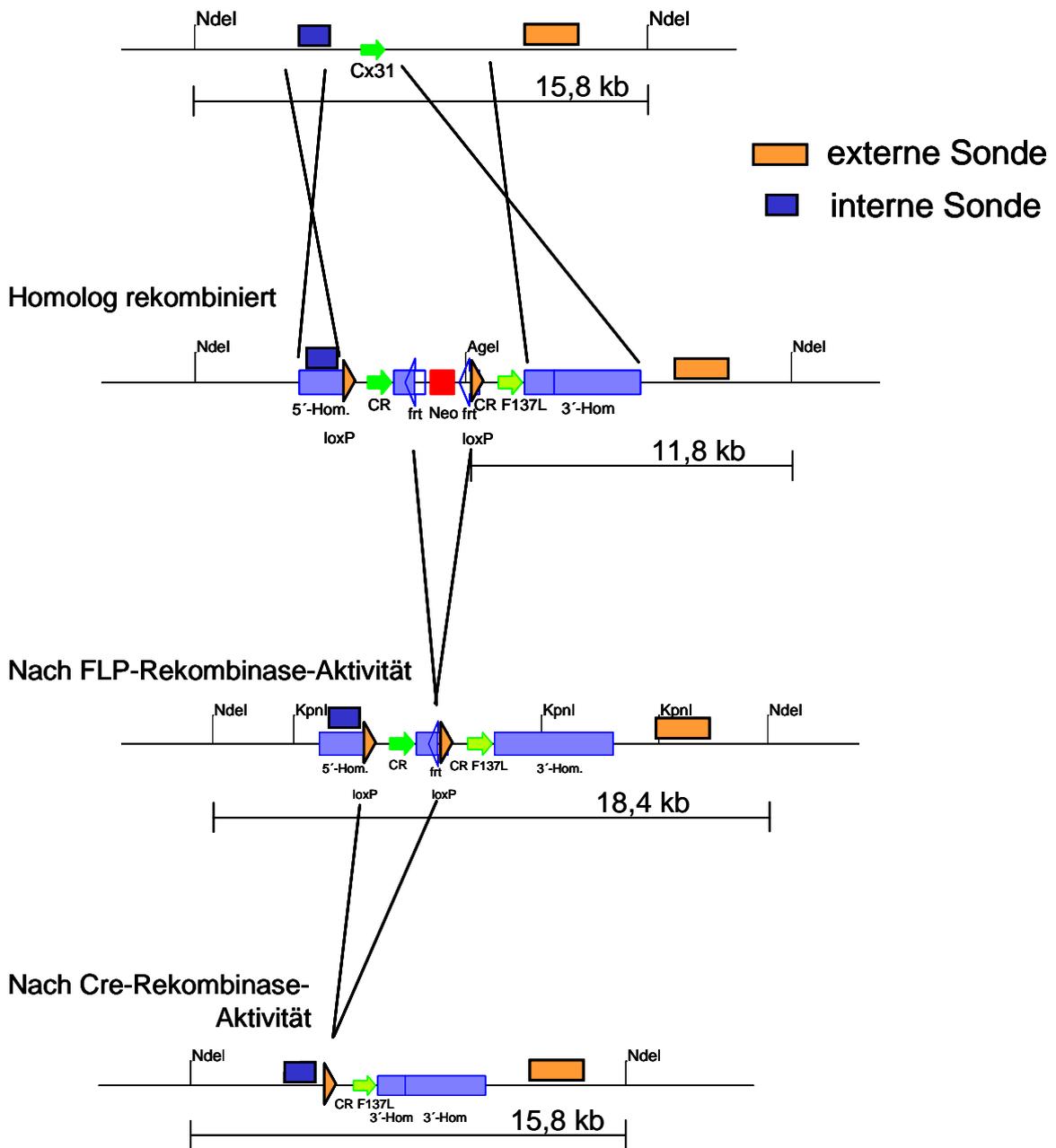
ES-Zell-Klone, die in der ES-Zell-PCR als homolog rekombiniert nachgewiesen wurden. Die Bande bei 2,1 kb zeigt ein Rekombinations-Ereignis an. In der rechten Spur ist die Positivkontrolle aufgetragen. Die Nummern geben die Bezeichnung des jeweiligen Klons an. Der Klon 189 wurde nach Southern Blot und Karyotypanalyse zur Blastozysteninjektion eingesetzt.

### 4.3.3 Southern Blot zum Nachweis der homologen Rekombination

Der Southern Blot wurde mit genomischer DNS aus ES-Zellen durchgeführt welche mit den Restriktionsendonukleasen *AgeI* und *NdeI* gespalten wurde. Die Southern Blot Hybridisierung ergab den Nachweis einer homologen Rekombination (3'-externe Sonde) für alle untersuchten Klone, die auch in Abbildung 10 in der PCR gezeigt sind (siehe Abbildung 12). Durch Verwendung einer internen Sonde wurde ebenfalls sichergestellt, dass keine weiteren zusätzlichen Insertionen im Genom der ES-Zellen vorliegen (Daten nicht gezeigt). Der Southern Blot und die anschließende Hybridisierung wurde analog zur Southern Blot Analyse der unterschiedlichen Genotypen der Mäuse durchgeführt.

## Ergebnisse

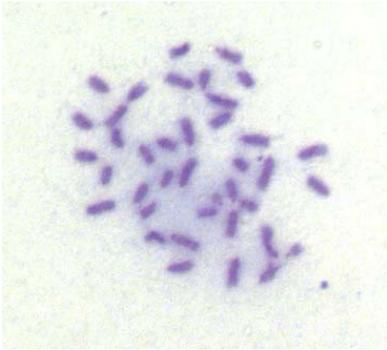
### Cx31 Wild-Typ Lokus



### Abbildung 12:

Schema der homologen Rekombination und die Position der verwendeten Southern Blot-Sonden. Im unteren Teilbereich der Abbildung ist der Aufbau des Cx31Lokus nach Aktivität der FLP-Rekombinase bzw. nach Aktivität der Cre-Rekombinase gezeigt. Zu beachten ist, dass bei Aktivität der Cre-Rekombinase die durch flp-Erkennungsstellen umgebene Neomycinresistenzkassette ebenfalls entfernt wird, da diese zwischen den flankierenden loxP Erkennungsstellen liegt. Die Restriktionsspaltung für den Southern Blot erfolgte mit *NdeI* und *AgeI*. Die Fragmentgrößen der in der Southern Blot Hybridisierung mit der externen Sonde angewiesenen Fragmente sind im Wildtyp-Lokus und nach Cre-Rekombinase Aktivität 15,8 kb, nach Flp-Aktivität 18,4 kb und im homolog rekombinierten (gefloxten) Zustand 11,8 kb. Das kleinere Fragment im gefloxtem Zustand ergibt sich durch eine zusätzlich eingeführte *AgeI* Schnittstelle.

#### 4.3.4 Karyotypanalyse der ES Zell Klone



Die Karyotypanalyse ergab bei fünf Klonen (24, 116, 158, 189, 281) einen zu über 90% „normalen“ Chromosomensatz von 40 Chromosomen. Zur Blastozysteninjektion wurde Klon 189 eingesetzt.

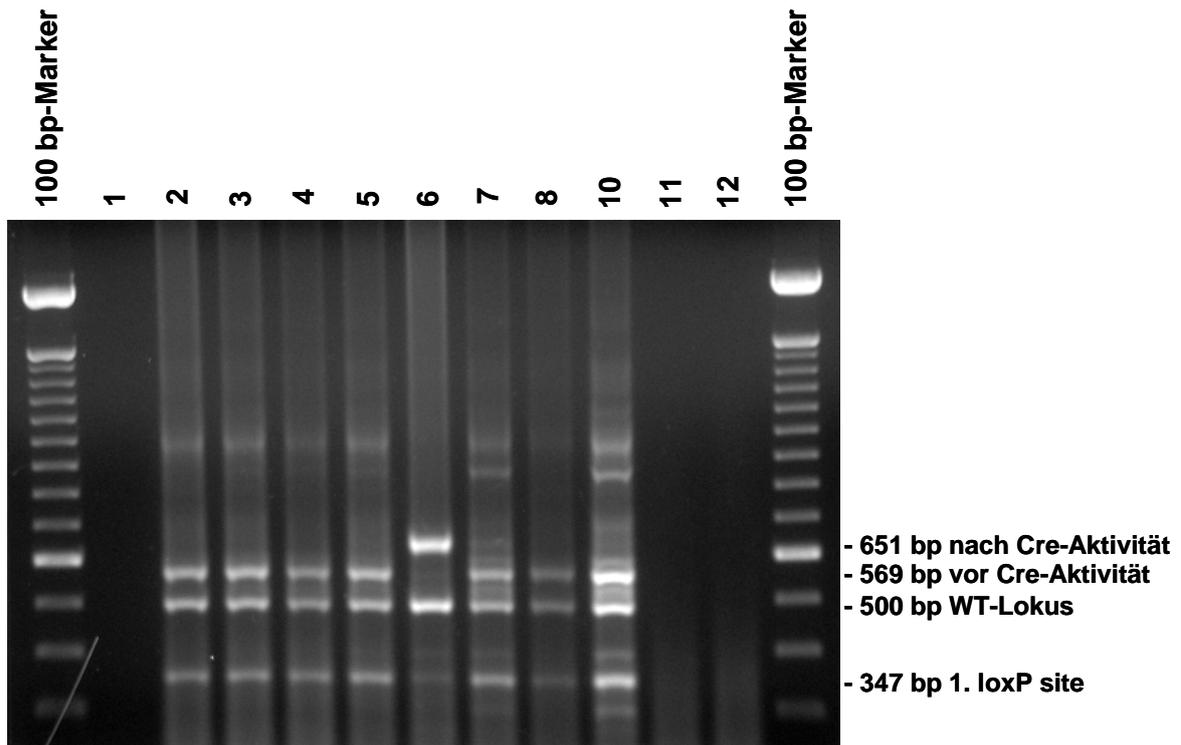
**Abbildung 13:**

Typisches mikroskopisches Bild der Karyotypanalyse. Anhand dieser Fotos wurde die Anzahl der Chromosomen ausgezählt.

#### 4.3.5 Transiente Transfektion der homolog rekombinierten ES-Zellen mit dem Plasmid pCrePac

Zur Untersuchung der Cx31F137L Mutation in einem nativen System wurden die bereits mit dem Cx31F137L-Mausvektor transfizierten ES-Zellen (Klon 189), transient mit einem Vektor, der die kodierende Region der Cre-Rekombinase enthält (pCrePac), transfiziert. Diese Transfektion führte zu einigen Klonen, in denen die Cre-Rekombinase nachweislich aktiv war, so dass diese Klone nun auf einem Allel weiterhin die Cx31 kodierende Region und auf dem anderen Allel die Cx31F137L Mutation exprimierten. Der Nachweis der Cre Aktivität erfolgte mittels PCR (siehe Abbildung 14).

## Ergebnisse



**Abbildung 14:**

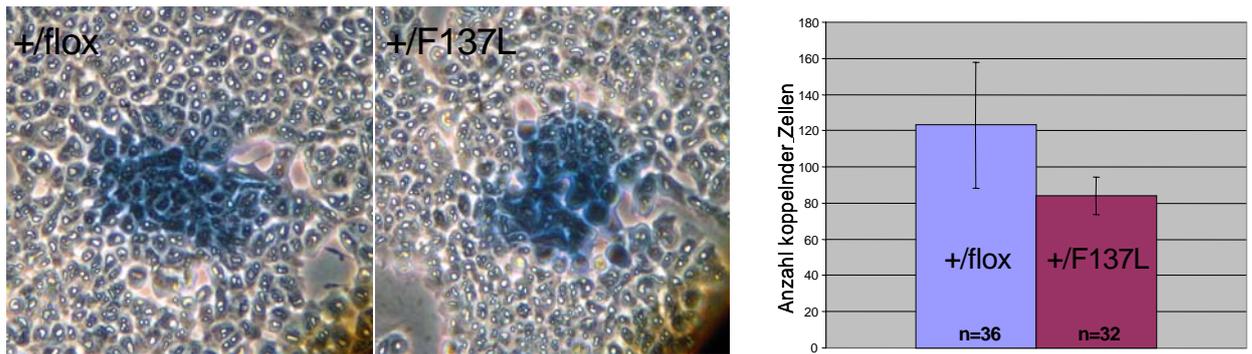
Nach Transfektion von ES-Zellen mit einem Plasmid, welches die kodierende Region der Cre-Rekombinase enthält, ergab sich nach Analyse mit der Cx31F137L-Maus-PCR ein Klon (Klon 6), in dem die Cx31F137L Mutation aktiv ist.

### 4.3.6 Kopplungsanalysen der F137L-ES-Zellen

(in Zusammenarbeit mit Philipp Wörsdörfer)

In durch homologe Rekombination und transiente Cre-Transfektion erzeugten ES-Zellen wurde zur Untersuchung ihrer Kopplungseigenschaften Neurobiotin injiziert. Als Kontrolle wurden Zellen der gleichen Passagenzahl eingesetzt, in denen die Cre Rekombinase nicht aktiv war. Es ergibt sich eine signifikante (student's T-Test:  $p = 0,0013$ ) Kopplungsreduktion (ca. 30%) der Zellen, die die Cx31F137L Mutation heterozygot exprimieren, im Vergleich zu +/flox Zellen (Abb. 15).

## Ergebnisse



**Abbildung 15:**

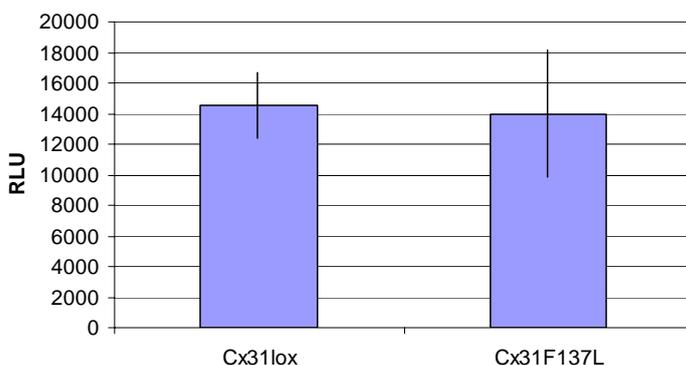
Im linken Teil der Abbildung ist exemplarisch eine fotografische Dokumentation koppelnder Zellen nach Neurobiotininjektion in eine Zelle gezeigt. In der Grafik (rechts) sind die gemittelten Anzahlen der koppelnden Zellen aufgetragen. Es ist eine Kopplungsreduktion in ES-Zellen, die die Cx31F137L Mutation exprimieren um etwa 30% zu erkennen.

### 4.3.7 ATP-Freisetzungs-Untersuchung

(in Zusammenarbeit mit Radoslaw Dobrowolski)

Die Freisetzung von ATP durch potentiell vorhandene Halbkanäle wurde ebenfalls an transient mit Cre-Rekombinase transfizierten Cx31F137L-ES-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle wurden, wie schon bei den Kopplungsuntersuchungen, stabil mit dem Cx31F137L-Zielgenvektor homolog rekombinierte Zellen der gleichen Passagenzahl eingesetzt. Hierbei ergaben sich jedoch keine Unterschiede hinsichtlich der ATP-

Freisetzung zwischen diesen beiden Zellpopulationen (Abb. 16).



**Abbildung 16:**

Die Auftragung der relativen Luciferase Einheiten (RLU) zeigt keine Unterschiede zwischen Cx31+/flox Zellen und Cx31+/F137L bei der Freisetzung von ATP in das umgebende Medium.

## 4.4 Herstellung der Cx31+/F137L Maus

### 4.4.1 Blastozysten Injektion

(in Zusammenarbeit mit Christine Siegmund und Thomas Hennek)

Die mit dem Cx31F137L-Zielgenvektor transfizierten HM1-ES-Zellen, in denen sowohl die homologe Rekombination mittels PCR und Southern-Blot nachgewiesen wurde, als auch der Karyotyp zu mehr als 90% dem „Normalzustand“ entspricht, wurden zur Blastozysteninjektion eingesetzt. Tatsächlich erfolgte die

## Ergebnisse

Bastozysteninjektion ausschließlich mit Zellen des Klons 189. Es wurden zwölf Fellfarben-chimäre Mäuse geboren, darunter ein männliches Tier, das zu 100% chimär war und nach Verpaarung mit C57BL/6 Weibchen agouti-farbenen Nachwuchs lieferte. Die Nachkommen aus dieser Verpaarung hatten den Genotyp Cx31F137L+/flox und wurden nach Erreichen der Geschlechtsreife untereinander zur Erzeugung des Genotyps Cx31F137Lflox/flox verpaart. Zeitgleich fanden Verpaarungen dieser Cx31F137L+/flox Tiere mit deleter-flp Mäusen statt, um den Genotyp Cx31F137L+/delNeo zu erzeugen. Weiterhin wurden Verpaarungen mit PGK-Cre Tieren durchgeführt, um den Genotyp Cx31+/F137L zu erhalten. Alle diese Verpaarungen waren erfolgreich und die Nachkommen wurden zu weiteren primären Analysen eingesetzt. Für alle in dieser Arbeit gezeigten Versuche wurden die Tiere noch mindestens zweimal mit C57BL/6 Tieren zurückgekreuzt, so dass ein mindestens 87,5%iger C57BL/6 Hintergrund erreicht wurde (87,5% C57BL/6; 12,5% 129SvO12).

### 4.4.2 Nomenklatur der Mauslinie und der Genotypen

Aus der Chimärenverpaarung des männlichen Tieres mit C57Bl/6 Weibchen gingen neben Wildtyp Tieren auch Nachkommen hervor, die als Cx31F137L+/flox bezeichnet worden sind, da in ihnen der komplette Zielgenvektor im Genom integriert vorlag, die Mutation jedoch noch nicht aktiv war. Tiere, die dieses Konstrukt homozygot tragen, werden folglich als Cx31F137Lflox/flox bezeichnet.

Durch Verpaarung der Cx31F137L+/flox Tiere mit deleter-Flp-Mäusen wurde eine Deletion der durch frt-Stellen flankierten Neomycinresistenzkassette erreicht. Die Nachkommen, die den rekombinierten Locus, ohne Neomycinresistenzkassette tragen, exprimieren weiterhin das Cx31 Wildtyp-Allel. Der Genotyp dieser Tiere wird als Cx31F137L+/delNEO bezeichnet. Nach Verpaarung zweier heterozygoter Tiere dieses Genotyps ergeben sich folglich unter anderem homozygote Cx31F137LdelNEO/delNEO Tiere.

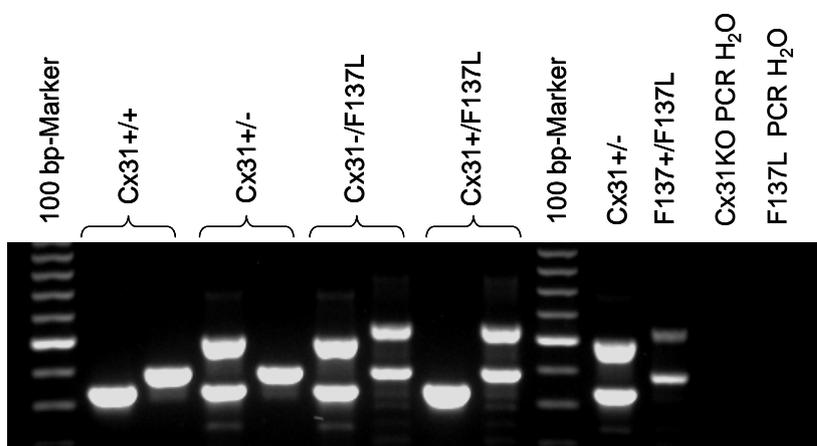
Durch Verpaarung der Cx31F137L+/flox Tiere mit PGK-Cre Tieren wurden Tiere mit dem Genotyp Cx31+/F137L erzeugt, die heterozygot die Cx31F137L Mutation exprimieren. Tiere diese Genotyps wurden untereinander verpaart. Es wurden jedoch keine Mäuse mit dem Genotyp Cx31F137L/F137L geboren.

#### 4.4.3 Untersuchungen der Embryonen aus Verpaarungen zweier Cx31+/F137L Tiere

Es wurden zwei Cx31+/F137L Tiere miteinander verpaart und die Embryonen der Tage 7.5 dpc, 8.5 dpc, 9.5 dpc, 10.5 dpc, 11.5 dpc, 12.5 dpc präpariert und eine Genotypisierung mittels PCR durchgeführt. Für die PCR-Reaktion wurden je nach Stadium entweder Teile der Amnionhülle oder des Embryos eingesetzt. Die Amnionhülle besteht ebenfalls aus embryonalem Gewebe und kann daher auch zur Genotypisierung eingesetzt werden. Am Tag 7.5 dpc konnte bisher ein Tier des Genotyps Cx31F137L/F137L nachgewiesen werden, nicht jedoch an den den darauf folgenden Tagen. Die Plazenten der Tiere ab Tag 9.5dpc wurden isoliert und zur weiteren Untersuchung zu Frau Prof. Dr. Elke Winterhager nach Essen versandt. Erste Untersuchungen zeigen eine veränderte Morphologie des Labyrinthes der Plazenten von Cx31+/F137L Embryonen. Unter den Morulae an Tage 2.5 dpc konnte bislang eine Morula mit dem Genotyp Cx31F137L/F137L nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen fanden in Kooperation mit Christian Markopoulos statt.

#### 4.4.4 Erzeugung der Cx31-/F137L Mauslinie

Um nachzuweisen, ob die frühe Sterblichkeit der Cx31F137L/F137L Mäuse an der Abwesenheit des Wildtyp Connexin31 in Kombination mit der Expression der F137L Mutation liegt oder ob ein Gendosiseffekt die entscheidende Rolle spielt, wurden die Cx31+/F137L Tiere mit Cx31-/- Tieren (erzeugt von Achim Plum, siehe Plum et al., 2002) verpaart. Es zeigte sich, dass mit der erwarteten Mendelschen Wahrscheinlichkeit auch Tiere mit dem Genotyp Cx31-/F137L geboren werden. Diese Tiere sind bisher nicht weiter charakterisiert worden.



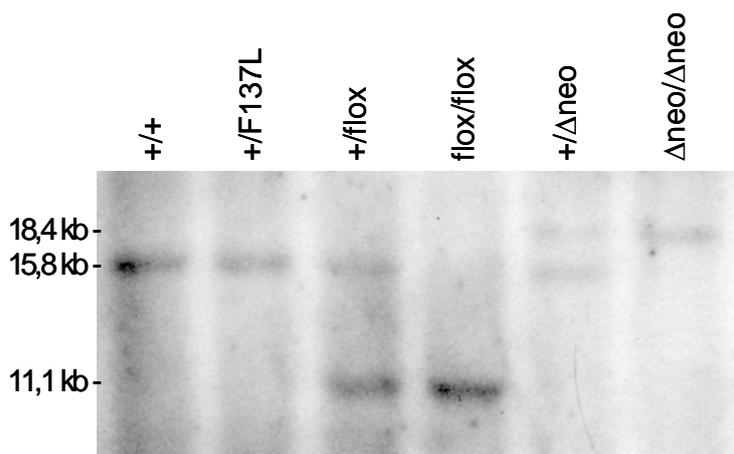
**Abbildung 17:**

Mit Hilfe der Cx31KO-PCR (jeweils linke Spur) und Cx31F137L-Maus-PCR (jeweils rechte Spur) wurden adulte Mäuse der Genotypen Cx31+/+, Cx31+/-, Cx31-/F137L, Cx31+/F137L untersucht. Damit ist nachgewiesen, dass Tiere mit dem Genotyp Cx31-/F137L lebensfähig sind. Die vier Spuren ganz rechts im Bild enthalten Positiv- (Spur 11, 12) bzw. Negativkontrollen (Spur 13, 14)

## Ergebnisse

### 4.4.5 Nachweis der Genotypen der untersuchten Mäuse

Der routinemäßige Nachweis des Genotyps der verwendeten Mäuse erfolgte durch PCR-Analysen. Dazu wurden die PCRs „Cx31F137L-Maus-PCR“ und „Cx31F137LNeo-PCR“ durchgeführt. Diese PCRs geben Aufschluss über den Genotyp der Tiere, weisen jedoch die Cx31F137L-Mutation nicht direkt nach. Zur Überprüfung des Genotyps der Tiere wurde analog zur ES-Zell-Southern Blot-Analyse eine Southern Blot Analyse mit aus den entsprechenden Tieren gewonnener DNS durchgeführt. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen waren *NdeI* und *AgeI* (siehe Abb. 12). Die Hybridisierung mit der externen Sonde ergab die in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse. Die theoretisch ermittelten Bandengrößen waren für das „Wildtyp-Allel“ (+/+) und das „Mutations-Allel“ 15,8 kb, für das „delNeo-Allel“ 18,4 kb und für das „flox-Allel“ 11,1 kb (Abb. 12). Die Hybridisierung mit der internen Sonde ergab keine weiteren Insertionen des Vektors „Cx31F137L-Zielvektor“ in andere Loci des Maus-Genoms (nicht gezeigt).



**Abbildung 18:**

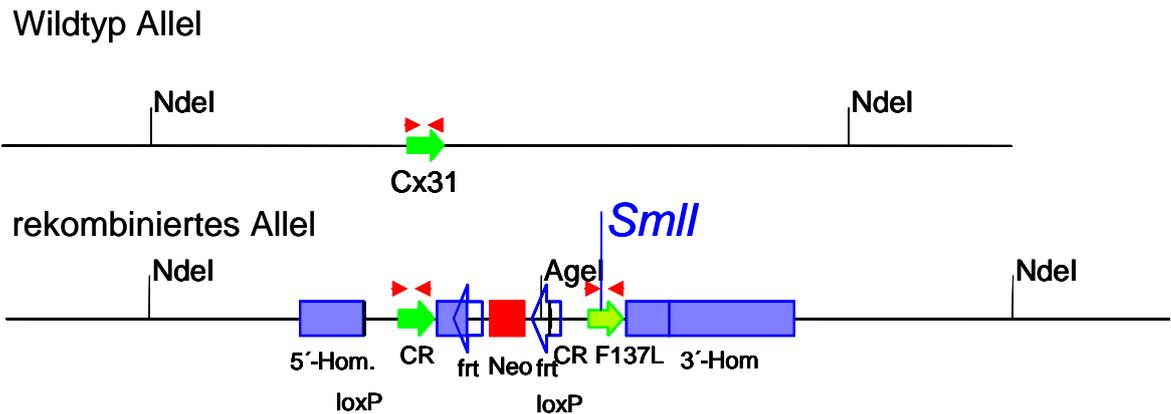
Southern Blot-Hybridisierung der unterschiedlichen Genotypen der Mäuse. Eine Restriktionsspaltung der aus Lebern gewonnenen DNS erfolgte mit *NdeI* und *AgeI*, der Nachweis mit dem DIG<sup>®</sup>-Kit der Firma Roche<sup>®</sup>. Die Banden in Höhe von 15, 8 kb entsprechen dem erwarteten Wildtyp bzw. mutierten Allel, ebenso wie bei 11,1 kb dem geflochten Allel und bei 18,4 kb dem geflochten Allel nach Deletion der Neomycinresistenzkassette durch die FLP-Rekombinase.

### 4.4.6 Nachweis der Mutation

Durch die Mutation entsteht eine zusätzliche *SmlI* Restriktionsschnittstelle. Diese macht es möglich die Mutation routinemäßig nachzuweisen. Die Anwesenheit der Mutation Cx31F137L sowohl in den Mäusen als auch in ES-Zellen oder Vektorkonstrukten wurde mittels der „Cx31CR-PCR“ gezeigt. Diese amplifiziert einen Teil der kodierenden Region des Connexin31 Gens. Im direkten Anschluss erfolgte eine Restriktionsspaltung mit dem Enzym *SmlI*. Diese Restriktionsendonuklease erkennt eine Basensequenz, die ausschließlich in der codierenden Region des Cx31F137L Allels und nicht in der Wildtyp Cx31 Region vorkommt (Abb. 19). Daher

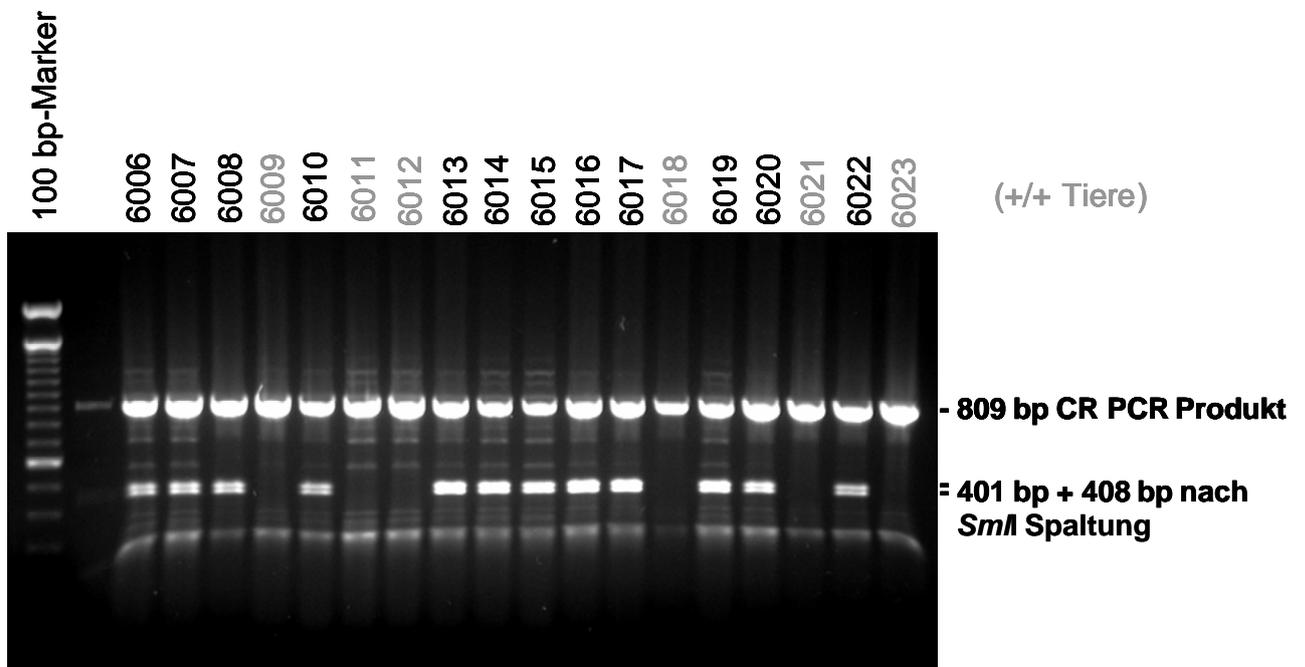
## Ergebnisse

entstehen beim Cx31 Wildtyp-Allel ein Fragment mit der Größe von 809 bp und beim Cx31F137L-Allel zwei Fragmente von 401 und 408 bp (Abb. 20). Weiterhin wurde die Mutation durch eine kommerzielle Sequenzierungsreaktion durch die Firma Agowa (Berlin) nachgewiesen. Die Sequenzierung der DNS eines heterozygoten Cx31+/F137L Tieres ergibt daher im Chromatogramm der Sequenzierung einen Doppelgipfel (Abb. 21).



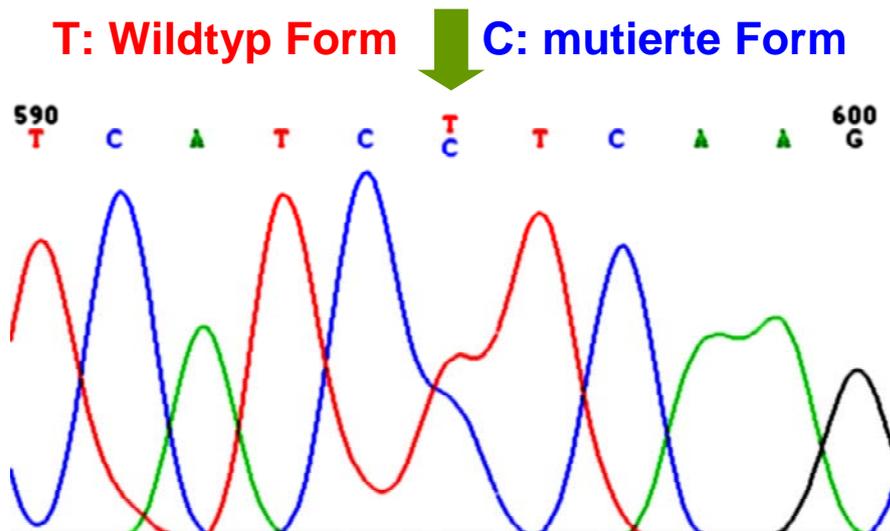
**Abbildung 19:**

Schema der PCR über die kodierende Region der Connexin31 mit anschließender *SmlI*-Spaltung zum Nachweis der Punktmutation auf DNA Ebene. Die roten Pfeile geben die Position der in der PCR verwendeten Primer an. Durch die zusätzlich vorhandene *SmlI* Erkennungsstelle in den resultierenden PCR Produkten kann die F137L Mutation in der Cx31 kodierenden Region nachgewiesen werden.



**Abbildung 20:**

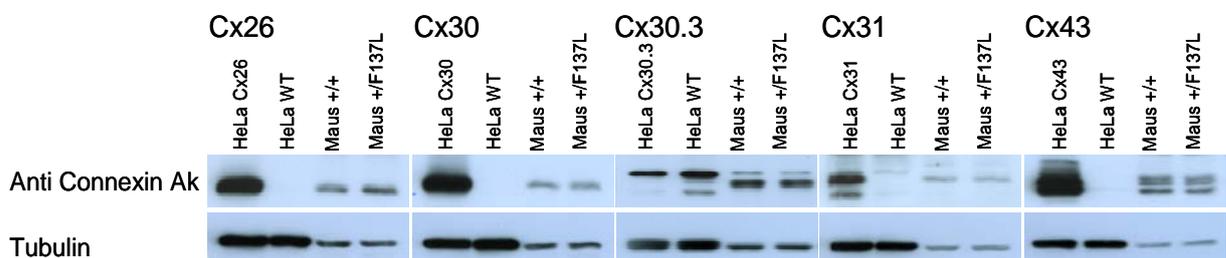
Nachweis der Punktmutation F137L mittels PCR über die kodierende Region und anschließender *SmlI*-Spaltung. Die Doppelbande bei etwa 400 Basenpaaren zeigt das Vorhandensein der Punktmutation an. Fehlt diese Doppelbande, ist ausschließlich die Wildtyp Cx31 kodierende Region vorhanden (PCR Fragment von 809bp).



**Abbildung 21:** Chromatogramm der Sequenzierung eines Ausschnitts der Cx31 kodierenden Region. Das Vorhandensein von T und C an Position 595 weist eine Wildtyp Form (T) ebenso wie die mutierte Form (C) der Connexin31 kodierenden Region nach. Dieser Austausch verursacht die Mutation Cx31F137L.

#### 4.4.7 Proteinmenge der Connexine in der Epidermis der Cx31+/F137L-Mäuse

Der Immunoblot mit Antikörpern gegen verschiedene Connexine (Abb. 22) zeigt, dass im Proteinlysat der adulten Haut der Cx31F137L Maus sehr ähnliche Proteinmengen dieser Connexine vorhanden sind, ähnlich wie in der Wildtyp Maus. Die erkennbaren graduellen Unterschiede sind nicht signifikant, da weitere Wiederholungen dieses Experiments ergaben, dass insgesamt ein nahezu unverändertes Expressionsniveau der Connexine Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx43 besteht. Die Connexin31 Antikörper erkennen sowohl das Wildtyp als auch das mutierte Protein, so dass eine Unterscheidung dieser beiden Formen des Connexins nicht möglich ist. Das Gesamtexpressionsniveau des Connexin31 Proteins ist jedoch nicht verändert. Der Abgleich der Proteinmenge erfolgte über photometrische Messung der Gesamtproteinmenge und Tubulinabgleich (Abb. 22).



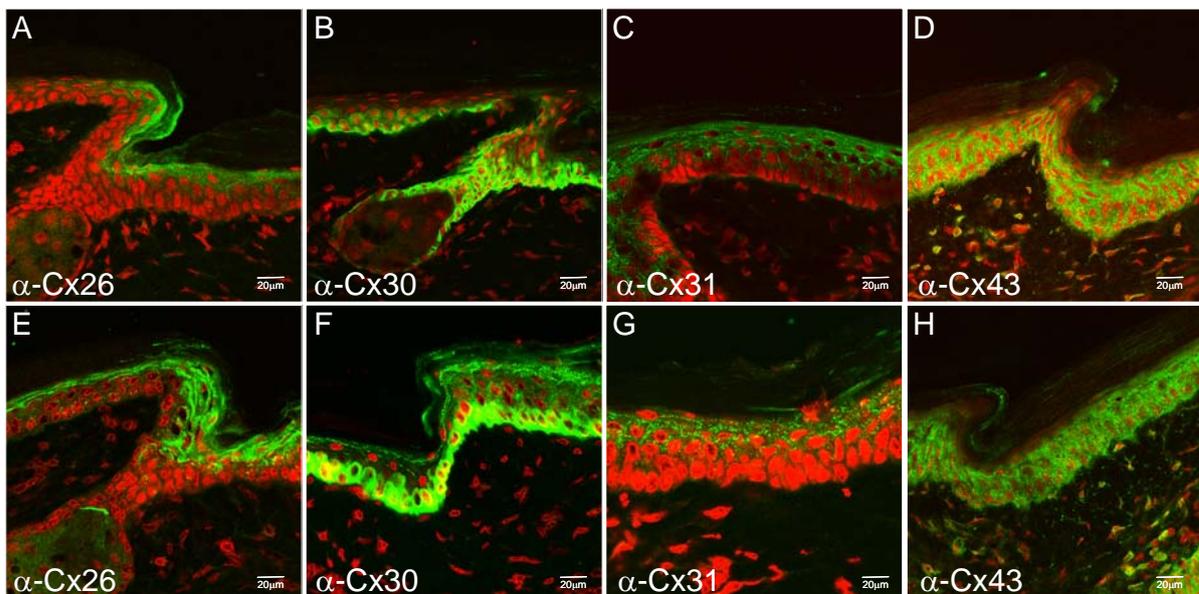
**Abbildung 22:**

Nachweis der Proteinmenge im Immuno Blot aus Hautlysaten. Die Proteinmengen von Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31 und Cx43 unterscheiden sich in Mäusen des Genotyps Cx31+/+ nicht von Mäusen des Genotyps Cx31+/F137L. Als endogenes Vergleichsprotein wurde Tubulin verwendet. Als Kontrolle wurden untransfizierte HeLa Zellen, die keine Connexine exprimieren und HeLa Zellen, die mit dem entsprechenden Connexin transfiziert wurden eingesetzt.

## Ergebnisse

### 4.4.8 Immunfluoreszenzanalyse verschiedener Connexine in der Mausepidermis

Die Verteilungsmuster und Expressionsniveaus der Connexine 26, 30, 31 und 43 in adulter Maushaut wurden mittels Immunfluoreszenzanalysen an Gefrierdünnschnitten untersucht (Abb. 23). Eine Untersuchung der anderen in der Haut exprimierten Connexine (Cx30.3, 31.1, 37, 40) ist bisher nicht möglich, da keine Antikörper verfügbar sind, die in der untersuchten Schwanzhaut spezifisch reagieren. Bei der Betrachtung der Expression des Connexin31 ist zu beachten, dass die Antikörper sowohl die Wildtyp als auch die mutierte Form des Cx31-Proteins erkennen. Daher ist gleichzeitig nachgewiesen, dass die Mutation nicht zu einem veränderten Transport des Cx31 Proteins führt, da sowohl die zelluläre als auch die Verteilung der Signale hinsichtlich der Schichtung der Epidermis im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle unverändert ist (Abb. 23G).



**Abbildung 23:**

Expression und Verteilung der Connexine in der Epidermis von Wildtyp Tieren (obere Reihe [A bis D]) und im Vergleich dazu in Epidermis von Tieren des Genotyps Cx31+/F137L (untere Reihe [E bis H]). Die Immunfluoreszenzen wurden mit primären Antikörpern gegen Cx26 (a und E), Cx30 (B und F), Cx31 (C und G) und Cx43 (D und H) und mit Alexa488 gekoppelten Sekundärantikörpern (grün) durchgeführt. Die Kerne sind mit Propidiumiodid angefärbt (rot).

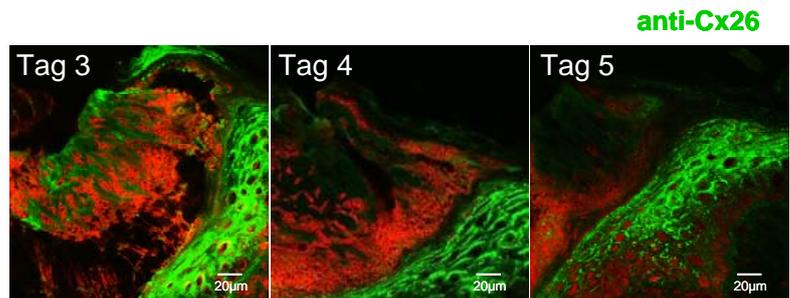
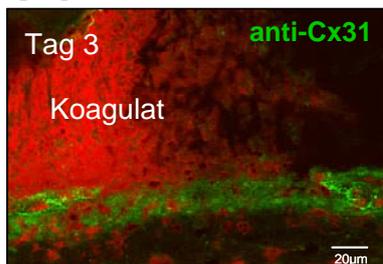
### 4.4.9 Schnellere Wundheilung bei Schnittwunden der Schwanzhaut von Cx31+/F137L Tieren

Zur Untersuchung der Wundheilung wurden Schnittwunden durch Epidermis und Dermis des Schwanzes adulter Mäuse gesetzt und der Heilungsprozess nach einem bis fünf Tagen verfolgt. Die Untersuchung des Heilungsprozesses der Schnittwunden

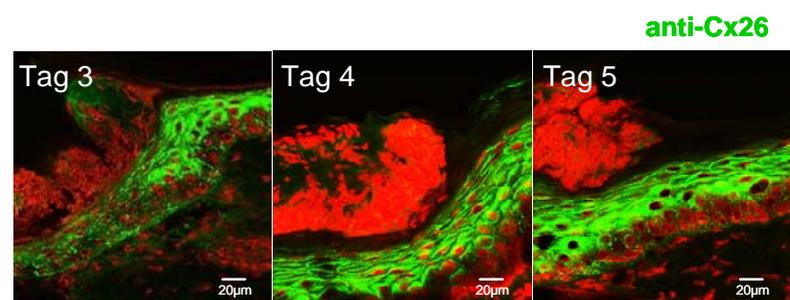
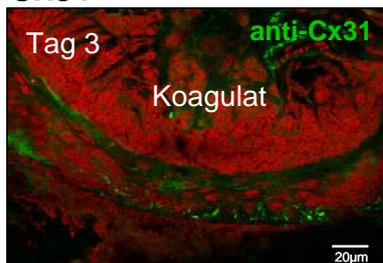
## Ergebnisse

zeigte bei Cx31+/F137L Tieren im Vergleich zu Wildtyp Tieren eine um etwa einen Tag beschleunigte Wundheilung. Am Tag drei nach Wundsetzung ist bei der Cx31F137L Maus bereits eine Mehrschichtigkeit der Epidermis erkennbar (Abb. 24), während dies in Wildtyp-Kontrolltieren nicht der Fall ist. In Schnittwunden der Schwanzhaut von Cx31+/F137L Tieren am Tag 3 nach Wundsetzung sind bereits klar einzelne Zellen und ihre Kerne auszumachen. Eine Mehrschichtigkeit der verheilenden Epidermis mit klar erkennbaren Zellgrenzen und Kernen tritt in Wildtyp-Tieren erst am Tag 4 auf.

### Cx31<sup>+/+</sup>



### Cx31<sup>+/F137L</sup>



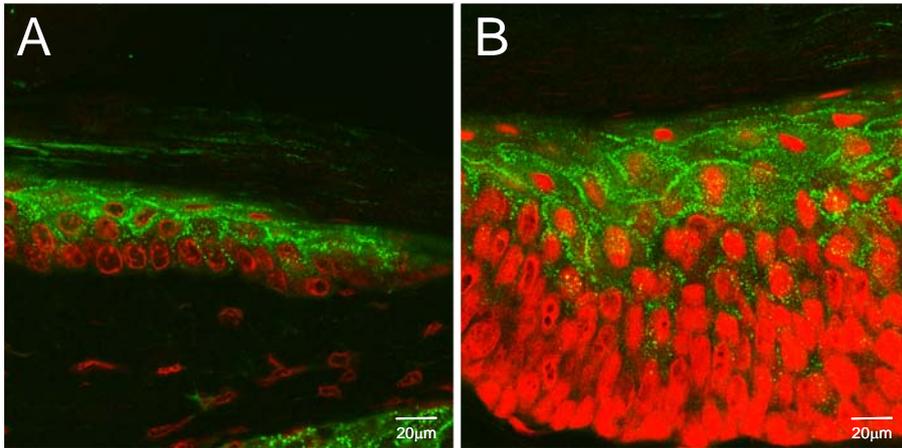
### Abbildung 24:

Immunfluoreszenzfärbung von Cx31 (linke Abbildungen) und Cx26 (rechte Abbildungen) mit jeweils einem Alexa488 gekoppeltem Sekundärantikörper (grün) an Gefrierschnittpräparaten von Schwanzschnittwunden an Tag 3, bzw. an Tag 3 bis 5 und Cx31<sup>+/+</sup> (oben) und Cx31<sup>+/F137L</sup> Tieren (unten). Die Propidiumjodid Kernfärbung (rot) färbt ebenfalls den Wundpfropf an.

### 4.4.10 Akanthose

In etwa 5% der untersuchten Schwanzhaut bei Cx31<sup>+/F137L</sup> Tieren zeigte sich eine Mehrschichtigkeit der Stachelzellschicht (Akanthose), die in Wildtyp Tieren nicht beobachtet werden konnte. Dazu wurde jeweils eine Gesamtlänge der Hautschnitte von ca. 50 Zentimetern (in Stücken von je 10 bis 12 mm) untersucht. Es wurde auf ca. 2,5 cm der Cx31<sup>+/F137L</sup> Haut eine Verdickung festgestellt (Abb. 25).

## Ergebnisse



### Abbildung 25:

In A ist die normale Dicke der Schwanzhaut der Wildtyp-Mäuse zu sehen, wohingegen die Schwanzhaut bei Cx31+/F137L Mäusen (B) in manchen Regionen deutlich verdickt ist. Immunfluoreszenz mit einem Primärantikörper gegen Cx31 und einem Alexa488 gekoppeltem Sekundärantikörper (grün), Propidiumjodid-Kernfärbung (rot).

## **5 Diskussion**

### **5.1 Generelle Ausgangssituation bei der Erzeugung eines Mausmodells für EKV**

Die Erzeugung eines Mausmodells für EKV birgt einige Probleme, so zum Beispiel, dass das humane und das Maus Connexin31 zwar eine sehr hohe Sequenzidentität (von etwa 83% sowohl bei Protein-, als auch DNS-Sequenz) auszeichnet, aber diese Proteine, und damit auch die möglichen Bindungstellen für Interaktionspartner und ihre Funktion nicht vollständig vergleichbar sind. Daraus ergibt sich wiederum die Frage, ob man in einem Mausmodell die spezie fremde, aber für die Erkrankung „normale“ humane Form wählt oder die „humane“ Mutation in das Maus Cx31 Gen einbringt. Da nicht auszuschließen ist, dass schon das Einbringen der humanen Sequenz in das Mausgenom zu Veränderungen führt, haben wir uns zur Veränderung der Mausequenz entschlossen.

Es gibt einige weitere Punkte, die ein Mausmodell nur bedingt auf einen Menschen übertragbar machen. Mäuse haben ein Fell, so dass potentiell auftretende Hyperkeratosen oder rote Plaques eventuell nicht erkannt werden könnten. Um dies zu umgehen stellen könnten die Experimente mit Nacktmäusen durchgeführt werden, allerdings wurde in früheren Publikationen von Nacktmauslinien von spontanen Hyperkeratosen berichtet. Mechanische (Rasieren) oder chemische (Enthaarungcreme) Enthaarung kann zu Stress der Haut führen, was wiederum eine veränderte Connexin-Expression zur Folge hat (Dr. Markus Kretz, persönliche Mitteilung). Berücksichtigt werden muss weiterhin, dass EKV bei menschlichen Patienten sporadisch auftritt und teilweise erst nach einigen Jahren (Richard, 2005), so dass die Lebensdauer der Mäuse von bis zu zwei Jahren eventuell nicht ausreicht, um die Symptome der Erkrankung sichtbar werden zu lassen. Die Verteilung des Connexin31 in der Haut von Mensch und Maus sind sowohl in gesunder, als auch durch Schnittwunden verletzter Haut, ähnlich (Richard et al., 2003). Die anderen in der Haut vorkommenden Connexine sind jedoch unterschiedlich verteilt, so dass durch potentielle Interaktionen mit diesen anderen Connexinen andere Effekte zustande kommen können (Richard et al., 2003), die im Menschen so nicht zu beobachten wären, da eine andere Verteilung der Connexine auf die Hautschichten vorliegt. Demnach könnte ein im Menschen postulierter transdominant-negativer Effekt in der Maus nicht reproduzierbar sein.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Erzeugung einer Cx31F137L transgenen Maus war von Anfang an durch die Arbeiten von Dr. Achim Plum (Plum et al., 2002) bekannt, da die Ausschaltung des Connexin31 Gens zu Mäusen mit einer abnormalen Plazenta führt. Bei der Planung der durchgeführten Arbeiten wurde daher ein konditionaler Ansatz gewählt, um die Möglichkeit eines letalen Phänotyps auszuschließen. Dies stellt einen weiteren Unterschied in der Expression des Connexin31 im Menschen und in der Maus dar, da in der menschlichen Plazenta kein Connexin31 nachweisbar ist (Plum et al., 2002; Prof. Dr. Elke Winterhager, persönliche Mitteilung).

### **5.2 Untersuchung der Cx31F137L Mutation in HeLa Zellen**

Zur genaueren Untersuchung der Kanaleigenschaften der aus Cx31F137L bestehenden Gap Junction-Kanälen wurden Säugerzell-Expressions-Vektoren hergestellt. Es sollten die homomeren, homotypischen Kanäle aus Cx31WT mit denen aus Cx31F137L verglichen werden, ebenso waren Doppeltransfektionen von Cx31WT mit Cx31F137L vorgesehen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Expressionsvektoren konstruiert, um die entsprechenden Proteine in HeLa Zellen zu exprimieren. Die beiden Varianten des Connexin31 Proteins sollten teilweise durch Anhängen von V5- (Invitrogen®) oder His<sub>6</sub>-Sequenzen so markiert werden, dass sie mit entsprechenden kommerziell erhältlichen Antikörpern detektiert werden können. Dies ermöglicht die Unterscheidung der Cx31 und der Cx31F137L Form in diesem Modellsystem, da sonst eine Unterscheidung auf Proteinebene nicht möglich ist. Um nachzuweisen, dass die Markersequenzen an diesen Proteinen nicht zu unterschiedlichen Kanaleigenschaften im Vergleich zum unmarkierten Connexin Protein führen, sollten beide Varianten mit beiden unterschiedlichen Markern und auch ohne Marker verwendet werden. Bei den verwendeten Vektoren ist zu beachten, dass die Expression des Connexins durch einen sehr starken Promoter geregelt wird, was dazu führen kann, dass das Protein Expressionsniveau weit höher als im nativen System ist. Es zeigte sich, dass die Cx31F137L Mutation für HeLa Zellen toxisch zu sein scheint, da, sobald die Mutation in die Zellen eingebracht wurde starben diese unabhängig vom Marker ab (Tab. 5). Dieser Effekt wurde unmittelbar nach den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen von He et al., 2005 beschrieben und deckt sich mit den Ergebnissen, die für die Cx31G12R Mutation beschrieben wurden (Diestel et al., 2003). HeLa Zellen besitzen keine endogenen

## Diskussion

Connexine, so dass ein Effekt der Mutationen auf diese nicht die Ursache für den Tod der Zellen sein kann. Möglich ist die Ausbildung konstitutiv offener Halbkanäle, die die Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten der Zellen zum umgebenden Medium unmöglich macht und damit die Überlebensfähigkeit minimiert. Widersprüchliche Angaben gibt es bezüglich des Transportes der Connexin-Moleküle zur Membran. Einige Autoren (z.B. Richard et al., 2002, Common et al., 2002) propagieren eine Transportdefizienz, so dass die mutierten Connexin-Moleküle die Zelloberfläche eventuell gar nicht erreichen. Außerdem sind bei Untersuchungen der selben Mutationen in unterschiedlichen Zelltypen unterschiedliche Transportverhalten beschrieben worden. So beschreiben Di et al., 2002 in NEB1 Zellen (Keratinocyten ähnliche Zellen) einen Transport der mutierten Proteine (66delD) zur Plasmamembran, der von He et al., 2005 in HeLa Zellen nicht gezeigt werden konnte. In diesem Fall ist zu beachten, das NEB1 Zellen endogen Connexine exprimieren, die den Transport und die Funktion der mutierten Proteine beeinflussen und durch diese beeinflusst werden könnten. Die Transfektionsmethoden unterschieden sich ebenfalls in allen diesen Studien. So wurde ausschließlich von Diestel et al., 2003 ein induzierbarer Vektor mittels Kalziumphosphatpräzipitation in die Zellen gebracht, wohingegen Di et al., 2002 die Vektoren mittels Mikroinjektion in die Zellen brachten und He et al., 2005 verwendeten zur Transfektion der Zellen Lipofectamin 2000. Die verwendeten Vektoren und Promotoren unterschieden sich ebenfalls. Demnach sind die Ergebnisse nicht miteinander vergleichbar, obwohl zum Teil die selben Mutationen untersucht wurden. Eine wirklich plausible Erklärung für das Absterben der Zellen, die eine mutierte Version eines Connexins enthalten, gibt es demnach bisher nicht. Weiterhin ist nicht geklärt, ob die Überexpression im Zellkultursystem diesen tödlichen Effekt hervorruft, der unter Kontrolle des endogenen Promoters im nativen System überhaupt keine Rolle spielt. Eine Möglichkeit, die Letalität der HeLa-Zellen zu umgehen, ist die Verwendung eines induzierbaren Systems, in dem erst durch Zugabe von z.B. Doxycylin eine Transkription des mutierten Cx31 erreicht wird. Eine Weiterentwicklung dieses Systems ist ein umschlossenes Doxycylin, das durch UV Bestrahlung freigesetzt wird (Sydney et al., 2005), so dass eine zeitliche und räumliche Kontrolle der Expression des mutierten Connexins erfolgen kann.

### **5.3 Konstruktion des Vektors zur homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen**

Bei der Konstruktion des Vektors zur Erzeugung einer transgenen Cx31F137L Maus waren verschiedene Aspekte zu beachten. Beispielsweise soll in diesem System eine Punktmutation und deren Auswirkungen im Organismus der Maus untersucht werden. Diese Punktmutation führt zu einem Cx31 Protein, in dem eine einzige Aminosäure im Vergleich zur Wildtyp-Variante des Cx31 Proteins verändert ist. Diese Veränderung ist auf Protein Ebene mit Routinemethoden, wegen mangelnder Verfügbarkeit spezifischer Antikörper, nicht nachweisbar. Eine Möglichkeit, eine solche Veränderung nachzuweisen, wäre ein Antikörper, der genau an die veränderte Region bindet. Da die Cx31F137L Mutation jedoch innerhalb der Membran liegt und für die Herstellung von Antikörpern generell extra- oder intrazelluläre liegende Aminosäure-Sequenzen verwendet werden, ist diese Möglichkeit hier ausgeschlossen. Eine weitere Möglichkeit, das mutierte Protein vom Wildtyp Protein unterscheiden zu können, ist die Verwendung eines Markerproteins, das entweder N-terminal oder C-terminal angehängt werden kann. Gängige Markerproteine können entweder durch ihre Fluoreszenz (z.B. eGFP, eYFP, ...) oder mittels Antikörpern (V5, poly-His, ...) nachgewiesen werden. Alle diese Markerproteine bedingen allerdings eine Veränderung der Sequenz der kodierenden Region des Connexins. Damit verbunden sind potentiell veränderte Sekundärstrukturen und veränderte Zugänglichkeiten bestimmter Domänen für Interaktionspartner. Daher wurde dieser Ansatz verworfen. Das Anknüpfen eines Markerproteins führt immer zu Veränderungen, die Auswirkungen auf das zu untersuchende Protein im Gesamtkontext haben könnten. Eine Unterscheidung der Wildtyp und Cx31F137L kodierenden Region auf genetischer Ebene ist relativ leicht möglich, da eine zusätzliche *Sml* Erkennungsstelle in der Cx31F137L Version auftritt, die mittels PCR und anschließender Restriktionsspaltung sowohl auf Zellkultur- wie auch auf Mausebene nachgewiesen werden kann. Da also die Nachteile bei Einbringen eines Markerproteins überwiegen, wurde zugunsten der Gesamtaussage von Anfang an bewusst auf die Möglichkeit der Unterscheidung der beiden Versionen des Cx31 Proteins verzichtet. So war sichergestellt, dass die beobachteten Effekte auch tatsächlich auf die zu untersuchende Veränderung in Cx31 zurückzuführen sind. Auch das Einbringen eines Reportergens könnte zu ähnlichen Schwierigkeiten führen, da zwar nicht das zu untersuchende Protein direkt

## Diskussion

verändert würde, jedoch der genetische Locus. Dies könnte dazu führen, dass genregulatorische Effekte nicht mehr oder anders ablaufen, als das im Wildtyp-Locus der Fall wäre. Solche Effekte wurden bereits im Zusammenhang mit Resistenzkassetten und ihren starken Promotoren nachgewiesen.

Da ein konditionaler Ansatz gewählt wurde, kommen weitere Fragen auf. Bei allen Vorzügen ergibt sich jedoch der Nachteil, dass eine loxP-Erkennungsstelle im Genom zurückbleibt. Diese loxP-Erkennungsstelle könnte Promotoren oder andere regulatorische Sequenzen zerstören oder zumindest verändern. Da dies aber dem Ziel, das veränderte Cx31 Gen unter möglichst nativen Bedingungen zu exprimieren, abträglich wäre, wurde die Positionierung der verbleibenden loxP Erkennungsstelle sehr genau geplant. Achim Plum hat in seiner Dissertation (2000) Promoterbindungsanalysen durchgeführt und nachgewiesen, dass das Einfügen oder Weglassen bestimmter Regionen stromaufwärts des Connexin31 Gens zu keinerlei Veränderungen der Expressionsstärke führte. Diese Ergebnisse wurden berücksichtigt und die loxP-Erkennungsstelle so positioniert, dass eine Veränderung der Promoteraktivität nach bisherigen Erkenntnissen ausgeschlossen ist. Die Neomycinresistenzkassette ist durch frt-Erkennungsstellen flankiert, so dass ein Entfernen dieser Region mittels der Flp-Rekombinase möglich ist. Da sich die komplette Region, inklusive der frt-Erkennungssequenzen, innerhalb der loxP flankierten Region befindet, ist die Position dieser Elemente nicht kritisch, da sie bei einer Cre-vermittelten Deletion komplett entfernt werden.

Um homologe Rekombination zu erreichen, ist es erforderlich, möglichst große homologe Bereiche in den Vektor zu integrieren. Dennoch war die Größe dieser Homologien begrenzt, da im vorliegenden Fall am 5'-homologen Bereich eine PCR-Reaktion etabliert werden musste um die homologe Rekombination nachzuweisen und die Länge des 3'-homologen Bereichs auch aufgrund der zu verwendenden Restriktionserkennungsstellen und der Gesamtgröße des Vektors limitiert war. Die Mutation wurde mittels positionsgerichteter Mutagenese in die Wildtyp kodierende Region eingebracht. Alle anderen Zwischenschritte zur Erstellung des Vektors erfolgten über Restriktionen und Ligationen. Der Nachweis der Mutation erfolgte mittels PCR und anschließender *Sml* vermittelter Restriktion (s.o), oder durch Sequenzierung. Bevor eine Sequenzierung des Zielgenvektors vorgenommen wurde, wurde die Funktionstüchtigkeit der frt und loxP Erkennungssequenzen in *E.coli* überprüft und der gesamte Vektor mittels einiger Kontrollspaltungen charakterisiert.

## Diskussion

Die folgenden Ergebnisse rechtfertigten den konditionalen Ansatz, da homozygote Cx31F137L/F137L Mäuse in der frühen Embryonalentwicklung sterben (siehe 4.4.3).

### 5.4 Charakterisierung der Cx31+/F137L ES-Zellen

Die homolog rekombinierten embryonalen HM1 Stammzellen bieten nicht nur die Möglichkeit, in „gefloxtem“ Zustand in Blastozysten injiziert zu werden, sondern sie können bereits zur Charakterisierung *in vitro* herangezogen werden. Dazu zählt beispielsweise die transiente Transfektion mit einem Expressionsvektor für die Cre-Rekombinase. Ebenfalls wurde eine Transduktion des Cre-Proteins (in Zusammenarbeit mit PD. Dr. Frank Edenhofer) durchgeführt, was zu identischen Ergebnissen bei einer geringeren Belastung der Zellen führte, da keine Elektroporation durchgeführt werden musste. Eine erfolgreiche Cre-vermittelte genomische Rekombination führt zu Zellen mit einem Cx31 und einem mutierten Allel. Beide Formen des Cx31 Gens stehen, im Gegensatz zur Überexpression in HeLa-Zellen, unter dem endogenen Promoter und die Verteilung und Regulation aller anderen Moleküle in diesen Zellen sollte unverändert sein. In HM1 ES Zellen sind ebenfalls Connexin43 und Connexin45 exprimiert (eigene Ergebnisse in Kooperation mit Dr. Stephan Maxeiner, siehe auch 4.3.6 und 4.6.7). Beim Vergleich der Connexin-Kanäle fällt auf, dass die Cx31 Kanäle eine sehr geringe Farbstoffkopplung aufweisen (Diestel et al., 2002) und dass sowohl Cx43 als auch Cx45 Kanäle deutlich besser für die Indikatormoleküle Neurobiotin und Luzifer Yellow durchlässig sind (Dissertation Dr. Claudia Elfgang, 1995). Das humane Cx31 scheint heterotypische Kanäle mit Cx26, Cx30, Cx32 und Cx45 auszubilden (Abrams et al., 2006). Wenn durch die Mutation die kompletten Cx31 Kanäle für Neurobiotin undurchlässig würden, wäre der Effekt der Gesamtkopplungsreduktion, wie er in den Versuchen dieser Arbeit beobachtet wurde, immer noch nicht erklärbar, da der Kopplungsanteil der Cx31 Kanäle sehr gering zu sein scheint. Demnach muss man davon ausgehen, dass die Cx31F137L Mutation auf andere Connexin Isoformen, vermutlich auf mindestens eines der außerdem in ES Zellen ausgeprägten Connexine (Cx43 oder Cx45) transdominant-negativ wirkt. Ob auch ein dominant negativer Effekt der mutierten Form des Connexin31 auf die Wildtyp Form des Cx31 eine Rolle spielt, wäre durch direkten Vergleich mit Cx31+/- ES Zellen möglich. Die Cx31-Defizienz-Mäuse wurden jedoch mit einer anderen ES-Zell-Linie erzeugt, so dass ein Vergleich der Eigenschaften nicht sinnvoll ist.

## Diskussion

Die Lokalisation des mutierten Cx31 sowie des Wildtyp Connexin31 ist aufgrund der geringen Größe der HM1 ES- Zellen nicht ohne weiteres zu untersuchen, scheint jedoch unverändert zu sein. Es wäre eine subzelluläre Fraktionierung denkbar, um so Aufschluss darüber zu erhalten, in welchen Fraktionen die mutierten und Wildtyp Connexine vorliegen. An der intrazellulären Lokalisation von Cx43 und Cx45 konnten keine Veränderungen beobachtet werden (siehe 4.4.8). Es sind weitergehende Untersuchungen der Einzelkanäle und potentieller heteromerer und heterotypischer Kanäle nötig, um diesbezüglich konkrete Aussagen machen zu können. Es wäre möglich, die Kanaleigenschaften dieser Connexine in Kombination mit Cx31F137L Kanälen in *Xenopus* Oozyten zu untersuchen, allerdings unter der Voraussetzung, dass die *Xenopus* Oozyten die Expression der Cx31F137L Kanäle überleben. Ebenso könnte man ES Zellen verwenden, die entweder kein Wildtyp Cx31 oder aber kein Cx43 oder Cx45 mehr exprimieren. Dies wäre durch Erzeugung von homozygoten KO-ES Zellen möglich, oder aber durch Isolierung eben dieser ES Zellen aus Blastozysten. Eine weitere Möglichkeit wäre die Herabregulation der Cx43 und/oder Cx45 mittels siRNS, (Phillip Wörsdörfer, laufende Dr.-Arbeit). Anschließend müssten dann ebenfalls Kopplungsanalysen durchgeführt werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch, ob die ATP Freisetzung dieser Zellen verändert ist. Wie oben beschrieben sterben HeLa Zellen, sobald sie die Cx31F137L Mutation exprimieren. Ob Apoptose oder Nekrose dafür verantwortlich ist, könnte über ein kommerzielles Apoptose-Kit nachgewiesen werden. Ebenso ist eine FACS-Sortierung und damit auch eine Quantifizierung der absterbenden Zellen möglich. Die Überexpression durch den starken CMV-Promoter könnte dazu führen, dass sich offene Connexin-Halbkanäle bilden und dadurch die Homöostase der Zellen gestört wird. Da aber die HeLa Zellen nicht diesbezüglich untersucht werden konnten, wurden in dieser Arbeit ATP-Freisetzungsuntersuchungen an Cx31+/F137L HM1 Zellen durchgeführt. Eine verstärkte Freisetzung von ATP und der indirekte Nachweis dieses ATPs im Medium über die Aktivität der Luziferase sollte Aufschluss darüber geben, ob in den Cx31+/F137L ES-Zellen verstärkt Halbkanäle ausgebildet werden. Da keinerlei Unterschiede der Wildtyp ES Zellen zu den Cx31+/F137L ES Zellen gefunden wurden, ist davon auszugehen, dass die Mutation nicht zu einer verstärkten Bildung von offenen Halbkanälen führt. Diese Ergebnisse lassen jedoch keine Schlüsse für das HeLa-System zu und beantworten auch nicht die Frage, ob in embryonalen Stammzellen Halbkanäle vorhanden sind.

### 5.5 Die Cx31+/F137L Maus

Die Cx31+/F137L Mäuse zeigten makroskopisch keine Auffälligkeiten und wurden in der erwarteten Mendelschen Häufigkeit geboren. Auffällig ist jedoch, dass aus Verpaarungen zweier Cx31+/F137L Mäuse keine Cx31F137L/F137L Tiere geboren werden (siehe 4.4.3). Da der Todeszeitpunkt dieser Tiere zwischen Tag 7.5 dpc und Tag 8.5 dpc liegt, und der Embryo in diesem Zeitraum noch ausschließlich über Diffusion ernährt wird, könnte ein Plazentadeffekt nicht die Ursache für das frühe Absterben der Tiere sein., Eine Entwicklungsstörung der Plazenta könnte allerdings die weitere Entwicklung des Embryos unterbinden, auch wenn sich die Plazenta zu diesem Zeitpunkt erst ausbildet und vor Tag 9.5 dpc die Versorgungsfunktion des Embryos nicht übernimmt (Prof. Elke Winterhager, persönliche Mitteilung). Cx31KO Tiere werden mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit geboren, da sie einen Defekt im Labyrinth der Plazenta aufweisen (Plum et al., 2002). Demnach hat die geringere Geburtswahrscheinlichkeit der Cx31-/- Tiere vermutlich eine andere Ursache.

Beispielsweise könnten heteromere oder heterotypische Kanäle aus Connexin31 in Kombination mit einem andern Connexin eine wichtige Rolle in der Regulation der Embryonalentwicklung spielen. Falls das an dieser Interaktion beteiligte Protein die Funktion auch allein, jedoch eingeschränkt erfüllen könnte, dann wäre das eine mögliche Erklärung dafür, dass Cx31-/- Mäuse (wenn auch mit einer etwas verringerten Häufigkeit) geboren werden, Cx31F137L/F137L Mäuse jedoch nicht. Das veränderte Cx31 Protein könnte dazu führen, dass die Funktion eben dieses Interaktionspartners unterbunden oder verändert wird. Dass Cx31 in der frühen Embryonalentwicklung eine Rolle spielt, ist schon daraus ersichtlich, dass HM1 ES Zellen Cx31 exprimieren und die Mutation bereits in ES Zellen zu einer sehr deutlichen Kopplungsreduktion führt. Außerdem wurde Cx31 bereits im Acht-Zell-Stadium nachgewiesen (Plum et al., 2002). Ein Effekt der Cx31 F137L Mutation in der Plazenta ist dennoch nicht ausgeschlossen, da kein Effekt auf die Überlebenschancen der Cx31+/F137L Tiere gefunden wurde. Zu weiteren Untersuchungen wurden Frau Prof. Winterhager Plazenten der Stadien 9.5 bis 16.5 übersandt, um eventuelle Effekte zu untersuchen. Erste Ergebnisse deuten ebenfalls, wie bei den Cx31KO Tieren, auf eine Veränderung des Labyrinthes der Plazenta hin. Außerdem scheinen Cx31+/F137L Tiere während der Embryonalentwicklung zwischenzeitlich kleiner und leichter zu sein. Dieser Effekt scheint allerdings bis zur Geburt wieder kompensiert zu werden. Die

## Diskussion

Plazentagewichte der Cx31+/+ und Cx31+/F137L Tiere unterscheiden sich bisher nicht (Diplomarbeit von Christian Markopoulos und Prof. Dr. Elke Winterhager, persönliche Mitteilung)

### 5.6 Akanthose

Die Untersuchung der Haut ergab auf den ersten Blick keinerlei offensichtliche Unterschiede zwischen Cx31+/F137L und Wildtyp Tieren. Besonders wurde auf offensichtliche Veränderungen des Fells oder auf rote Flecken bei neonatalen und adulten Tieren geachtet, die durch das Fell zu erkennen gewesen sein könnten. Auch der Schwanz und die Fußsohlen der Tiere, als besonders beanspruchte Hautregionen, zeigten keinerlei Veränderungen. Diese Ergebnisse schienen anfänglich gut in den Gesamtzusammenhang zu passen, dass das Ausschalten eines einzelnen Connexins zu keinen offensichtlichen Hautveränderungen führt (Willecke et al., 2002; Kretz et al., 2004, eigene Ergebnisse zusammen mit Dr. Zheng-Fischhöfer). Bei der Betrachtung von Gefrierschnitten der Schwanzhaut fiel jedoch auf, dass auf einer insgesamt betrachteten Hautlänge von etwa 50 Zentimetern bei 10 Mäusen in etwa 2,5 Zentimetern eine deutliche Verdickung der Stachelzellschicht auftrat, die in 10 Wildtyp Mäusen nicht zu finden war. Die untersuchten Epidermisquerschnitte waren etwa 10 bis 12 Millimeter lang. Offensichtlich tritt in etwa 5% der Schwanzhaut eine Verdickung der Schwanzepidermis auf. Diese Erkenntnis deckt sich mit dem menschlichen Phänotyp, da auch im Menschen sporadisch auftretende und vor allem klar abgegrenzte Regionen verdickter Epidermis beschrieben wurden (Richard et al., 2002). Entgegen der bisher vor allem beobachteten Hyperkeratose (übermäßige Verhornung der oberen Zellschichten) scheint ausschließlich eine Akanthose (Verdickung der Stachelzellschicht) vorzuliegen. Humane Akanthosen wurden als eine Verschiebung der „normalen“ Zellstruktur der Haut in Richtung junger, „unreifer“ Epidermiszellen beschrieben, die sowohl durch verstärkte Zellteilung (Proliferation) oder durch verzögerte Zellreifung (Differenzierung) der Epithelzellen zustande kommen kann (<http://flexicon.doccheck.com/>, sowie persönliche Mitteilung PD Dr. Julia Reichelt). Welche Effekte bei der Mausepidermis eine Rolle spielen ist nicht bekannt.

### **5.7 Expression von Cx31F137L in der Epidermis**

Aufgrund der verringerten Farbstoffkopplung der Cx31+/F137L ES Zellen stellte sich die Frage, ob diese reduzierte Kopplung eventuell auf Defizite im intrazellulären Transport zurückzuführen ist, die in ES Zellen nicht oder nur schlecht nachweisbar sind. Eine Unterscheidung des mutierten Proteins vom Wildtyp Protein, sowohl in der Immunfluoreszenz als auch bei Immunoblot Analysen ist nicht möglich (s.o.). Daher kann nur eine allgemeine Aussage über die Gesamtproteinmenge und die Verteilung aller Cx31 Moleküle gemacht werden. Das Vorkommen des Cx31 in den suprabasalen Schichten der Epidermis scheint in den Cx31+/F137L Tieren im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert zu sein. Sowohl die Verteilung als auch die Menge je Zelltyp waren ähnlich. Die Menge des Cx31 Proteins wurde in Hautlysaten untersucht und kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Cx31+/F137L Mauhaut festgestellt. Demnach scheinen das mutierte Protein und das Wildtyp Cx31 zumindest in der Haut dieser mutierten Mäuse normal verteilt zu sein. Ein genereller Effekt auf den intrazellulären Transport ist damit ebenso ausgeschlossen wie eine deutliche Überexpression oder eine Verminderung der Proteinmenge.

### **5.8 Expression der Connexine 26, 30, 30.3, 43 in der Cx31+/F137L Epidermis**

Da offensichtlich keinerlei Transport oder Expressionsveränderungen des Cx31 Proteins aufgetreten waren, stellte sich die Frage, ob ein transdominanter Effekt auf andere Connexin-Proteine vorliegt. Dazu wurden Immunfluoreszenzanalysen der Hautconnexine Cx26, Cx30, Cx31 und Cx43 in Schwanzhaut von Wildtyp Mäusen sowie von Cx31+/F137L Mäusen durchgeführt (siehe Abb. 23). Diese Untersuchungen ergaben eine vergleichbare Verteilung der untersuchten Connexine in Mäusen beider Genotypen. Eine Veränderung des Transportes dieser Connexine durch Cx31F137L ist also unwahrscheinlich. Außerdem wurde die Gesamtproteinmenge der Connexine 26, 30, 30.3, 43 untersucht. Es wurden keinerlei signifikante Veränderungen der Proteinmengen eines dieser Connexine in Schwanzhautlysaten von Cx31+/F137L Tieren im Vergleich zu Wildtyp Kontrolltieren gefunden. Weiterhin wäre es sinnvoll, die Connexine 30.3 und Cx31.1 in der Haut genauer zu untersuchen. Die Cx30.3 Antikörper reagieren bei der Immunoblot-Analyse spezifisch, nicht jedoch bei Immunfluoreszenz-Analysen der Schwanzhaut, so dass keine Immunfluoreszenzuntersuchung durchgeführt werden konnte. Die kommerziellen oder von Dr. Jim Nagy (Manitoba, Kanada) zur Verfügung gestellten

## Diskussion

Antikörper gegen Cx31.1 zeigten in den Cx31<sup>-/-</sup> Kontrollen (sowohl bei der Immunfluoreszenz, als auch bei Immunoblot-Analysen) die gleichen Signale wie in Wildtyp Kontrollen, so dass sie vermutlich unspezifisch sind.

### **5.9 Verkürzte Wundheilung in Cx31<sup>+</sup>/F137L Mäusen**

Bei Cx31<sup>+</sup>/F137L Mäusen wurde bei Schnittwunden am Schwanz eine um einen Tag verkürzte Wundheilung im Vergleich zu Wildtyp Tieren beobachtet. Der Effekt der beschleunigten Wundheilung wurde für Cx43<sup>-/-</sup> in der Haut bereits von Kretz et al. (2004) beschrieben. Weitere Anhaltspunkte für funktionelle Veränderungen der Haut wurden nicht gefunden. Die Untersuchung der Cx31<sup>-/-</sup> Tiere ergab keinerlei Einfluss des Fehlens von Cx31 auf den Zeitpunkt des Wundverschlusses. Ebenfalls wird in der erwähnten Arbeit eine Koregulation von Cx43 und Cx31 sowie von Cx26 und Cx30 beschrieben. In gesunder Haut ist während des Wundheilungsprozesses von Schnittwunden eine Herabregulation von Cx43 und Cx31 zu beobachten. Die Herabregulation des Cx43 könnte erforderlich sein, um den Verschluss der Wunde zu ermöglichen, z.B. weil eine Dedifferenzierung oder die Migration von Hautzellen erst durch Herabregulation dieser Connexine stattfinden kann. Diese Vermutung wurde in der vorliegenden Arbeit dadurch bestätigt, dass die Expression von Cx43 ab Tag 1 nach Wundsetzung parallel mit der Herabregulation von Cx31 deutlich verringert wird. Cx26 und 30 werden hingegen während der Wundheilung hochreguliert. Schon die ähnliche Regulation von Cx31 und Cx43 legt eine Interaktion beider Connexine nahe, wie sie bereits für Cx30 und Cx26 im Innenohr beschrieben ist (Manthey et al., 2001; Nagy et al., 2001; Marziano et al., 2003). Ein transdominant negativer Effekt einer Cx26 Mutation auf Cx30 und ein damit verbundener Hörverlust wurde beschrieben (Marziano et al., 2003; Nickel et al., 2006). Eine mögliche Erklärung für die beschleunigte Wundheilung in Cx31<sup>+</sup>/F137L Tieren ist, dass die Mutation zu einer Inaktivierung der Cx43 Kanäle führt und damit eine funktionelle Herabregulation darstellt, so dass die Wundheilung schneller vonstatten gehen kann. Der Abbau der Cx43 Kanäle könnte nötig sein, um die intrazelluläre Kopplung aufzuheben. Demnach würde die Cx31<sup>F137L</sup> Mutation dazu führen, dass ein transdominant-negativer Effekt auf Cx43 zustande kommt. Dieser Effekt könnte dann auf nicht geklärte Weise zu einer beschleunigten Wundheilung führen. Allerdings ist die bisher nicht bekannte, eigentliche Funktion des Cx43 Kanals vermutlich ebenfalls permanent inhibiert. Die Funktion der Connexine in der Haut ist

## Diskussion

noch nicht aufgeklärt, so dass auch keine Erkenntnisse vorliegen, was die eigentliche Aufgabe des Cx43 Proteins in der Haut ist. Erste Ko-Immünpräzipitationen von Cx31 und Cx43 aus Hautlysaten legen eine direkte Interaktion nachgewiesen nahe (Dr. Markus Kretz und Christian Markopoulos, persönliche Mitteilung). Ein weiteres Indiz für einen transdominant negativen Effekt des Cx31F137L Proteins auf das Cx43 Protein liefern die in dieser Arbeit beschriebenen Resultate der Untersuchungen an heterozygoten Cx31+/F137L ES-Zellen, da die stark reduzierte Kopplung nach Neurobiotin Injektionen ebenfalls durch einen transdominant-negativen Effekt von Cx31F137L auf Cx43 erklärt werden kann. Möglicherweise hat das Cx31F137L Protein keinen Einfluss auf die Cx45 Kanäle in den HM1 ES-Zellen hat, da sonst eine noch stärkere Kopplungsreduktion zu erwarten wäre. Außerdem erscheint auch ein Effekt der F137L Mutation auf Cx30.3 möglich, da dieselbe Mutation (F137L) auch im Cx30.3 Gen auftritt und der Phänotyp der Erkrankung der betroffenen Menschen nicht von den Trägern der Cx31F137L Mutation unterscheidbar ist. Untersuchungen hinsichtlich Cx30.3 und Cx31.1 waren jedoch aufgrund des Fehlens funktioneller Antikörper nicht möglich. Auch die Analyse der kürzlich charakterisierten Cx30.3<sup>-/-</sup> und Cx31.1<sup>-/-</sup> Mäuse (Zheng-Fischhöfer et al., in Vorbereitung) erbrachte bisher keine Anhaltspunkte für einen Effekt dieser Connexine auf die Geschwindigkeit der Wundheilung, jedoch reicht die Anzahl der durchgeführten Experimente nicht für eine abschließende Aussage aus. Vermutlich stellt die große Anzahl verschiedener in der Haut vorkommender Connexine ein sehr komplexes und zumindest in Teilen redundantes System dar, um vielfältige Funktionen in der Haut zu erfüllen.

### **5.10 Vergleich der Cx31<sup>-</sup>/F137L Tiere mit Cx31<sup>-/-</sup> und Cx31F137L/F137L Mäusen**

Nachdem deutlich wurde, dass keine Cx31F137L/F137L Tiere geboren werden, wurden Verpaarungen von Cx31<sup>-/-</sup> Mäusen mit Cx31<sup>+</sup>/F137L Tieren angesetzt. Die Arbeitshypothese ging davon aus, dass die Tiere Cx31<sup>-</sup>/F137L und Cx31F137L/F137L sich genetisch sehr ähnlich sind und daher ähnliche Effekte zu beobachten sein sollten. In beiden Linien ist kein funktionelles Wildtyp Cx31, wohl aber Cx31F137L vorhanden. Der einzige Unterschied ist, dass bei Cx31<sup>-</sup>/F137L Tieren auf einem Allel das LacZ Reportergen statt des Wildtyp Cx31 und auf dem anderen Allel die Cx31F137L Mutation vorhanden ist und bei Cx31F137L/F137L Tieren beide Allele durch die Cx31F137L Mutation ersetzt sind. Überraschenderweise wurden die Cx31<sup>-</sup>/F137L Tiere jedoch in etwa der erwarteten

## Diskussion

Mendel'schen Verteilung geboren und zeigten keinerlei makroskopische Auffälligkeiten. Um eine abschließende Aussage treffen zu können ist die Anzahl der geborenen Mäuse ( $n=7$ ) dieser Linie noch zu gering. Offenbar liegt ein Gendosiseffekt vor, da das doppelte Vorhandensein des Alles diesen Effekt hervorruft. Überraschend ist, dass es für die Überlebenswahrscheinlichkeit der Tiere offensichtlich keine Rolle spielt, ob das Cx31 Wildtyp-Allel vorhanden ist oder nicht, denn Cx31-/F137L und Cx31+/F137L Tiere überleben. Ob in der Haut der Cx31-/F137L Tiere mikroskopisch oder bei Wundheilungsanalysen entsprechende Effekte auftreten, muss noch untersucht werden.

### **5.11 Untersuchung der Cx31F137L Mutation in *Xenopus* Oozyten**

Kopplungsanalysen der Gap Junctions aus Cx31F137L und verschiedenen Wildtyp Connexinen in *Xenopus* Oozyten sollten tiefere Erkenntnisse über die Kanaleigenschaften der Cx31F137L Kanäle, auch im Zusammenspiel mit anderen Connexinen, liefern. Zu diesem Zweck werden zurzeit (in Zusammenarbeit mit Gabriele Schwarz) Oozytenvektoren hergestellt, die dazu dienen, die Cx31F137L Mutation in *Xenopus* Oozyten zu exprimieren. Zur Kontrolle wird ein identischer Vektor erzeugt, der jedoch statt der Cx31F137L kodierenden Region die Cx31 Wildtyp kodierende Region enthält. Von diesen Versuchen werden Erkenntnisse zur Funktionalität der Cx31F137L Mutation und die Effekte auf heterotypische elektrische Kopplung der Cx31F137L Gap Junctions erwartet.

### **5.12 Effekte der F137L Mutation auf die Struktur von Cx31**

Die Simulation der Transmembrandomänenstruktur erfolgte mit dem Programm TMbase (Hofmann und Stoffel, 1993). Daraus ergab sich bei der Cx31F137L Mutation eine im Vergleich zur Cx31 Wildtyp-Variante um eine Aminosäure verlängerte Transmembrandomäne 3, was die zytoplasmatische Schleife um eine Aminosäure verkürzt. Dies könnte Auswirkungen auf die Bindung assoziierter Moleküle haben. Denkbar sind sowohl veränderte Lipid- wie auch Proteininteraktionen ebenso wie eine strukturelle Veränderung der Kanalpore durch die verlängerte Transmembranregion. Diese Veränderung wurde sowohl bei der Simulation der Cx31F137L Mutation in der humanen Variante, als auch in dem Mausmodell erreicht. Zu beachten ist bei diesen Aussagen jedoch, dass sie ausschließlich auf mathematischen Berechnungen der Eigenschaften der

## Diskussion

Aminosäuren und ihrer Abfolgen, beruhen. Demnach ist nicht klar, ob diese Aussagen *in vivo* zutreffen, sie könnten jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

## **6 Ausblick**

### **6.1 Weitere Charakterisierung der Cx31F137L Gap Junctions**

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Maus erzeugt, welche die Mutation F137L im Cx31 Gen der Maus exprimiert und eine phänotypische Charakterisierung heterozygoter Tiere durchgeführt.

In weiteren Experimenten sollten die Cx31F137L Kanaleigenschaften der Gap Junction-Kanäle genauer untersucht werden und potentielle Interaktionen mit anderen Connexinen in der Haut und in der Plazenta untersucht werden. Erste Ko-Immunopräzipitationen zur Untersuchung der Interaktionen des Cx31 mit anderen Connexinen zeigen eine Interaktion von Cx31 und Cx43 in adulter Maushaut (Christian Markopoulos, Diplomarbeit). Weiterhin sollten die Auswirkungen der Mutation Cx31F137L auf die Kanaleigenschaften elektrophysiologisch in heteromeren und heterotypischen Kanälen, insbesondere in Kombination mit Wildtyp Cx31 und Cx43, vermessen werden. Zu diesem Zweck werden zurzeit die Vektoren für die Injektion der Mutation in *Xenopus* Oozyten erzeugt. Eine Analyse in HeLa Zellen ist nicht möglich, da diese nach Expression der Mutation Cx31F137L sterben. Zur Untersuchung der Cx31F137L Gap Junctions in vivo wären Farbstoffinjektionen in Dickschnitte der Haut der Cx31+/F137L Tiere hilfreich (vergleiche Kretz et al., 2003) In diesem Zusammenhang ist auch die Untersuchung intra- und interzellulärer  $Ca^{2+}$ -Gradienten durchaus interessant, denn diese könnten eine Rolle bei der Polarität und der Organisation der Differenzierung der Zellen der Epidermis spielen.

### **6.2 Wundheilung von Schnittwunden an der Schwanzhaut von Mäusen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wundheilungsanalysen an Cx31+/F137L Mäusen durchgeführt, die eine schnellere Wundheilung bei diesen Tieren im Vergleich zu Wildtyp Tieren zeigten.

Weitere Wundheilungsanalysen mit Cx31-/F137L Tieren im Vergleich zu Cx31+/F137L Tieren wären eine sinnvolle Ergänzung, da hier ein dominant negativer Effekt der Mutation Cx31F137L auf das Wildtyp Cx31 ausgeschlossen werden kann. Auch hier sollte eine weitere Analyse der übrigen Haut-Connexine durchgeführt werden. Des Weiteren sollten die beiden nun zur Verfügung stehenden Cx31.1-/- und Cx30.3-/- Mäuse umfassend in Bezug auf Wundheilung und Verteilung der anderen Connexin-Isoformen untersucht werden. Ebenso ist es nötig, in Wildtyp Tieren die Expression der Connexine 31.1 und Cx30.3 besser zu charakterisieren, sobald

entsprechende Antikörper zur Verfügung stehen. Nur so ist es möglich, die komplexen Interaktionen und die vermutlich teilweise redundante Funktion der Connexine in der Haut aufzuklären.

Es erscheint sinnvoll, mehrere dieser Connexine gleichzeitig auszuschalten. Dies ist bei den Connexinen Cx31, Cx31.1 und Cx30.3 aufgrund ihrer Lokalisation auf Chromosom 4 durch Verpaarungen der jeweiligen -/- Tiere nur schwer möglich. Allerdings können Cx31-/- Tiere sowie Cx31+/F137L Tiere mit Cx43<sup>fl/fl</sup>, Mx-Cre Tieren verpaart werden, um den putativ transdominant negativen Effekt des Cx31F137L auf Cx43 Kanäle besser untersuchen zu können.

Die Funktion der Connexine am Wundrand wäre ebenso ein Interessantes Untersuchungsfeld, da zum Beispiel Cx43 herabreguliert wird (Kretz et al., 2003), um die Migration von Zellen in die Wunde zu ermöglichen. Eine Herunterregulation von Cx43 konnte zuvor auch in Maus-Rückenhaut nach Behandlung mit Tumorpromotoren oder Onkogenen beobachtet werden (Brisette et al., 1991; Budunova et al., 1995). Des Weiteren wurde auch bei Calcium vermittelter Differenzierung kultivierter Maus-Keratinozyten eine Reduktion der Cx43-Proteinmenge nachgewiesen (Brisette et al., 1994). Mit der Funktion der Connexine Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx31.1 würde ein weiterer Aspekt der Wundheilung näher beleuchtet. Eventuell spielt die Regulation oder Missregulation von Lipiden eine Rolle bei der Abschottung des Organismus gegenüber der Außenwelt. Ein Zusammenhang zwischen Connexin- und Lipidfunktion ist noch nicht erforscht.

### **6.3 Untersuchungen zur Expression des Cx31 oder des Cx31F137L während der Embryonalentwicklung**

Cx31F137L/F137L Tiere versterben während der frühen Embryonalphase, allerdings konnte die Todesursache noch nicht geklärt werden. Durch weitere Untersuchungen zur Expression anderer Connexine während dieser frühen Embryonalphase und weitergehende Charakterisierung der Cx31F137 Kanäle in diesen Zellen durch Farbstoffinjektionen und elektrophysiologische Messungen könnte zur Klärung der Todesursache beigetragen werden. Außerdem wäre eine Untersuchung des Transfers von second messenger Molekülen wie cAMP und IP3 in diesen frühen Embryonalstadien interessant, da über diese die Differenzierung der Zellen reguliert zu sein scheint.

Wenn die Entwicklung einzelner lebenswichtiger Organe, wie zum Beispiel der Plazenta, die an ED7.5 angelegt wird, gehemmt oder unterbunden ist, könnte das ein Hinweis darauf sein, dass Cx31 für diese Entwicklung essenziell ist. Die Connexinexpression in der frühen Embryonalentwicklung ist bisher nur sehr unzureichend erforscht und um ein tiefer gehendes Verständnis der Rolle der Connexine in diesen frühen Differenzierungsprozessen zu erlangen, ist es unabdingbar durch Gefrierschnitte der Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien mit anschließenden Immunfluoreszenzanalysen die Lokalisation zu bestimmen. Damit würde gleichzeitig untersucht, welche Connexine in den jeweiligen Stadien als Protein exprimiert sind. Interessant wäre der Vergleich der Protein-Expression verschiedener Connexin-defizienter Tiere mit Wildtyp Tieren. Dazu könnten Lysate des gesamten Embryos hergestellt werden und Immunoblots durchgeführt werden. Die Gewichte der Embryonen der verschiedenen Entwicklungsstadien können ebenfalls Aufschluss über deren Versorgungszustand und damit indirekt über die Wichtigkeit der verschiedenen Connexin Isotypen in der Embryogenese geben.

### **6.4 Weitere phänotypische Charakterisierung der Cx31+/F137L Tiere**

Im Zuge dieser Arbeit konnte eine Akanthose bei Cx31+/F137L Tieren nachgewiesen werden. Für die durchgeführten Analysen wurden Tiere des Stammbintergrunds C57/Bl6 eingesetzt. Dieser Stamm wie auch andere Inzuchtstämme sind für die Analyse von Hautveränderungen nur bedingt geeignet, so dass sich eine Verpaarung mit Nicht-Inzuchtstämmen anbieten würde, so dass der Phänotyp makroskopisch erkennbar wird (persönliche Mitteilung Dr. Malcolm Hodgins, University of Glasgow) Beispielsweise traten bei der Expression von Cx26 Mutationen Einschränkungen im Bereich des Schwanzes auf, die in Inzuchtstämmen nicht zu beobachten waren. Demnach kann es durchaus sinnvoll sein auch die Cx31+/F137L Tiere mit solchen „nicht-Inzucht-Stämmen“ zu verpaaren, um dann eventuell einen deutlicheren, vielleicht sogar makroskopisch erkennbaren Phänotyp hervorzurufen.

### **6.5 Künstliche Hautmodelle zur weiteren Untersuchung der Connexine**

Mögliche Ansätze zur weiteren Erforschung der Connexine und ihrer Mutationen in der Haut sind unter anderem die Kultur von Keratinozyten und die Untersuchung ihrer Connexin-Expression. Diese Keratinozytenkulturen können mit menschlichen

## Ausblick

Zellen bereits erfolgreich angelegt werden, so dass sich sogar eine Epidermis ähnliche Struktur ausbildet.-

Es wäre interessant zu beobachten, unter welchen Bedingungen welche Connexine wie reguliert wären. In diesen Zellkultursystemen könnte man wiederum einzelne Connexine ausschalten (z.B. durch Verwendung von Connexin KO-Mäusen, durch Einsatz von siRNA oder von microRNA) und analysieren, ob ihre Funktion durch ein anderes Connexin übernommen werden kann. In diesen künstlichen Hautmodellen wäre es ebenso möglich, die Barrierefunktion der Haut zu testen, um herauszufinden, ob und wie beispielsweise die Wasserbarriere, die die Haut darstellt, in ihrer Funktion von Connexinen abhängig ist. Eine wichtige Eigenschaft dieser künstlichen Hautmodelle ist, dass sie in Ihrer Fläche und Dicke ganz genau erfassbar sind und sowohl die Nährstoffversorgung als auch die Feuchtigkeitsabgabe in vielen parallelen Ansätzen im direkten Vergleich untersucht werden können. So können Einflüsse der umgebenden Luft untersucht werden, indem verschiedene Parameter wie Temperatur oder Feuchtigkeitssättigung der Umgebungsluft verändert werden. Diese Tests wären möglich, da die Kulturhaut sowohl von ihrer Ober- als auch Unterseite zugänglich ist, so dass ein Eindringen eines (Farb-)Stoffes nachweisbar ist. Ebenso wäre ein Abernten der verschiedenen Zellschichten im nativen Zustand im Vergleich zu Connexin-Knockout-Modellen möglich. Des weiteren könnten verschiedene Parameter, wie z.B. Wassergehalt oder Ionenmengen ( $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten) und die Zusammensetzungen der einzelnen Zellschichten bestimmt werden. Falls die Wasserbarrierefunktion in einigen der Connexin Knockout- oder Mutations-Modellen verändert wäre (wie das im Falle der Cx43delICT Maus ist (Maass et al., 2003)), also z.B. deutlich mehr Feuchtigkeit an die Umgebung abgegeben würde, kann mittels der Zellfeuchtigkeitsmessungen nachgewiesen werden, ob der Effekt direkt durch Wasserabgabe der Hautzellen zustande kommt, oder aber zwischen den Zellen hindurch passiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass Connexine ebenfalls zumindest teilweise die Funktion der Abdichtung erfüllen, die für Tight Junctions gezeigt ist. Ein Indiz für eine funktionelle Verwandtschaft von Gap und Tight Junctions sind identische assoziierte Proteine, wie z.B. ZO-1, Drebrin und Tubulin. So dass Gap Junctions durch Verknüpfung mit diesen Zellskelett assoziierten Proteinen ebenfalls maßgeblich an der mechanischen Stabilität der Zellmembranen und ihrer Position zueinander beteiligt sein, also sowohl Barriere-, als auch Haltefunktion übernehmen könnten.

## Ausblick

Die Untersuchung von Keratinozyten, in denen einzelne oder mehrere Connexine ausgeschaltet sind, hinsichtlich ihrer Kopplungseigenschaften könnte neue Erkenntnisse über das Zusammenspiel verschiedener Connexin Isoformen liefern. Besonders interessant ist dabei, wenn die Expression der zu untersuchenden Connexine nicht durch exogene Promotoren verändert ist, sondern der native Zustand erhalten bleibt. Diese zu untersuchenden Keratinozyten können aus entsprechenden transgenen Mäusen isoliert und kultiviert werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Keratinozyten.

In Bezug auf menschliche Hauterkrankungen ist die Frage von Bedeutung, warum z.B. im Mausmodell Akanthose auftritt und welche Faktoren bei der Regulation der Anzahl der Zellen im *Stratum spinosum* und deren weitere Differenzierung der Zellen dieser Schicht in Zellen des *Stratum corneum* eine Rolle spielen können. Ob und in welchem Umfang die Untersuchungen des Mausmodells Rückschlüsse auf die menschliche Erkrankung zulassen und ob daraus Behandlungsmöglichkeiten für Patienten resultieren ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht absehbar.

### 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine transgene Maus als Modell für die humane Erbkrankheit der Haut *Erythrokeratodermia variabilis* (EKV) erzeugt. EKV wird im Menschen unter anderem durch eine Punktmutation im Cx31-Gen verursacht, so dass an der Aminosäure-Position 137 F (Phenylalanin) durch L (Leucin) ersetzt wird. Die Charakteristika der EKV Maus mit dem Genotyp Cx31+/F137L wurden mittels Immunfluoreszenz, Immuno-Blot, Southern Blot und Wundheilungsanalysen untersucht. Weiterhin wurde die Cx31F137L Mutation in Zellkultur genauer analysiert.

In HeLa Zellen führt die Expression der Cx31F137L Form zum Absterben der Zellen. In embryonalen HM1 Stammzellen wurde bei heterozygoter Expression der Mutation Cx31F137L eine Reduktion der Neurobiotinkopplung um etwa ein Drittel beobachtet. Diese starke Reduktion der Kopplung deutet auf einen transdominant negativen Effekt auf Cx43 oder Cx45 hin. Eine erhöhte Halbkanalaktivität wurde in ES Zellen, welche die Cx31F137L Mutation ausprägen, nicht nachgewiesen.

Cx31+/F137L Mäuse sind lebensfähig und fertil. Sie zeigen makroskopisch keinen auffälligen Phänotyp und werden normal alt. Die Expression der Cx31F137L in der Epidermis der Mäuse führt bei der Untersuchung von Schwanzschnittwunden zu einer um etwa einen Tag beschleunigten Wundheilung, ebenso wie von Kretz et al., 2004 für Mäuse beschrieben, bei denen Cx43 in der Haut ausgeschaltet wurde. Dies ist ein weiteres Indiz für den Effekt der Cx31F137L Mutation auf Cx43.

In ca. 5% der untersuchten Schwanzhaut der Cx31+/F137L Tiere wurden deutliche Verdickungen der Epidermis und vor allem der Stachelzellschicht (Akanthose) beobachtet. Dieser seltene Effekt ähnelt dem in menschlichen Patienten viel häufiger beobachteten Phänotyp, so dass diese Mausmutante in dieser Hinsicht als Modell für die humane Erkrankung EKV dienen kann.

Patienten mit homozygoter Cx31F137L Mutation wurden bisher nicht beschrieben. Cx31F137L/F137L starben als Embryonen an Tag 8 dpc. Die Expression des Cx31 in der Plazenta kann nicht der Grund dafür sein, da die Ernährung des Embryos zu diesem Zeitpunkt noch über Diffusion erfolgt. Die genaue Todesursache ist daher noch unklar.

Cx31-/F137L Mäuse zeigen keine offensichtlichen phänotypischen Anomalien sondern werden mit erwarteter Häufigkeit geboren. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Cx31F137L Mutation phänotypische Änderungen bei Mäusen und Menschen durch (trans)dominante Wirkungen (auf andere Connexinisoformen) auslöst.

## 8 Verwendete Literatur

Abrams,C.K., Freidin,M.M., Verselis,V.K., Bargiello,T.A., Kessel,D.P., Richard,G., Bennett,M.V., and Bukauskas,F.F. (2006). Properties of human connexin 31, which is implicated in hereditary dermatological disease and deafness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5213-5218.

Affolder,T., Akimoto,H., Akopian,A., Albrow,M.G., Amaral,P., Amidei,D., Anikeev,K., Antos,J., Apollinari,G., Arisawa,T., Artikov,A., Asakawa,T.,et al.,(2001). Observation of diffractive J/psi production at the Fermilab Tevatron. *Phys. Rev. Lett.* 87, 241802.

Ahmad,S., Diez,J.A., George,C.H., and Evans,W.H. (1999). Synthesis and assembly of connexins in vitro into homomeric and heteromeric functional gap junction hemichannels. *Biochem. J.* 339, 247-253.

Alberts,B., Bray,D., Johnson,A., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., Walter,P. (1998) *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie.* Wiley-VCH

Alberts,B., Johnson,A., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., Walter,P. (2002) *Molekular biology of the cell, Fourth Edition.* Garand Science

Altevogt,B.M., Kleopa,K.A., Postma,F.R., Scherer,S.S., and Paul,D.L. (2002). Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci.* 22, 6458-6470.

Alvarez,A., del,C., I, Pera,A., Villamar,M., Moreno-Pelayo,M.A., Moreno,F., Moreno,R., and Tapia,M.C. (2003). De novo mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in a sporadic case of keratitis-ichthyosis-deafness (KID) syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* 117, 89-91.

Atkinson,M.M., Lampe,P.D., Lin,H.H., Kollander,R., Li,X.R., and 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, 3079-3090.

Baker,J. and Garrod,D. (1993). Epithelial cells retain junctions during mitosis. *J. Cell Sci.* 104, 415-425.

Bennett,M.V., Barrio,L.C., Bargiello,T.A., Spray,D.C., Hertzberg,E., and Saez,J.C. (1991). Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron.* 6, 305-320.

## Literatur

Bennett,M.V., Contreras,J.E., Bukauskas,F.F., and Saez,J.C. (2003). New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci.* 26, 610-617.

Bennett,M.V. and Zukin,R.S. (2004). Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron.* %19;41, 495-511.

Berthoud,V.M., Minogue,P.J., Guo,J., Williamson,E.K., Xu,X., Ebihara,L., and Beyer,E.C. (2003). Loss of function and impaired degradation of a cataract-associated mutant connexin50. *Eur. J. Cell Biol.* 82, 209-221.

Beyer,E.C., Paul,D.L., and Goodenough,D.A. (1987). Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J. Cell Biol.* 105, 2621-2629.

Beyer,E.C., Kistler,J., Paul,D.L., and 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.

Bondarev,I., Vine,A., and Bertram,J.S. (2001). Cloning and functional expression of a novel human connexin-25 gene. *Cell Commun. Adhes.* 8, 167-171.

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

Brink,P.R., Cronin,K., Banach,K., Peterson,E., Westphale,E.M., Seul,K.H., Ramanan,S.V., and Beyer,E.C. (1997). Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37. *Am. J. Physiol.* 273, C1386-C1396.

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

Bruzzone,R., Hormuzdi,S.G., Barbe,M.T., Herb,A., and Monyer,H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13644-13649.

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

## Literatur

- Butkevich,E., Hulsmann,S., Wenzel,D., Shirao,T., Duden,R., Majoul,I. (2004). Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr.Biol.* *14*, 650-658.
- Buultjens,T.E., Finbow,M.E., Lane,N.J., and Pitts,J.D. (1988). Tissue and species conservation of the vertebrate and arthropod forms of the low molecular weight (16-18000) proteins of gap junctions. *Cell Tissue Res.* *251*, 571-580.
- Cambridge,S.B., Cürten,B., Bonhoeffer,T. A caged doxycycline analog for photoactivated gene expression with high spatiotemporal resolution. Talk: Maxplanck Workshop on cellular imaging for biological problems, Berlin 6. bis 8. April 2003
- Capecchi, M.R.(1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science.* *244*, 1288-1292.
- Caputo,R. and Peluchetti,D. (1977). The junctions of normal human epidermis. A freeze-fracture study. *J. Ultrastruct. Res.* *61*, 44-61.
- Common,J.E., Becker,D., Di,W.L., Leigh,I.M., O'Toole,E.A., and Kelsell,D.P. (2002). Functional studies of human skin disease- and deafness-associated connexin 30 mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *298* , 651-656.
- Condorelli,D.F., Parenti,R., Spinella,F., Trovato,S.A., Belluardo,N., Cardile,V., and Cicerata,F. (1998). Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 1202-1208.
- Contreras,J.E., Saez,J.C., Bukauskas,F.F., and Bennett,M.V. (2003). Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11388-11393.
- Contreras,J.E., Saez,J.C., Bukauskas,F.F., and Bennett,M.V. (2003). Functioning of cx43 hemichannels demonstrated by single channel properties. *Cell Commun. Adhes.* *10*, 245-249.
- Cooper,C.D. and Lampe,P.D. (2002). Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. *J. Biol. Chem.* *277*, 44962-44968.
- Cruciani,V. and Mikalsen,S.O. (2002). Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases. *Biol. Cell.* *94*, 433-443.

## Literatur

Dahl,E., Manthey,D., Chen,Y., Schwarz,H.J., Chang,Y.S., Lalley,P.A., Nicholson,B.J., and 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.

Das,S.J., Meyer,R.A., Wang,F., Abraham,V., Lo,C.W., and Koval,M. (2001). Multimeric connexin interactions prior to the trans-Golgi network. *J. Cell Sci.* *114*, 4013-4024.

Dattelbaum,D.M., Omberg,K.M., Schoonover,J.R., Martin,R.L., and Meyer,T.J. (2002). Application of time-resolved infrared spectroscopy to electronic structure in metal-to-ligand charge-transfer excited states. *Inorg. Chem.* *41*, 6071-6079.

De Zeeuw,C.I., Chorev,E., Devor,A., Manor,Y., Van Der Giessen,R.S., De Jeu,M.T., Hoogenraad,C.C., Bijman,J., Ruigrok,T.J., French,P., Jaarsma,D., Kistler,W.M., Meier,C., Petrasch-Parwez,E., Dermietzel,R., Sohl,G., Gueldenagel,M., Willecke,K., and Yarom,Y. (2003). Deformation of network connectivity in the inferior olive of connexin 36-deficient mice is compensated by morphological and electrophysiological changes at the single neuron level. *J. Neurosci.* *23*, 4700-4711.

Deng,C., Thomas,K.R., Capecchi,M.R. (1993). Location of crossovers during gene targeting with insertion and replacement vectors. *Mol.Cell Biol.* *13*, 2134-2140.

Di,W.L., Monypenny,J., Common,J.E., Kennedy,C.T., Holland,K.A., Leigh,I.M., Rugg,E.L., Zicha,D., and Kelsell,D.P. (2002). Defective trafficking and cell death is characteristic of skin disease-associated connexin 31 mutations. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 2005-2014.

Diestel,S., Richard,G., Doring,B., and Traub,O. (2002). Expression of a connexin31 mutation causing erythrokeratoderma variabilis is lethal for HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *296*, 721-728.

Eiberger,J., Degen,J., Romualdi,A., Deutsch,U., Willecke,K., and Sohl,G. (2001). Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell Commun. Adhes.* *8*, 163-165.

Eiberger,J., Kibschull,M., Strenzke,N., Schober,A., Bussow,H., Wessig,C., Djahed,S., Reucher,H., Koch,D.A., Lautermann,J., Moser,T., Winterhager,E., and Willecke,K. (2006). Expression pattern and functional characterization of connexin29 in transgenic mice. *Glia.* *53*, 601-611.

## Literatur

Elfang,C., Eckert,R., Lichtenberg-Frate,H., Butterweck,A., Traub,O., Klein,R.A., Hulser,D.F., and Willecke,K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* 129, 805-817.

Enkvist,M.O. and 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.

Evans,M.J., Kaufman,M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.

Evans,W.H. and Martin,P.E. (2002). Lighting up gap junction channels in a flash. *Bioessays.* 24, 876-880.

Fedorov,L.M., Haegel-Kronenberger,H., Hirchenhain,J. (1997). A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants. *Transgenic Res.* 6, 223-231.

Feldmeyer,L., Plantard,L., Mevorah,B., Huber,M., and Hohl,D. (2005). Novel mutation of connexin 31 causing erythrokeratoderma variabilis. *Br. J. Dermatol.* 152, 1072-1074.

Flagg-Newton,J., Simpson,I., and Loewenstein,W.R. (1979). Permeability of the cell-to-cell membrane channels in mammalian cell junction. *Science.* 205, 404-407.

Foote,C.I., Zhou,L., Zhu,X., and Nicholson,B.J. (1998). The pattern of disulfide linkages in the extracellular loop regions of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. *J. Cell Biol.* 140, 1187-1197.

Francis,D., Stergiopoulos,K., Ek-Vitorin,J.F., Cao,F.L., Taffet,S.M., and Delmar,M. (1999). Connexin diversity and gap junction regulation by pHi. *Dev. Genet.* 24, 123-136.

Fraser,S.E., Green,C.R., Bode,H.R., and Gilula,N.B. (1987). Selective disruption of gap junctional communication interferes with a patterning process in hydra. *Science.* 237, 49-55.

Fujita,M., Spray,D.C., Choi,H., Saez,J.C., Watanabe,T., Rosenberg,L.C., Hertzberg,E.L., and 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.

## Literatur

Furshpane,E.J. and Potter,D.D. (1959). Slow post-synaptic potentials recorded from the giant motor fibre of the crayfish. *J. Physiol.* *145*, 326-335.

Gabriel,H.D., Jung,D., Butzler,C., Temme,A., Traub,O., Winterhager,E., and Willecke,K. (1998). Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J. Cell Biol.* *140*, 1453-1461.

Giaume,C. and Venance,L. (1998). Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia.* *24*, 50-64.

Gimlich,R.L., Kumar,N.M., and Gilula,N.B. (1990). Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos. *J. Cell Biol.* *110*, 597-605.

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

Gordon,K. and Ruddle,F.H. (1985). Gene transfer into mouse embryos. *Dev. Biol. (N. Y. %1986;4:1-36.*, 1-36.

Gossen,J. and Vijg,J. (1993). Transgenic mice as model systems for studying gene mutations in vivo. *Trends Genet.* *9*, 27-31.

Gottfried,I., Landau,M., Glaser,F., Di,W.L., Ophir,J., Mevorah,B., Ben Tal,N., Kelsell,D.P., and Avraham,K.B. (2002). A mutation in GJB3 is associated with recessive erythrokeratoderma variabilis (EKV) and leads to defective trafficking of the connexin 31 protein. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1311-1316.

Griffiths,A.J.F., Gelbart,W.M., Lewontin,R.C., Miller,J.H. (2002) *Modern genetic analysis: integrating genes and genomes.* W.H.Freeman.

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

Gustincich,S., Batalov,S., Beisel,K.W., Bono,H., Carninci,P., Fletcher,C.F., Grimmond,S., Hirokawa,N., Jarvis,E.D., Jegla,T., Kawasawa,Y., LeMieux,J., Miki,H., Raviola,E., Teasdale,R.D., Tominaga,N., Yagi,K., Zimmer,A., Hayashizaki,Y., and Okazaki,Y. (2003). Analysis of the mouse transcriptome for genes involved in the function of the nervous system. *Genome Res.* *13*, 1395-1401.

## Literatur

Haefliger, J.A., Bruzzone, R., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., and 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.

Hanemann, C.O., Bergmann, C., Senderek, J., Zerres, K., and Sperfeld, A.D. (2003). Transient, recurrent, white matter lesions in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with novel connexin 32 mutation. *Arch. Neurol.* 60, 605-609.

He, L.Q., Liu, Y., Cai, F., Tan, Z.P., Pan, Q., Liang, D.S., Long, Z.G., Wu, L.Q., Huang, L.Q., Dai, H.P., Xia, K., Xia, J.H., and Zhang, Z.H. (2005). Intracellular distribution, assembly and effect of disease-associated connexin 31 mutants in HeLa cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 37, 547-554.

Heathcote, K., Syrris, P., Carter, N.D., and Patton, M.A. (2000). A connexin 26 mutation causes a syndrome of sensorineural hearing loss and palmoplantar hyperkeratosis (MIM 148350). *J. Med. Genet.* 37, 50-51.

Henderson, D., Eibl, H., and Weber, K. (1979). Structure and biochemistry of mouse hepatic gap junctions. *J. Mol. Biol.* 132, 193-218.

Hennemann, H., Schwarz, H.J., and Willecke, K. (1992). Characterization of gap junction genes expressed in F9 embryonic carcinoma cells: molecular cloning of mouse connexin31 and -45 cDNAs. *Eur. J. Cell Biol.* 57, 51-58.

Hennemann, H., Dahl, E., White, J.B., Schwarz, H.J., Lalley, P.A., Chang, S., Nicholson, B.J., and Willecke, K. (1992). 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.

Hertzberg, E.L. and Gilula, N.B. (1979). Isolation and characterization of gap junctions from rat liver. *J. Biol. Chem.* 254, 2138-2147.

Heynkes, R., Kozjek, G., Traub, O., and Willecke, K. (1986). Identification of a rat liver cDNA and mRNA coding for the 28 kDa gap junction protein. *FEBS Lett.* 205, 56-60.

Hilton, D.J., Nicola, N.A., Metcalf, D. (1991). Distribution and comparison of receptors for leukaemia inhibitory factor on murine hemopoietic and hepatic cells. *J. Cell Physiol* 146, 207-215.

## Literatur

Hofmann,K. and Stoffel,W. (1992). Profilegraph: An interactive graphical tool for protein sequence analysis. *Comput. Appl. Biosci.* 8, 331-337.

Hoh,J.H., John,S.A., and Revel,J.P. (1991). Molecular cloning and characterization of a new member of the gap junction gene family, connexin-31. *J. Biol. Chem.* 266, 6524-6531.

Holder,J.W., Elmore,E., and Barrett,J.C. (1993). Gap junction function and cancer. *Cancer Res.* 53, 3475-3485.

Hombach,S., Janssen-Bienhold,U., Sohl,G., Schubert,T., Bussow,H., Ott,T., Weiler,R., and Willecke,K. (2004). Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2633-2640.

Homma,N., Alvarado,J.L., Coombs,W., Stergiopoulos,K., Taffet,S.M., Lau,A.F., and Delmar,M. (1998). A particle-receptor model for the insulin-induced closure of connexin43 channels. *Circ. Res.* 83, 27-32.

Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., und Monk, M.(1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326, 292-295.

Jan,A.Y., Amin,S., Ratajczak,P., Richard,G., and Sybert,V.P. (2004). Genetic heterogeneity of KID syndrome: identification of a Cx30 gene (GJB6) mutation in a patient with KID syndrome and congenital atrichia. *J. Invest Dermatol.* 122, 1108-1113.

Jiang,J.X. and Goodenough,D.A. (1996). Heteromeric connexons in lens gap junction channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1287-1291.

John,S.A. and Revel,J.P. (1991). Connexon integrity is maintained by non-covalent bonds: intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin-43. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 1312-1318.

Johnson,R.G., Meyer,R.A., Li,X.R., Preus,D.M., Tan,L., Grunenwald,H., Paulson,A.F., Laird,D.W., and Sheridan,J.D. (2002). Gap junctions assemble in the presence of cytoskeletal inhibitors, but enhanced assembly requires microtubules. *Exp. Cell Res.* 275, 67-80.

## Literatur

Johnson,R.S., Sheng,M., Greenberg,M.E., Kolodner,R.D., Papaioannou,V.E., and Spiegelman,B.M. (1989). Targeting of nonexpressed genes in embryonic stem cells via homologous recombination. *Science*. 245, 1234-1236.

Kam,E., Melville,L., and Pitts,J.D. (1986). Patterns of junctional communication in skin. *J. Invest Dermatol.* 87, 748-753.

Kam,E., Watt,F.M., and Pitts,J.D. (1987). Patterns of junctional communication in skin: studies on cultured keratinocytes. *Exp. Cell Res.* 173, 431-438.

Kelsell,D.P., Wilgoss,A.L., Richard,G., Stevens,H.P., Munro,C.S., and Leigh,I.M. (2000). Connexin mutations associated with palmoplantar keratoderma and profound deafness in a single family. *Eur. J. Hum. Genet.* 8, 469-472.

Kennedy,S.H., Einfeld,B.S., Meyer,J.H., and Bagby,R.M. (2001). Antidepressants in clinical practice: limitations of assessment methods and drug response. *Hum. Psychopharmacol.* 16, 105-114.

Kirchhoff,S., Nelles,E., Hagendorff,A., Kruger,O., Traub,O., and Willecke,K. (1998). Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr. Biol.* 8, 299-302.

Kjaer,K.W., Hansen,L., Eiberg,H., Leicht,P., Opitz,J.M., and Tommerup,N. (2004). Novel Connexin 43 (GJA1) mutation causes oculo-dento-digital dysplasia with curly hair. *Am. J. Med. Genet. A.* 127, 152-157.

Knippers,R. (2001). *Molekulare Genetik*. Thieme.

Kozak,M. (2001). Constraints on reinitiation of translation in mammals. *Nucleic Acids Res.* 29, 5226-5232.

Kretz,M., Euwens,C., Hombach,S., Eckardt,D., Teubner,B., Traub,O., Willecke,K., and Ott,T. (2003). Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice. *J. Cell Sci.* 116, 3443-3452.

Kreuzberg,M.M., Sohl,G., Kim,J.S., Verselis,V.K., Willecke,K., and Bukauskas,F.F. (2005). Functional properties of mouse connexin30.2 expressed in the conduction system of the heart. *Circ. Res.* 96, 1169-1177.

## Literatur

Kreuzberg,M.M., Schrickel,J.W., Ghanem,A., Kim,J.S., Degen,J., Janssen-Bienhold,U., Lewalter,T., Tiemann,K., and Willecke,K. (2006). Connexin30.2 containing gap junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5959-5964.

Kruger,O., Plum,A., Kim,J.S., Winterhager,E., Maxeiner,S., Hallas,G., Kirchhoff,S., Traub,O., Lamers,W.H., and Willecke,K. (2000). Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development.* 127, 4179-4193.

Kumar,N.M. and Gilula,N.B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell.* 84, 381-388.

Kumari,S.S., Varadaraj,K., Valiunas,V., Ramanan,S.V., Christensen,E.A., Beyer,E.C., and Brink,P.R. (2000). Functional expression and biophysical properties of polymorphic variants of the human gap junction protein connexin37. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 216-224.

Kyte,J. and Doolittle,R.F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.

Lagree,V., Brunschwig,K., Lopez,P., Gilula,N.B., Richard,G., and Falk,M.M. (2003). Specific amino-acid residues in the N-terminus and TM3 implicated in channel function and oligomerization compatibility of connexin43. *J. Cell Sci.* 116, 3189-3201.

Laing,J.G., Tadros,P.N., Westphale,E.M., and Beyer,E.C. (1997). Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome. *Exp. Cell Res.* 236, 482-492.

Laird,D.W. (1996). The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 311-318.

Laird,P.W., Zijderveld,A., Linders,K., Rudnicki,M.A., Jaenisch,R., and Berns,A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* 19, 4293.

Lallemand,Y., Luria,V., Haffner-Krausz,R., and Lonai,P. (1998). Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase. *Transgenic Res.* 7, 105-112.

Lamartine,J., Munhoz,E.G., Kibar,Z., Lanneluc,I., Callouet,E., Laoudj,D., Lemaitre,G., Hand,C., Hayflick,S.J., Zonana,J., Antonarakis,S., Radhakrishna,U., Kelsell,D.P.,

## Literatur

Christianson,A.L., Pitaval,A., Der,K., V, Fraser,C., Blanchet-Bardon,C., Rouleau,G.A., and Waksman,G. (2000). Mutations in GJB6 cause hidrotic ectodermal dysplasia. *Nat. Genet.* 26, 142-144.

Lawrence,T.S., Beers,W.H., and Gilula,N.B. (1978). Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature.* 272, 501-506.

Leithe,E. and Rivedal,E. (2004). Epidermal growth factor regulates ubiquitination, internalization and proteasome-dependent degradation of connexin43. *J. Cell Sci.* 117, 1211-1220.

Leithe,E. and Rivedal,E. (2004). Ubiquitination and down-regulation of gap junction protein connexin-43 in response to 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate treatment. *J. Biol. Chem.* 279, 50089-50096.

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

Lewin,B. (2002) *Molekularbiologie der Gene.* Spektrum Akademischer Verlag

Li,Z. and Hatton,G.I. (1996). Oscillatory bursting of phasically firing rat supraoptic neurones in low-Ca<sup>2+</sup> medium: Na<sup>+</sup> influx, cytosolic Ca<sup>2+</sup> and gap junctions. *J. Physiol.* 496, 379-394.

Loewenstein,W.R. and Kanno,Y. (1966). Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature.* %19;209, 1248-1249.

Lopez-Bigas,N., Rabionet,R., Martinez,E., Banchs,I., Volpini,V., Vance,J.M., Arbones,M.L., and Estivill,X. (2000). Identification of seven novel SNPS (five nucleotide and two amino acid substitutions) in the connexin31 (GJB3) gene. *Hum. Mutat.* 15, 481-482.

Lopez-Bigas,N., Melchionda,S., Gasparini,P., Borragan,A., Arbones,M.L., and Estivill,X. (2002). A common frameshift mutation and other variants in GJB4 (connexin 30.3): Analysis of hearing impairment families. *Hum. Mutat.* 19, 458.

Lottspeich,F., Zorbach,H. *Bioanalytik* (1998) Spektrum Akademischer Verlag

## Literatur

Macari,F., Landau,M., Cousin,P., Mevorah,B., Brenner,S., Panizzon,R., Schorderet,D.F., Hohl,D., and Huber,M. (2000). Mutation in the gene for connexin 30.3 in a family with erythrokeratoderma variabilis. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1296-1301.

Maestrini,E., Korge,B.P., Ocana-Sierra,J., Calzolari,E., Cambiagli,S., Scudder,P.M., Hovnanian,A., Monaco,A.P., and Munro,C.S. (1999). A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1237-1243.

Manthey,D., Bukauskas,F., Lee,C.G., Kozak,C.A., and 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.

Manthey,D., Banach,K., Desplantez,T., Lee,C.G., Kozak,C.A., Traub,O., Weingart,R., and Willecke,K. (2001). Intracellular domains of mouse connexin26 and -30 affect diffusional and electrical properties of gap junction channels. *J. Membr. Biol.* 181, 137-148.

Martin,G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78, 7634-7638.

Martin,P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.

Marziano,N.K., Casalotti,S.O., Portelli,A.E., Becker,D.L., and Forge,A. (2003). Mutations in the gene for connexin 26 (GJB2) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30. *Hum. Mol. Genet.* 12, 805-812.

Masgrau-Peya,E., Salomon,D., Saurat,J.H., and Meda,P. (1997). In vivo modulation of connexins 43 and 26 of human epidermis by topical retinoic acid treatment. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 1207-1215.

McCulloch,F., Chambrey,R., Eladari,D., and Peti-Peterdi,J. (2005). Localization of connexin 30 in the luminal membrane of cells in the distal nephron. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* 289, F1304-F1312.

Megerian,C.A., Cosenza,M.J., and Meyer,S.E. (2002). Revision tympanomastoid surgery. *Ear Nose Throat J.* 81, 718-6.

## Literatur

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

Meyer,A.A. and Weiner,T.M. (2002). The generation gap: perspectives of a program director. *Arch. Surg.* *137*, 268-270.

Meyer,A.H., Katona,I., Blatow,M., Rozov,A., and Monyer,H. (2002). In vivo labeling of parvalbumin-positive interneurons and analysis of electrical coupling in identified neurons. *J. Neurosci.* *22*, 7055-7064.

Meyer,D., Hewson,A.C., and Bulla,R. (2002). Gap formation and soft phonon mode in the Holstein model. *Phys. Rev. Lett.* *89*, 196401.

Meyer,J., Mai,M., Ortega,G., Mossner,R., and Lesch,K.P. (2002). Mutational analysis of the connexin 36 gene (CX36) and exclusion of the coding sequence as a candidate region for catatonic schizophrenia in a large pedigree. *Schizophr. Res.* *58*, 87-91.

Meyer,R.A. (2001). Nerve harvesting procedures. *Atlas. Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.* *9*, 77-91.

Meyer,U., Wiesmann,H.P., Meyer,T., Schulze-Osthoff,D., Jasche,J., Kruse-Losler,B., and Joos,U. (2001). Microstructural investigations of strain-related collagen mineralization. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* *39*, 381-389.

Meyer,U., Meyer,T., Wiesmann,H.P., Kruse-Losler,B., Vollmer,D., Stratmann,U., and Joos,U. (2001). Mechanical tension in distraction osteogenesis regulates chondrocytic differentiation. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* *30*, 522-530.

Mhatre,A.N., Weld,E., and Lalwani,A.K. (2003). Mutation analysis of Connexin 31 (GJB3) in sporadic non-syndromic hearing impairment. *Clin. Genet.* *63*, 154-159.

Montgomery,J.R., White,T.W., Martin,B.L., Turner,M.L., and Holland,S.M. (2004). A novel connexin 26 gene mutation associated with features of the keratitis-ichthyosis-deafness syndrome and the follicular occlusion triad. *J. Am. Acad. Dermatol.* *51*, 377-382.

Morley,S.M., White,M.I., Rogers,M., Wasserman,D., Ratajczak,P., McLean,W.H., and Richard,G. (2005). A new, recurrent mutation of GJB3 (Cx31) in erythrokeratoderma variabilis. *Br. J. Dermatol.* *152*, 1143-1148.

## Literatur

Nagy A, Gertsenstein M, Vinterstein K, Behringer R. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.

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

Nagy,J.I., Ionescu,A.V., Lynn,B.D., and Rash,J.E. (2003). Connexin29 and connexin32 at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions and in myelin of the mouse central nervous system. *J. Comp Neurol.* *464*, 356-370.

Nance,W.E. (2003). The genetics of deafness. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* *9*, 109-119.

Nao,T., Ohkusa,T., Hisamatsu,Y., Inoue,N., Matsumoto,T., Yamada,J., Shimizu,A., Yoshiga,Y., Yamagata,T., Kobayashi,S., Yano,M., Hamano,K., and Matsuzaki,M. (2003). Comparison of expression of connexin in right atrial myocardium in patients with chronic atrial fibrillation versus those in sinus rhythm. *Am. J. Cardiol.* *91*, 678-683.

Neuhaus,I.M., Dahl,G., and Werner,R. (1995). Use of alternate promoters for tissue-specific expression of the gene coding for connexin32. *Gene.* *158*, 257-262.

Nickel,R., Becker,D., and Forge,A. (2006). Molecular and functional characterization of gap junctions in the avian inner ear. *J. Neurosci.* *26*, 6190-6199.

Nielsen,P.A. and Kumar,N.M. (2003). Differences in expression patterns between mouse connexin-30.2 (Cx30.2) and its putative human orthologue, connexin-31.9. *FEBS Lett.* *540*, 151-156.

Nikaido,H. and Rosenberg,E.Y. (1985). Functional reconstitution of lens gap junction proteins into proteoliposomes. *J. Membr. Biol.* *85*, 87-92.

Odermatt,B., Wellershaus,K., Wallraff,A., Seifert,G., Degen,J., Euwens,C., Fuss,B., Bussow,H., Schilling,K., Steinhauser,C., and Willecke,K. (2003). Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS. *J. Neurosci.* *23*, 4549-4559.

## Literatur

Pal,J.D., Liu,X., Mackay,D., Shiels,A., Berthoud,V.M., Beyer,E.C., and Ebihara,L. (2000). Connexin46 mutations linked to congenital cataract show loss of gap junction channel function. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 279, C596-C602.

Palmiter,R.D., Brinster,R.L., Hammer,R.E., Trumbauer,M.E., Rosenfeld,M.G., Birnberg,N.C., and Evans,R.M. (1992). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. 1982. *Biotechnology.* 24:429-33., 429-433.

Panchin,Y., Kelmanson,I., Matz,M., Lukyanov,K., Usman,N., and Lukyanov,S. (2000). A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr. Biol.* 10, R473-R474.

Paul,D.L. (1986). Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell Biol.* 103, 123-134.

Paul,D.L., Ebihara,L., Takemoto,L.J., Swenson,K.I., and 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.

Paznekas,W.A., Boyadjiev,S.A., Shapiro,R.E., Daniels,O., Wollnik,B., Keegan,C.E., Innis,J.W., Dinulos,M.B., Christian,C., Hannibal,M.C., and Jabs,E.W. (2003). Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 408-418.

Perkins,G., Goodenough,D., and Sosinsky,G. (1997). Three-dimensional structure of the gap junction connexon. *Biophys. J.* 72, 533-544.

Perkins,G.A., Goodenough,D.A., and Sosinsky,G.E. (1998). Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons. *J. Mol. Biol.* 277, 171-177.

Phelan,P. and Starich,T.A. (2001). Innexins get into the gap. *Bioessays.* 23, 388-396.

Piffko,J., Homann,C., Schuon,R., Joos,U., and Meyer,U. (2003). [Experimental study on the biomechanical stability of different internal fixators for use in the mandible]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 7, 1-6.

Pina-Benabou,M.H., Srinivas,M., Spray,D.C., and Scemes,E. (2001). Calmodulin kinase pathway mediates the K<sup>+</sup>-induced increase in Gap junctional communication between mouse spinal cord astrocytes. *J. Neurosci.* 21, 6635-6643.

## Literatur

Plantard,L., Huber,M., Macari,F., Meda,P., and Hohl,D. (2003). Molecular interaction of connexin 30.3 and connexin 31 suggests a dominant-negative mechanism associated with erythrokeratoderma variabilis. *Hum. Mol. Genet.* 12, 3287-3294.

Plum,A., Hallas,G., and Willecke,K. (2002). Expression of the mouse gap junction gene *Gjb3* is regulated by distinct mechanisms in embryonic stem cells and keratinocytes. *Genomics.* 79, 24-30.

Potten,C.S. (1981). Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *Int. Rev. Cytol.* 69:271-318., 271-318.

Ransom,C.B. and Sontheimer,H. (1995). Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents in rat spinal cord astrocytes. *J. Neurophysiol.* 73, 333-346.

Reaume,A.G., de Sousa,P.A., Kulkarni,S., Langille,B.L., Zhu,D., Davies,T.C., Juneja,S.C., Kidder,G.M., Rossant,J. (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267, 1831-1834.

Reuss,B., Hellmann,P., Traub,O., Butterweck,A., and Winterhager,E. (1997). Expression of connexin31 and connexin43 genes in early rat embryos. *Dev. Genet.* 21, 82-90.

Revel,J.P. and Karnovsky,M.J. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* 33, C7-C12.

Richard,G., Smith,L.E., Bailey,R.A., Itin,P., Hohl,D., Epstein,E.H., Jr., DiGiovanna,J.J., Compton,J.G., and Bale,S.J. (1998). Mutations in the human connexin gene *GJB3* cause erythrokeratoderma variabilis. *Nat. Genet.* 20, 366-369.

Richard,G., Brown,N., Smith,L.E., Terrinoni,A., Melino,G., Mackie,R.M., Bale,S.J., and Uitto,J. (2000). The spectrum of mutations in erythrokeratodermias--novel and de novo mutations in *GJB3*. *Hum. Genet.* 106 , 321-329.

Richard,G. (2001). Human connexin disorders of the skin. *Cell Commun. Adhes.* 8, 401-407.

Richard,G., Brown,N., Rouan,F., Van der Schroeff,J.G., Bijlsma,E., Eichenfield,L.F., Sybert,V.P., Greer,K.E., Hogan,P., Campanelli,C., Compton,J.G., Bale,S.J., DiGiovanna,J.J., and Uitto,J. (2003). Genetic heterogeneity in erythrokeratoderma

## Literatur

variabilis: novel mutations in the connexin gene GJB4 (Cx30.3) and genotype-phenotype correlations. *J. Invest Dermatol.* 120, 601-609.

Richard,G., Brown,N., Ishida-Yamamoto,A., and Krol,A. (2004). Expanding the phenotypic spectrum of Cx26 disorders: Bart-Pumphrey syndrome is caused by a novel missense mutation in GJB2. *J. Invest Dermatol.* 123, 856-863.

Richard,G. (2005). Connexin disorders of the skin. *Clin. Dermatol.* 23, 23-32.

Richardson,R., Donnai,D., Meire,F., and Dixon,M.J. (2004). Expression of Gja1 correlates with the phenotype observed in oculodentodigital syndrome/type III syndactyly. *J. Med. Genet.* 41, 60-67.

Rieske,E., Schubert,P., and Kreutzberg,G.W. (1975). Transfer of radioactive material between electrically coupled neurons of the leech central nervous system. *Brain Res.* 84, 365-382.

Risek,B., Klier,F.G., and Gilula,N.B. (1992). Multiple gap junction genes are utilized during rat skin and hair development. *Development.* 116, 639-651.

Robinson,S.R., Hampson,E.C., Munro,M.N., and Vaney,D.I. (1993). Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *Science.* 262, 1072-1074.

Rodriguez,C.I., Buchholz,F., Galloway,J., Sequerra,R., Kasper,J., Ayala,R., Stewart,A.F., and Dymecki,S.M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat. Genet.* 25, 139-140.

Rouan,F., White,T.W., Brown,N., Taylor,A.M., Lucke,T.W., Paul,D.L., Munro,C.S., Uitto,J., Hodgins,M.B., and Richard,G. (2001). trans-dominant inhibition of connexin-43 by mutant connexin-26: implications for dominant connexin disorders affecting epidermal differentiation. *J. Cell Sci.* 114, 2105-2113.

Rouan,F., Lo,C.W., Fertala,A., Wahl,M., Jost,M., Rodeck,U., Uitto,J., and Richard,G. (2003). Divergent effects of two sequence variants of GJB3 (G12D and R32W) on the function of connexin 31 in vitro. *Exp. Dermatol.* 12, 191-197.

Saez,J.C., Connor,J.A., Spray,D.C., and Bennett,M.V. (1989). Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2708-2712.

## Literatur

Saez,J.C., Martinez,A.D., Branes,M.C., and Gonzalez,H.E. (1998). Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 593-600.

Saez,J.C., Contreras,J.E., Bukauskas,F.F., Retamal,M.A., and Bennett,M.V. (2003). Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS. *Acta Physiol Scand.* 179, 9-22.

Salomon,D., Saurat,J.H., and Meda,P. (1988). Cell-to-cell communication within intact human skin. *J. Clin. Invest.* 82, 248-254.

Saurat,J.H., Hirschel-Scholz,S., Salomon,D., and Siegenthaler,G. (1987). Human skin retinoid-binding proteins and therapy with synthetic retinoids: a still unexplained link. *Dermatologica.* 175 *Suppl 1*:13-9., 13-19.

Smith,F.J., Morley,S.M., and McLean,W.H. (2002). A novel connexin 30 mutation in Clouston syndrome. *J. Invest Dermatol.* 118, 530-532.

Sohl,G., Degen,J., Teubner,B., and 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.

Sohl,G., Eiberger,J., Jung,Y.T., Kozak,C.A., and Willecke,K. (2001). The mouse gap junction gene connexin29 is highly expressed in sciatic nerve and regulated during brain development. *Biol. Chem.* 382, 973-978.

Sohl,G., Theis,M., Hallas,G., Brambach,S., Dahl,E., Kidder,G., and Willecke,K. (2001). A new alternatively spliced transcript of the mouse connexin32 gene is expressed in embryonic stem cells, oocytes, and liver. *Exp. Cell Res.* 266, 177-186.

Sohl,G., Nielsen,P.A., Eiberger,J., and Willecke,K. (2003). Expression profiles of the novel human connexin genes hCx30.2, hCx40.1, and hCx62 differ from their putative mouse orthologues. *Cell Commun. Adhes.* 10, 27-36.

Sohl,G. and Willecke,K. (2003). An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun. Adhes.* 10, 173-180.

Spray,D.C., White,R.L., Mazet,F., and Bennett,M.V. (1985). Regulation of gap junctional conductance. *Am. J. Physiol.* 248, H753-H764.

Spray,D.C., Moreno,A.P., Kessler,J.A., and Dermietzel,R. (1991). Characterization of gap junctions between cultured leptomeningeal cells. *Brain Res.* 568, 1-14.

## Literatur

Spray,D.C., Bai,S., Burk,R.D., and Saez,J.C. (1994). Regulation and function of liver gap junctions and their genes. *Prog. Liver Dis.* 12:1-18., 1-18.

Swenson,K.I., Jordan,J.R., Beyer,E.C., and Paul,D.L. (1989). Formation of gap junctions by expression of connexins in *Xenopus* oocyte pairs. *Cell.* 57, 145-155.

Temme,A., Buchmann,A., Gabriel,H.D., Nelles,E., Schwarz,M., and Willecke,K. (1997). High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr. Biol.* 7, 713-716.

Terrinoni,A., Leta,A., Pedicelli,C., Candi,E., Ranalli,M., Puddu,P., Paradis,M., Angelo,C., Bagetta,G., and Melino,G. (2004). A novel recessive connexin 31 (GJB3) mutation in a case of erythrokeratoderma variabilis. *J. Invest Dermatol.* 122, 837-839.

Teubner,B., Odermatt,B., Guldenagel,M., Sohl,G., Degen,J., Bukauskas,F., Kronengold,J., Verselis,V.K., Jung,Y.T., Kozak,C.A., Schilling,K., and Willecke,K. (2001). Functional expression of the new gap junction gene connexin47 transcribed in mouse brain and spinal cord neurons. *J. Neurosci.* 21, 1117-1126.

Teubner,B., Michel,V., Pesch,J., Lautermann,J., Cohen-Salmon,M., Sohl,G., Jahnke,K., Winterhager,E., Herberhold,C., Hardelin,J.P., Petit,C., and Willecke,K. (2003). Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum. Mol. Genet.* 12, 13-21.

Traub,O. and Willecke,K. (1982). Cross reaction of antibodies against liver gap junction protein (26K) with lens fiber junction protein (MIP) suggests structural homology between these tissue specific gene products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109, 895-901.

Traub,O., Janssen-Timmen,U., Druge,P.M., Dermietzel,R., and Willecke,K. (1982). Immunological properties of gap junction protein from mouse liver. *J. Cell Biochem.* 19, 27-44.

Trexler,E.B., Bennett,M.V., Bargiello,T.A., and Verselis,V.K. (1996). Voltage gating and permeation in a gap junction hemichannel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5836-5841.

Trexler,E.B., Bukauskas,F.F., Bennett,M.V., Bargiello,T.A., and Verselis,V.K. (1999). Rapid and direct effects of pH on connexins revealed by the connexin46 hemichannel preparation. *J. Gen. Physiol.* 113, 721-742.

## Literatur

Trosko, J.E. and Ruch, R.J. (1998). Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci.* 3:d208-36., d208-d236.

Unger, V.M., Kumar, N.M., Gilula, N.B., and Yeager, M. (1999). Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science.* 283, 1176-1180.

Unwin, P.N. and 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.

Uyguner, O., Tukul, T., Baykal, C., Eris, H., Emiroglu, M., Hafiz, G., Ghanbari, A., Baserer, N., Yuksel-Apak, M., and Wollnik, B. (2002). The novel R75Q mutation in the GJB2 gene causes autosomal dominant hearing loss and palmoplantar keratoderma in a Turkish family. *Clin. Genet.* 62, 306-309.

Valdimarsson, G. and Kidder, G.M. (1995). Temporal control of gap junction assembly in preimplantation mouse embryos. *J. Cell Sci.* 108, 1715-1722.

Van Geel, M., Van Steensel, M.A., Kuster, W., Hennies, H.C., Happle, R., Steijlen, P.M., and Konig, A. (2002). HID and KID syndromes are associated with the same connexin 26 mutation. *Br. J. Dermatol.* 146, 938-942.

Van Steensel, M.A., Van Geel, M., and Steijlen, P.M. (2002). New syndrome of hypotrichosis, striate palmoplantar keratoderma, acro-osteolysis and periodontitis not due to mutations in cathepsin C. *Br. J. Dermatol.* 147, 575-581.

Van Steensel, M.A., Spruijt, L., van, d.B., I, Bladergroen, R.S., Vermeer, M., Steijlen, P.M., and Van Geel, M. (2005). A 2-bp deletion in the GJA1 gene is associated with oculodento-digital dysplasia with palmoplantar keratoderma. *Am. J. Med. Genet. A.* 132, 171-174.

Van Steensel, M.A. and Van Geel, M. (2005). Does recessive EKV exist? *J. Invest Dermatol.* 124, 268-269.

van Veen, A.A., van Rijen, H.V., and Opthof, T. (2001). Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc. Res.* 51, 217-229.

VanSlyke, J.K., Deschenes, S.M., and Musil, L.S. (2000). Intracellular transport, assembly, and degradation of wild-type and disease-linked mutant gap junction proteins. *Mol. Biol. Cell.* 11, 1933-1946.

## Literatur

Verselis,V.K., Ginter,C.S., and Bargiello,T.A. (1994). Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. *Nature*. 368, 348-351.

von Maltzahn,J., Euwens,C., Willecke,K., and Sohl,G. (2004). The novel mouse connexin39 gene is expressed in developing striated muscle fibers. *J. Cell Sci.* 117, 5381-5392.

Wang,X.G. and 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.* 271, C1743-C1749.

Watterson,J.M., Watson,D.G., Meyer,E.M., and Lenox,R.H. (2002). A role for protein kinase C and its substrates in the action of valproic acid in the brain: implications for neural plasticity. *Brain Res.* 934, 69-80.

Weidmann,S. (1952). The electrical constants of Purkinje fibres. *J. Physiol.* 118, 348-360.

White,T.W., Bruzzone,R., Goodenough,D.A., and 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.

Wilgoss,A., Leigh,I.M., Barnes,M.R., Dopping-Hepenstal,P., Eady,R.A., Walter,J.M., Kennedy,C.T., and Kelsell,D.P. (1999). Identification of a novel mutation R42P in the gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant erythrokeratoderma variabilis. *J. Invest Dermatol.* 113, 1119-1122.

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

Willecke,K., Heynkes,R., Dahl,E., Stutenkemper,R., Hennemann,H., Jungbluth,S., Suchyna,T., and Nicholson,B.J. (1991). Mouse connexin37: cloning and functional expression of a gap junction gene highly expressed in lung. *J. Cell Biol.* 114, 1049-1057.

Willecke,K., Eiberger,J., Degen,J., Eckardt,D., Romualdi,A., Guldenagel,M., Deutsch,U., and Sohl,G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* 383, 725-737.

## Literatur

Williams,R.L., Hilton,D.J., Pease,S., Willson,T.A., Stewart,C.L., Gearing,D.P., Wagner,E.F., Metcalf,D., Nicola,N.A., Gough,N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.

Xu,X., Li,W.E., Huang,G.Y., Meyer,R., Chen,T., Luo,Y., Thomas,M.P., Radice,G.L., and Lo,C.W. (2001). N-cadherin and Cx43alpha1 gap junctions modulates mouse neural crest cell motility via distinct pathways. *Cell Commun. Adhes.* 8, 321-324.

Yeager,M. and Nicholson,B.J. (1996). Structure of gap junction intercellular channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 183-192.

Yeager,M., Unger,V.M., and Falk,M.M. (1998). Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 517-524.

Yotsumoto,S., Hashiguchi,T., Chen,X., Ohtake,N., Tomitaka,A., Akamatsu,H., Matsunaga,K., Shiraishi,S., Miura,H., Adachi,J., and Kanzaki,T. (2003). Novel mutations in GJB2 encoding connexin-26 in Japanese patients with keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Br. J. Dermatol.* 148, 649-653.

Zhang,J.T. and Nicholson,B.J. (1994). The topological structure of connexin 26 and its distribution compared to connexin 32 in hepatic gap junctions. *J. Membr. Biol.* 139, 15-29.

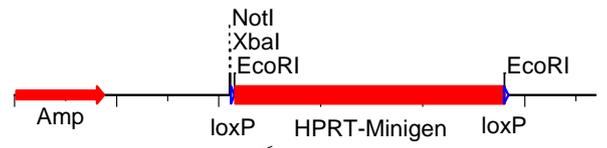
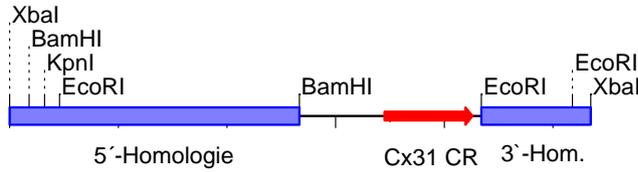
Zhang,X.J., Chen,J.J., Yang,S., Cui,Y., Xiong,X.Y., He,P.P., Dong,P.L., Xu,S.J., Li,Y.B., Zhou,Q., Wang,Y., and Huang,W. (2003). A mutation in the connexin 30 gene in Chinese Han patients with hidrotic ectodermal dysplasia. *J. Dermatol. Sci.* 32, 11-17.

9 Anhang

Klonierungsstrategie des Cx31F137L Mausvektors

**Gx2 XbaI Fragment** (5341 bps)

**lox-HPRT-lox del Xba** (5693 bps)

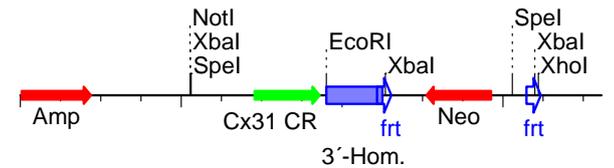
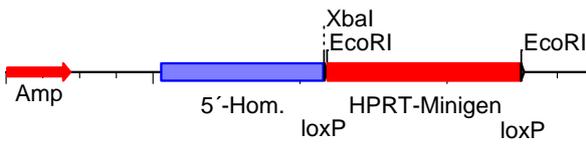


EcoRI, BamHI;  
blunt

NotI; blunt; SAP

**A1'** (7905 bps)

**B2** (7214 bps) (nächste Seite)

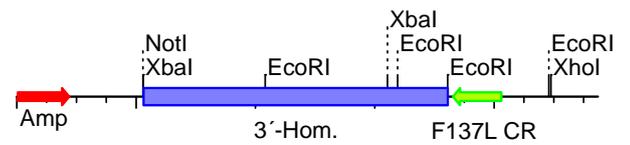
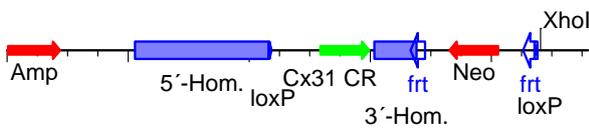


EcoRI  
blunt; SAP

NotI, XhoI; blunt

**A'B** (9592 bps)

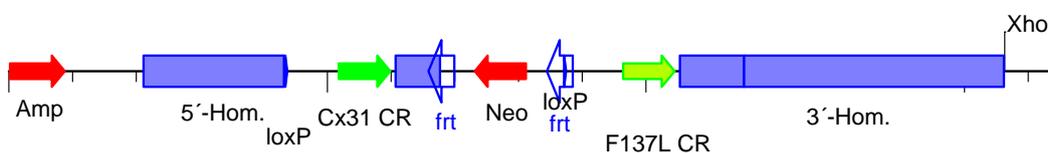
**C2** (9701 bps) (übernächste Seite)



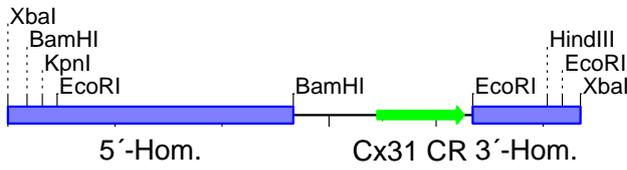
XhoI;  
blunt; SAP

Clal, NotI; blunt

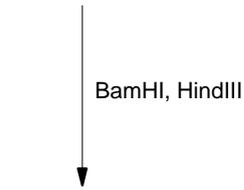
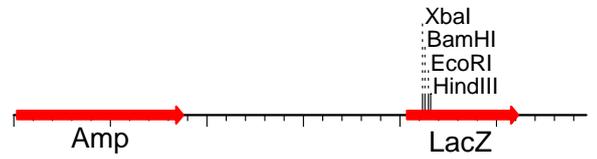
**A'BC** (16394 bps)



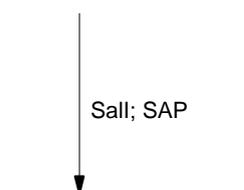
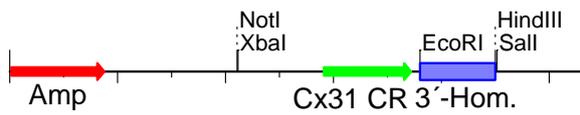
**Gx2 XbaI Fragment** (5341 bps)



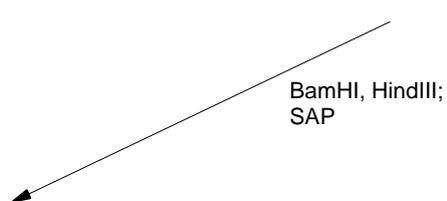
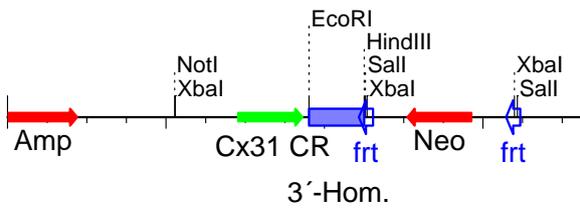
**pBSK** (2961 bps)



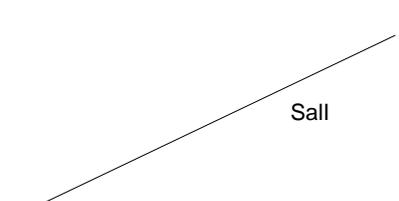
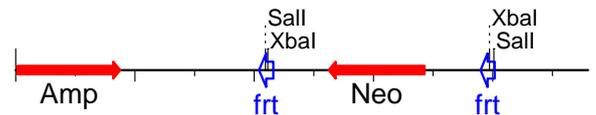
**B1** (5300 bps)



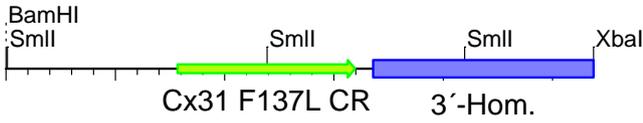
**B2** (7214 bps)



**pBSK:frt-NEO-frt** (4796 bps)

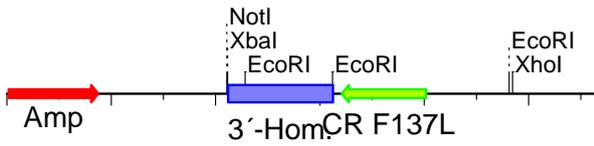


**F137L BamHI/XbaI-Fragment (2677 bps)**



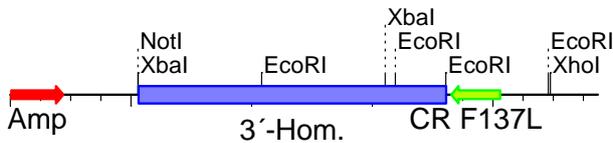
BamHI, XbaI

**C1 (5626 bps)**

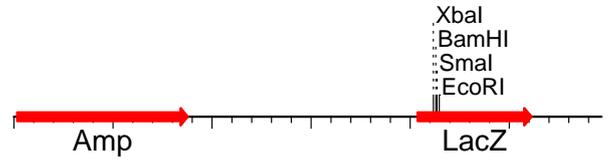


XbaI; SAP

**C2 (9701 bps)**

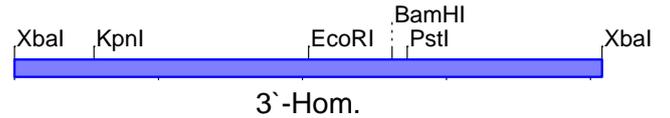


**pBSK (2961 bps)**



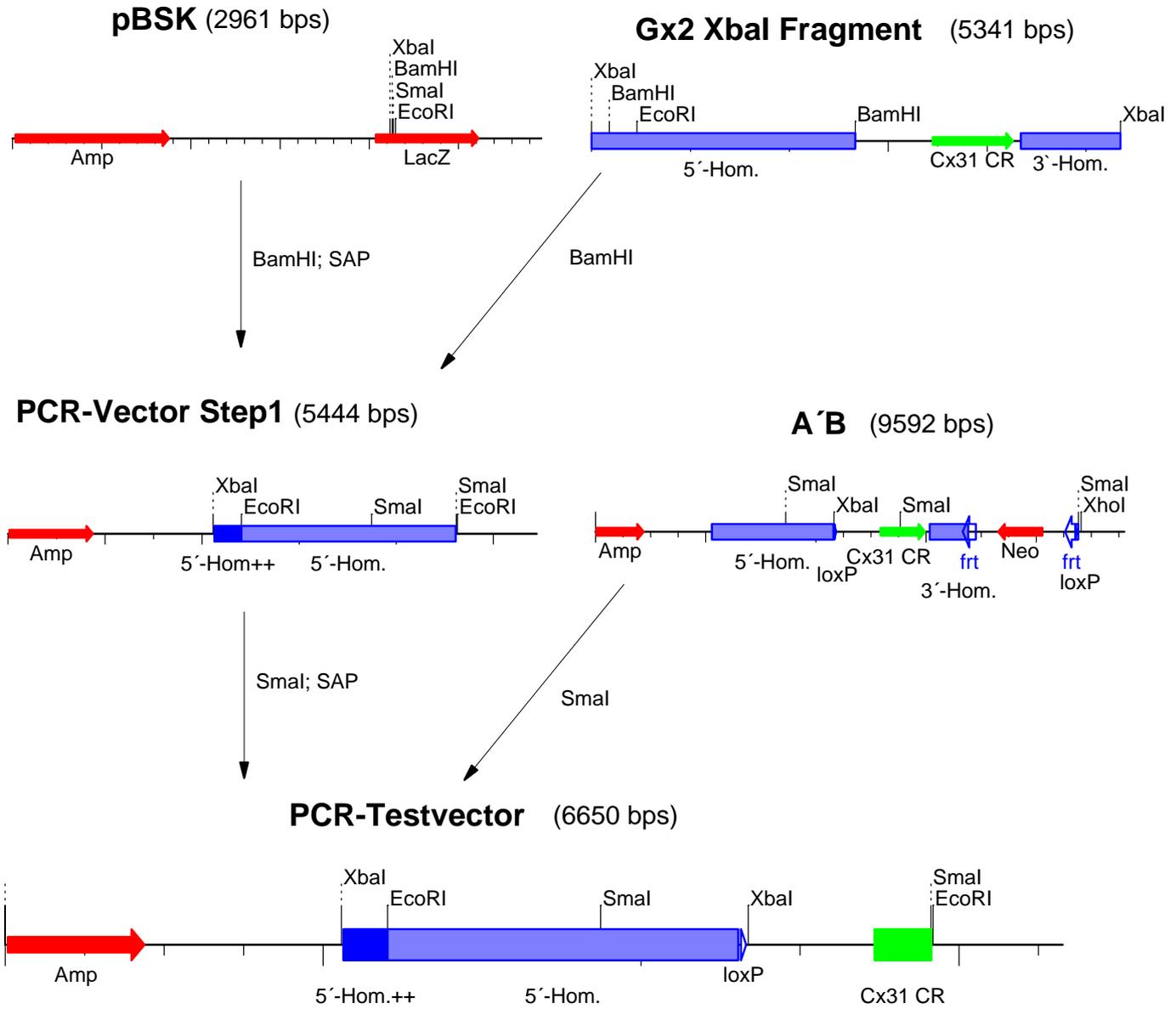
BamHI, XbaI; SAP

**Gx1 XbaI-Fragment (4075 bps)**

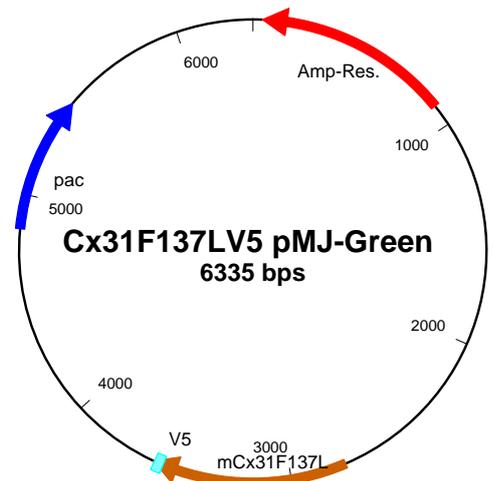
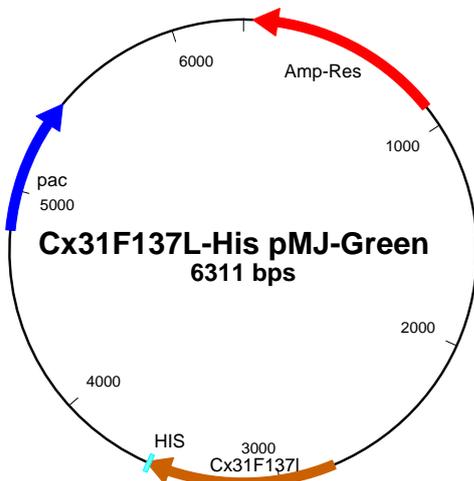
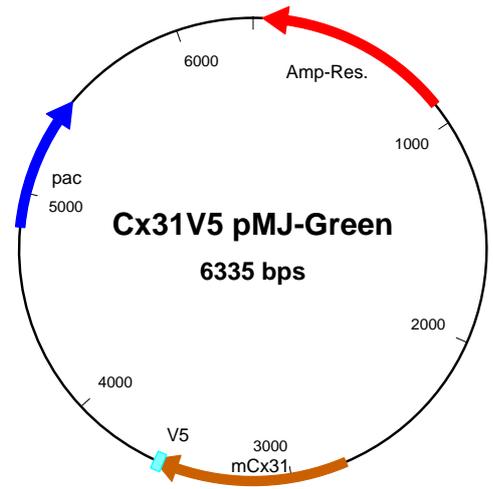
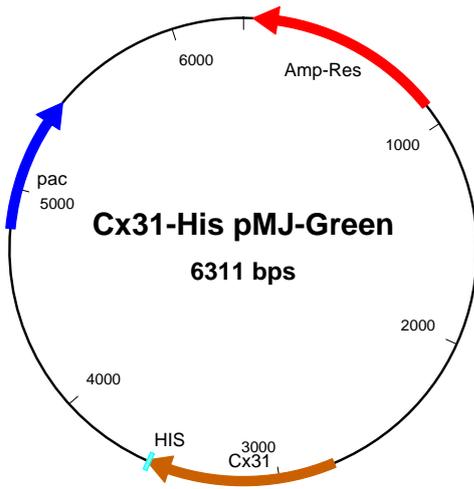
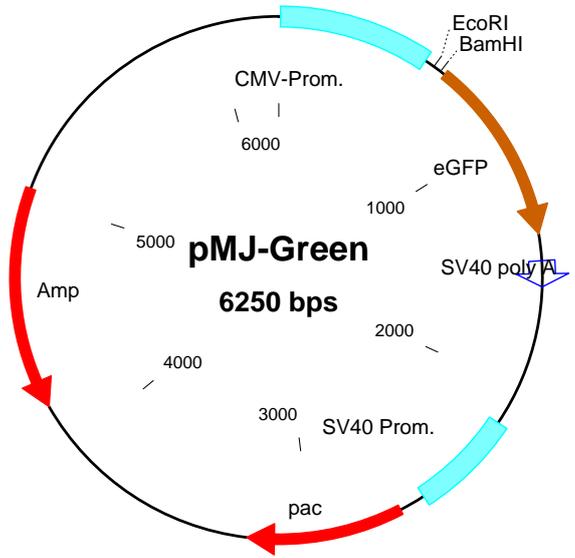
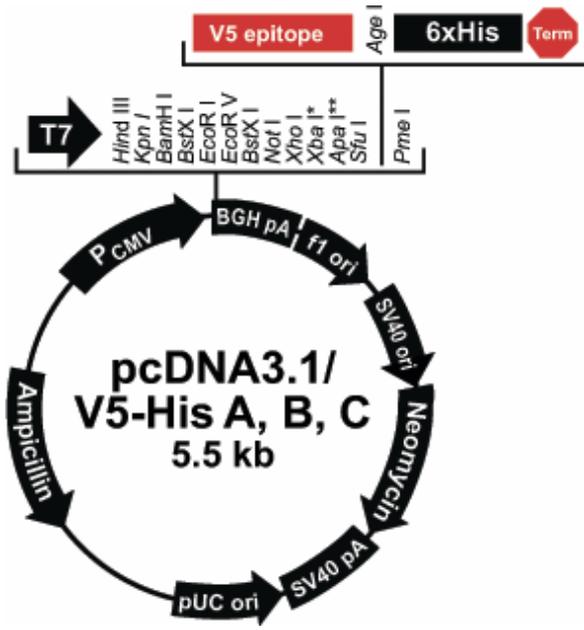


XbaI

**Klonierungsstrategie des Cx31F137L PCR-Kontrollvektors**



Anhang



## Anhang

### PCR Programme:

#### Cx31KO PCR

H <sub>2</sub> O	18 µl
10x Puffer	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> 25mM	2.0 µl
Primer A (GT 1)	0.2 µl
Primer B (GT 2)	0.1 µl
Primer C (GT 3)	0.1 µl
dNTP's	0.5 µl

Alle Primer 100pmol/µl

GoTaq (Promega)	0.5 µl
-----------------	--------

→24 µl PCR Reaktions-Mix und 1µl DNS

Programm:

- 1) 94°C 5 min
- 2) 94°C 45 sec
- 3) 69°C 45 sec
- 4) 72°C 45 sec
- 5) goto 2 34x
- 6) 72°C 7 min
- 7) store at 4°C forever

Primer Sequenzen:

GT1	CTG GAC TCT GAC ATG TGC ACA TAC
GT2	CTA CAT GCA GGA TGA CCA GCA TAG
GT3	CCA CAG TAG AAA CGC CGA GTT AAC

Gel: 1 % Agarose

Banden: WT: 450 bp  
KO: 600 bp

## Anhang

### Cx31 CR PCR mit anschließendem Verdau zum Nachweis der Mutation

H <sub>2</sub> O	25 µl
Primer A (Cx31CR_For)	0.4 µl
Primer B (Cx31CR_Rev)	0.4 µl
Alle Primer 100pmol/µl	
RedTaqMix (Sigma)	0.5 µl

→49 µl PCR Reaktions-Mix und 1µl DNS

Programm:

- 1) 94°C 4 min
- 2) 94°C 30 sec
- 3) 55°C 60 sec
- 4) 72°C 60 sec
- 5) goto 2 34x
- 6) 72°C 10 min
- 7) store at 4°C forever

Primer Sequenzen:

Cx31CR_For	GTT CCC TCA GGT GGG CAC AGC
Cx31CR_Rev	CGG CTT CAC CCC TTC TCT AGC

Verdauansatz zum PCR Reaktionsansatz hinzugegeben:

5 µl Buffer 4 (NEB)  
1 µl *Sml*  
5 µl BSA

Inkubation für 2 h bei 55°C

Gel: 1.5% Agarose

Banden: WT: 809 bp  
Mutation: 408 + 401 bp

## Anhang

### Cx31 F137L PCR

H<sub>2</sub>O 15,5µl  
5x Puffer 5 µl  
MgCl<sub>2</sub> 25mM 2.5 µl  
dNTP's 2mM each 0.2 µl

Primer A (GenotypCreFor) 0.2 µl  
Primer B (Cx31hmrev) 0.2 µl  
Primer C (GenotypCreRev) 0.2 µl  
Alle Primer 100pmol/µl

Taq-Polymerase (Promega) 0.2 µl

→24µl PCR Reaktions-Mix und 1µl DNS

Programm:

- 1) 94°C 4 min
- 2) 94°C 30 sec
- 3) 60°C 45 sec
- 4) 72°C 60 sec
- 5) goto 2 34x
- 6) 72°C 10 min
- 7) store at 4°C forever

Primer Sequenzen:

Mausprimer_For Genotyp_Cre_For	CTC AAA GCT AGT CTG AGA TGC
Mausprimer_Rev_1 Cx31_hom_Rev	TAG TTC TAG AGC GGC CAA TTC
Mausprimer_Rev_2 Genotyp_Cre_Rev	GCA TCA CAA GGC TCC TAA GAA

Gel: 1.5% Agarose

Banden: WT: 500 bp  
homolog rekombiniert (vor Cre Aktivität): 347bp + 569 bp  
F137L aktiv (nach Cre Aktivität): 651

## Anhang

### Cx31 F137L NEO PCR

H<sub>2</sub>O 16.4 µl  
10x Puffer 2.5 µl  
MgCl<sub>2</sub> 25mM 2.5 µl  
dNTP's 2mM each 0.5 µl

Primer A (Neo\_For\_neu) 0.2 µl  
Primer B (Neo\_Rev\_1) 0.2 µl  
Primer C (Neo\_Rev\_2) 0.2 µl  
Alle Primer 100pmol/µl

Taq-Polymerase (Promega) 0.5 µl- 0.25 µl

→23µl PCR Reaktions-Mix und 2µl DNS

Programm:

- 1) 94°C 4 min
- 2) 94°C 30 sec
- 3) 60°C 45 sec
- 4) 72°C 60 sec
- 5) goto 2 34x
- 6) 72°C 10 min
- 7) store at 4°C forever

Primer Sequenzen:

Neo For neu	CGT ATA TCC TTG ACA TAT CCA
Neo Rev 1	GAA GTT TTT CCT GTC ATA CTT
Neo Rev 2	TTC GAG GTC GAC TCC ACC GCG

Gel: 1.5% Agarose

Banden: mit NEO-Kassette: 645 bp  
ohne NEO-Kassette: 249 bp

## Anhang

### PCR-Programm: F137L-ES

zuvor ProteinaseK durch Inkubation der ES-Lysate bei 94°C für 15 Minuten inaktivieren!!!

#### PCR-Ansatz:

Primer For	0,4 µl
Primer Rev	0,4 µl
Wasser	14,2 µl
DNA	10 µl
RedTaqMix (Sigma)	25 µl

→49µl PCR Reaktions-Mix und 10µl DNS

#### Programm:

01	Deckel	110°C
02	Temperatur	94°C 3 min
03	Schleife [35x	
04	Temperatur	94°C 1 min
05	Temperatur	66°C 3 min
06	Temperatur	72°C 1 min
07	Schleife ]	
08	Temperatur	72°C 10 min
09	Temperatur	18°C 10 min
10	Lagern bei	8°C

#### Primer Sequenzen:

Cx31_hom_Rev	TAG TTC TAG AGC GGC CAA TTC
Cx31_hom_For3	CGA AGA TTC TTG CAG TAA TCC A

Gel: 1 % Agarose

Banden: Bei homologer Rekombination: 2kb

## Anhang

### Cx 30.3KO-PCR

H<sub>2</sub>O 37.4 µl  
10x Puffer 5 µl  
MgCl<sub>2</sub> 25mM 4 µl  
dNTP's 2mM each 0.5 µl

QZ13 (100pmol/µl) 0.2 µl  
QZ14 (100pmol/µl) 0.2 µl  
QZ15 (100pmol/µl) 0.2 µl  
Alle Primer 100pmol/µl

*Taq*-polymerase (Promega) 0.5 µl

→48µl PCR Reaktions-Mix und 2µl DNS

Programm:

- 1) 95°C 5 min
- 2) 94°C 30 sec
- 3) 60°C 45 sec
- 4) 72°C 60 sec
- 5) goto 2 34x
- 6) 72°C 10 min
- 7) store at 4°C forever

Primer Sequenzen:

QZ13: NLS-LacZ	AAC GAC GGG ATC ATC GCG AGC CAT
QZ14: 5'-HR Cx30.3	GGC CAA GGT TCA AGA CCA CCT GTG
QZ15: CR Cx30.3	CCC CTC TTC TTG CTC AGG TTG CTG

Gel: 1.5% Agarose

Banden: WT: 672 bp  
KO: 359 bp

## Anhang

### Cx31.1 KO PCR

H<sub>2</sub>O 37.4 µl  
10x buffer 5,4 µl  
MgCl<sub>2</sub> 25mM 4 µl  
dNTP's 2mM each 0.5 µl

primer A (QZ1) 0.2 µl  
primer B (QZ13) 0.2 µl  
primer C (QZ17) 0.2 µl  
Alle Primer 100pmol/µl

GoTaq-polymerase (Promega) 0.1 µl- 0.25 µl

→48µl PCR Reaktions-Mix and 2µl DNS

Programm:

- 1) 95°C 5 min
- 2) 95°C 30 sec
- 3) 60°C 45 sec
- 4) 72°C 45 sec
- 5) goto 2 34x
- 6) 72°C 10 min
- 7) store at 4°C forever

Primer Sequenzen:

QZ 1	CTG CTT GTT CTG GGG AGC CTC TTG
QZ 13	AAC GAC GGG ATC ATC GCG AGC CAT
QZ 17	AGG TGA CCA GGA TGA GCT GCA GAG

Gel: 1% Agarose

Banden: WT: 750 bp  
KO: 500 bp

**Kongressteilnahmen:**

- 2006 April: „3. Internationales Keratinozytensymposium“ Bonn, Poster; Posterpreis  
„Generation of a novel Connexin F137L mutant mouse as a model for the  
human disease Erythrokeratoderma variabilis (EKV)“
- Februar: „Jahrestagung des Bonner Forums Biomedizin“, Bad Breisig, Poster  
„Generation of a novel Connexin F137L mutant mouse as a model for the  
human disease Erythrokeratoderma variabilis (EKV)“
- 2005 August: International Gap Junction Conference, Whistler, Kanada, Vortrag  
“Novel functions of Cx31.1 and Cx30.3 in the mouse”
- 2004 April: „2. Internationales Keratinozytensymposium“ Bonn

**Unterstützung:**

- 2005 Reisekostenzuschuss zur internationalen Gap Junction Conference durch die  
Firma Promega

## **Erklärung**

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

---

Marc Schnichels

Bonn, im August 2006