

**Charakterisierung einer konditional
Connexin36-defizienten Mausmutante
sowie
Vorversuche zur funktionellen Analyse von
Horizontalzellen in der Retina**

Dissertation

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

vorgelegt von
Kerstin Wellershaus
aus Wuppertal

Bonn 2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Willecke
Zweitgutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann

Tag der Promotion: 29. Januar 2007
Erscheinungsjahr: 2007

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Willecke
Zweitgutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann

Tag der Promotion: _____

Erscheinungsjahr: 2007

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen:

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Klaus Willecke bedanke ich mich herzlich für die Ermöglichung dieser Dissertation und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die unermüdlichen Ratschläge. Das Gefühl, sich in seinem Labor „am Puls der Gap Junction-Forschung“ zu befinden, hat mich immer sehr motiviert.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann danke ich für die Übernahme des Koreferats sowie Frau PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert und Herrn Prof. Dr. Karl Schilling für ihre Teilnahme an der Promotionskommission als fachnahe Gutachterin und fachangrenzender Gutachter.

Prof. Dr. Peter Propping sei gedankt für sein Engagement im Graduiertenkolleg 246 der DFG „Pathogenese von Krankheiten des Nervensystems“, über das ich ein Stipendium für diese Arbeit erhielt.

Dr. Joachim Degen danke ich für die Überlassung des Cx36-Projektes sowie Dr. Thorsten Buch für die „Starthilfe“ bei dem DTR/DT-Projekt. Ihre Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik trugen erheblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ein großer Dank geht an die Mitglieder auswärtiger Arbeitsgruppen, die im Rahmen von Kooperationen die Richtung der vorliegenden Doktorarbeit mitbestimmt haben: Prof. Dr. James Deuchars, Leeds, England; Prof. Dr. Reto Weiler, Prof. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold, Dr. Timm Schubert und Dr. Karin Dedek, Oldenburg; Prof. Dr. Chris De Zeeuw und Ruben van der Giessen, Rotterdam, Niederlande; Prof. Dr. James Nagy, Winnipeg, Manitoba/Kanada; Prof. Dr. Paolo Meda, Genf, Schweiz.

Ein großes Dankeschön gilt Christine Siegmund für ihre tatkräftige Unterstützung als technische Assistentin und die nette Zusammenarbeit. Ihr sowie Gaby Schwarz und Melanie Jokwitz habe ich zu verdanken, dass der *DTR^{frt}Cre*-Austauschvektor noch „just in time“ fertig gestellt wurde. Vielen Dank auch an meine fleißigen Laborblöckler Melanie Schütz und Christian Krätzer! Michael Lange sei gedankt für seine kompetente Hilfe bei allen computertechnischen Problemen.

Als kritischen Lesern dieser Arbeit danke ich Dr. Stephan Maxeiner, Dr. Joachim Degen, Dr. Tanja Auth und Stephan Sonntag.

Bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern, insbesondere denen des „Doc-Labors“, aber auch bei der gesamten Arbeitsgruppe Willecke und Arbeitsgruppe Scheidtmann möchte ich mich für die enorme Hilfsbereitschaft, das fantastische Arbeitsklima und die vielen tollen Grill- und Kinoabende bedanken. Die Zeit mit Euch war großartig!

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern sage ich von ganzem Herzen danke für ihre moralische und finanzielle Unterstützung während des Studiums, die ermutigenden Worte und das Vertrauen, das sie mir jederzeit entgegenbrachten.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin(-Resistenzgen)
ÄNS	Äußere Nukleäre Schicht (der Retina)
APS	Ammoniumpersulfat
ÄPS	Äußere Plexiforme Schicht (der Retina)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
A _x	Absorption bei Licht der Wellenlänge x in nm
BCI	Blastozysteninjektion (<i>blastocyst injection</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNS	DNS-Kopie einer RNS (<i>copy DNS</i>)
CFP	zyan fluoreszierendes Protein (<i>cyan fluorescent protein</i>)
Ci	Curie ($3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle/sec)
CL	zytoplasmatische Schleife (<i>cytoplasmic loop</i>)
cm	Zentimeter
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CT	Carboxy-Terminus, C-Terminus
Cx	Connexin
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
dpc	Tage nach der Befruchtung (<i>dies post coitum</i>)
DSP	<i>downstream primer</i>
DT	Diphtherietoxin
DTT	Dethiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
ES-Zellen	embryonale Stammzellen (der Maus)
et al.	et altera
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
G	Guanin
g	Gramm
G418	Gentamycin418
HCx	HeLa-Cx
HPRT	Hypoxanthinphosphoribosyl-Transferase
HR	Homologe Region

HWT	HeLa-Wildtyp
HRP	Meerrettich-Peroxidase, <i>horse radish peroxidase</i>
IB	Immunoblot
IF	Immunfluoreszenz
ind.	induziert
INS	Innere Nukleäre Schicht (der Retina)
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPS	Innere Plexiforme Schicht (der Retina)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
Lsg.	Lösung
LSM	Laser Scan-Mikroskop
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	Vielfachklonierungsstelle
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNS	Boten-RNS
MudPIT	Multidimensionale Proteinidentifikations-Technology
N	Normalität
n.a.	nicht analysiert
NEM	N-Ethyl-Maleinimid
neoR	Neomycin-Resistenzgen
Neurobiotin	N-(2-aminoethyl)-biotinamid
ng	Nanogramm
n-ind.	nicht-induziert
NK	Negativkontrolle
nls	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localisation signal</i>)
nm	Nanometer
OD _x	optische Dichte bei Licht einer Wellenlänge von x nm
p	Plasmid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglyzeratkinase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PK	Positivkontrolle
PNS	Peripheres Nervensystem
polyA-Signal	Polyadenylierungssignal
PrP	Prionprotein
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur, seltener: Reverse Transkription
SAP	Alkalische Phosphatase aus Krabben (<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunden
SSC	Trinatriumzitat
SV40	Simianvirus 40
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tam	Tamoxifen
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TT	Transiente Transfektion
U	Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
USP	<i>upstream primer</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Gap Junction-Kanäle	1
1.2	Connexine – Proteinuntereinheiten der Gap Junction-Kanäle	3
1.3	Die Diversität der Connexine	3
1.3	Funktion von Gap Junction-Kanälen	4
1.4	Regulation von Gap Junction-vermittelter Kommunikation	6
1.5	Gap Junction-Halbkanäle	7
1.6	Connexine und Gap Junction-Kanäle im Zentralen Nervensystem	8
1.6.1	Neurone	9
1.7	Die Retina	9
1.8	Connexin36	11
1.8.1	Cx36 in der Retina	12
1.8.2	Cx36 im olivocerebellären System	13
1.9	Connexin57	14
1.9.1	Cx57 in der Retina	14
1.9.2	Die ephaptische Synapse	15
1.10	Erzeugung genetisch veränderter Mäuse und Werkzeuge zur Manipulation der Maus	16
1.10.1	Das <i>Cre/loxP</i> -System	17
1.10.2	Das <i>DTR/DT</i> -System	19
1.11	Ziel dieser Arbeit	20
2	MATERIAL	21
2.1	Allgemeine Chemikalien und Reagenzien	21
2.2	Allgemeine Labor- und Zellkulturmaterialien	21
2.3	Allgemeine Lösungen	21
2.4	Lösungen für die Nukleinsäureanalytik	22
2.5	Medien und Lösungen für die Bakterienkultur	23
2.6	Medien und Lösungen für die Kultur von HeLa-, N2A- und HM1-Zellen	24
2.7	Lösungen für die Narkose von Mäusen und die Superovulation von Mäuseweibchen	26
2.8	Lösungen für die Proteinanalytik	26
2.9	Lösungen für die β -Galaktosidase-Nachweisreaktion	29
2.10	Kommerzielle Reagenziensätze	29
2.11	Geräte	30
2.12	Oligonukleotid-Startermoleküle für die Polymerase-Kettenreaktion	30
2.13	Größenstandards	32
2.14	Rekombinante Plasmide	33

2.15	Bakterienstämme	34
2.16	Zelllinien	34
2.17	Mauslinien	34
2.18	Kommerzielle Antikörper	35
3	METHODEN	36
3.1	Nukleinsäureanalytik	36
3.1.1	DNS-Präparation	36
3.1.1.1	Analytische Plasmid-Isolierung (Minipräparation) aus Bakterien	36
3.1.1.2	Präparative Plasmid-Isolierung (Midipräparation) aus Bakterien	37
3.1.1.3	Endotoxinfreie Plasmid-Isolierung (Maxipräparation) aus Bakterien	37
3.1.1.4	Isolierung genomischer DNS aus embryonalen Stammzellen	37
3.1.1.5	Isolierung genomischer DNS aus der Schwanzspitze und den Retinae von Mäusen	38
3.1.1.6	Isolierung von genomischer DNS aus der Niere von Mäusen	38
3.1.2	Agarose-Gelelektrophorese zur Größenfraktionierung nativer DNS	38
3.1.3	RNS-Präparation aus Gehirnen und Retinae von Mäusen	39
3.1.4	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese zur RNS-Größenfraktionierung	40
3.1.5	Natriumacetat-Fällung von Nukleinsäuren	40
3.1.6	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	41
3.1.7	Reverse Transkription/RT-PCR	41
3.1.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
3.1.9	Southern Blot- und Northern Blot-Analyse	47
3.1.9.1	Gewinnung von Membranen mit immobilisierten Restriktionsfragmenten genomischer DNS	47
3.1.9.2	Gewinnung von Membranen mit immobilisierter Gesamt-RNS	47
3.1.9.3	Herstellung einer radioaktiv markierten DNS-Sonde	48
3.1.9.5	Hybridisierung immobilisierter Nukleinsäuren mit einer radioaktiv markierten Sonde	48
3.1.9.6	Regenerierung von radioaktiv markierten Membranen	49
3.2	Herstellung rekombinanter Plasmide	49
3.2.1	Spaltung doppelsträngiger DNS mit Restriktionsendonukleasen	49
3.2.2	Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen	50
3.2.3	Dephosphorylierung von Vektorenden	50
3.2.4	Ligation überhängender, kohäsiver Enden	50
3.2.5	Klonierung von PCR-Fragmenten	51
3.2.6	Herstellung kurzer synthetischer DNS-Fragmente	51
3.2.7	Herstellung transformationskompetenter Bakterien und Transformation	51
3.2.8	Identifizierung rekombinanter Klone	52
3.2.9	Anlegen von Glyzerinkulturen	53
3.3	Kultivierung von adhärent wachsenden Säugerzelllinien	53
3.3.1	Kultivierung von HeLa- und N2A-Zellen	53
3.3.2	Einfrieren und Auftauen von HeLa- und N2A-Zellen	54

3.3.3	Kultivierung von HM1-Zellen	54
3.3.4	Einfrieren und Auftauen von HM1-Zellen	55
3.3.5	Transiente Transfektion von HeLa-, N2A- und HM1-Zellen mittels Lipofektion	55
3.3.6	Stabile Transfektion von HM1-Zellen mittels Elektroporation	56
3.3.7	Selektion von HM1-Zellen auf stabile Integration und homologe Rekombination	56
3.3.8	Karyotyp-Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone	57
3.3.9	Vorbereitung der ES-Zellen für die Blastozysteninjektion	58
3.4	Blastozysteninjektion, Uterustransfer und Test auf Keimbahngängigkeit	58
3.1.4	Zucht- und Haltungsbedingungen von Versuchsmäusen	58
3.4.2	Gewinnung von Blastozysten	59
3.4.3	Scheinschwangere Empfängertiere	59
3.4.4	Test auf Keimbahntransmission	59
3.5	Proteinanalytik	60
3.5.1	Präparation der bakteriellen Fusionsproteine <i>GST-Cx57CL-6xHis</i> und <i>GST-Cx57CT-6xHis</i>	60
3.5.2	Herstellung von HeLa-Zelllysaten	61
3.5.3	Herstellung von Retinalysaten	61
3.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinlysaten	61
3.5.5	Cx36- und Cx57-Immunpräzipitation von Retinalysaten	62
3.5.6	Vorbereitung von Cx57-Immunpräzipitaten aus Retinae für die MudPIT-Analyse	63
3.5.7	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	63
3.5.8	Immunoblot-Analyse	65
3.6	Histologische Analytik	66
3.6.1	Anfertigung von vitalen Retinadickschnitten zur Fluoreszenzanalyse	66
3.6.2	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse und Immunhistochemie	67
3.6.2.1	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von transient transfizierten HeLa-Zellen mit den Cx57-Antikörpern <i>Cx57-Mid</i> und <i>Cx57-CT</i>	67
3.6.2.2	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten mit Cx36-Antikörpern	67
3.6.2.3	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten mit Glyzin-Antikörpern	68
3.6.2.4	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse und Immunhistochemieanalyse von Gehirn- und Retina-Schnitten mit GFP-Antikörpern	69
3.6.2.5	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten mit den Cx57-Antikörpern <i>Cx57-Mid</i> und <i>Cx57-CT</i> (Protokoll nach Prof. James Nagy)	70
3.6.3	β -Galaktosidase-Nachweis in Retinagefrierschnitten	71
3.7	Tamoxifen-vermittelte Induktion der PrP-CreER^T-Rekombinase	71

1 EINLEITUNG

„Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile.“ Dieses Zitat von Aristoteles (384 v. Chr. – 322 v. Chr), ursprünglich Aspekte der Philosophie beschreibend, hat seine Gültigkeit auch in der Biologie. Vielzellige Organismen stellen nicht nur eine Anhäufung von Zellen dar, sondern erhalten ihre vielen verschiedenen, hoch spezialisierten Funktionen erst durch das fein abgestimmte Zusammenspiel der Zellen untereinander in einem Gewebe. Dazu ist Kommunikation zwischen den Zellen erforderlich. Eine Möglichkeit dieser interzellulären Kommunikation bilden die Gap Junction-Kanäle.

1.1 Gap Junction-Kanäle

Gap Junction-Kanäle sind spezialisierte Zell-Zell-Kontaktstrukturen zwischen eukaryotischen Zellen, bei denen die benachbarten Zellmembranen von normalerweise 20 - 30 nm auf einen Spalt (engl. *gap*) von 3 - 4 nm einander angenähert sind (Revel und Karnovsky, 1967). Dabei ermöglichen Gap Junction-Kanäle eine direkte Verbindung der Zytoplasmata zweier Zellen. Ionen, Stoffwechselprodukte und Zweitbotenstoffe bis zu einer Größe von 1000 Dalton können entlang des Konzentrationsgefälles durch sie hindurch diffundieren (Goodenough et al., 1996; Evans und Martin, 2002). Somit sind die Zellen untereinander elektrisch und metabolisch *gekoppelt*. Meist sind mehrere tausend Einzelkanäle in einem Gap Junction-Plaue organisiert (Kumar und Gilula, 1996; Abb. 1a).

Gap Junction-Kanäle treten in allen Tierarten ab der Entwicklungsstufe der Coelenterata auf (Fraser et al., 1987). Sie kommen in allen Geweben eines sich entwickelnden und adulten Organismus vor. Ausnahme stellen Erythrozyten, Thrombozyten, Spermatozyten und adulte Skelettmuskulatur dar (Gilula et al., 1978). Erste Hinweise auf eine elektrische Kopplung von Zellen lieferten elektrophysiologische Ableitungen an den Riesenmotoneuronen von Flusskrebse (Furshpan und Potter, 1959).

In Vertebraten sind Gap Junction-Kanäle größtenteils aus Connexin-Proteinen aufgebaut, während bei Invertebraten diese Rolle die Innexin-Proteine übernehmen. Da Connexine und Innexine im Wesentlichen ähnlich in ihrem molekularen Aufbau sind (Phelan und Starich, 2001), entstanden sie vermutlich durch konvergente Evolution. Eine weitere Klasse von Gap Junction-bildenden Proteinen bei Vertebraten stellen die Pannexine dar (Bruzzone et al., 2003). Sie sind homolog zu den Innexinen und kommen damit sowohl in Vertebraten wie in Invertebraten vor (griech. *pan*: alles, umfassend). Vinnexine hingegen werden von bestimmten Viren kodiert und weisen eine hohe Sequenzhomologie zu Innexinen auf (Turnbull et al., 2005).

Gap Junction-Kanäle bestehen aus zwei Halbkanälen, den Connexonen, die jeweils die Plasmamembran der benachbarten Zellen durchspannen und aneinander andocken (Abb. 1a). Connexone besitzen in ihrem Inneren eine 2 nm weite hydrophile Pore, die reversibel

geschlossen werden kann (Perkins et al., 1997 und 1998). Ein Connexon besteht aus sechs Proteinuntereinheiten, den Connexinen, die die Connexonpore radial umgeben (Yeager et al., 1998; Unger et al., 1999). Sofern nicht anders vermerkt, beziehen sich sämtliche Daten in dieser Arbeit auf die Gap Junction-Kanäle bzw. Connexine der Maus. Durch gezielte Mutationen im Mausgenom (Kap. 1.10) wurde die Analyse vieler Fragestellungen möglich.

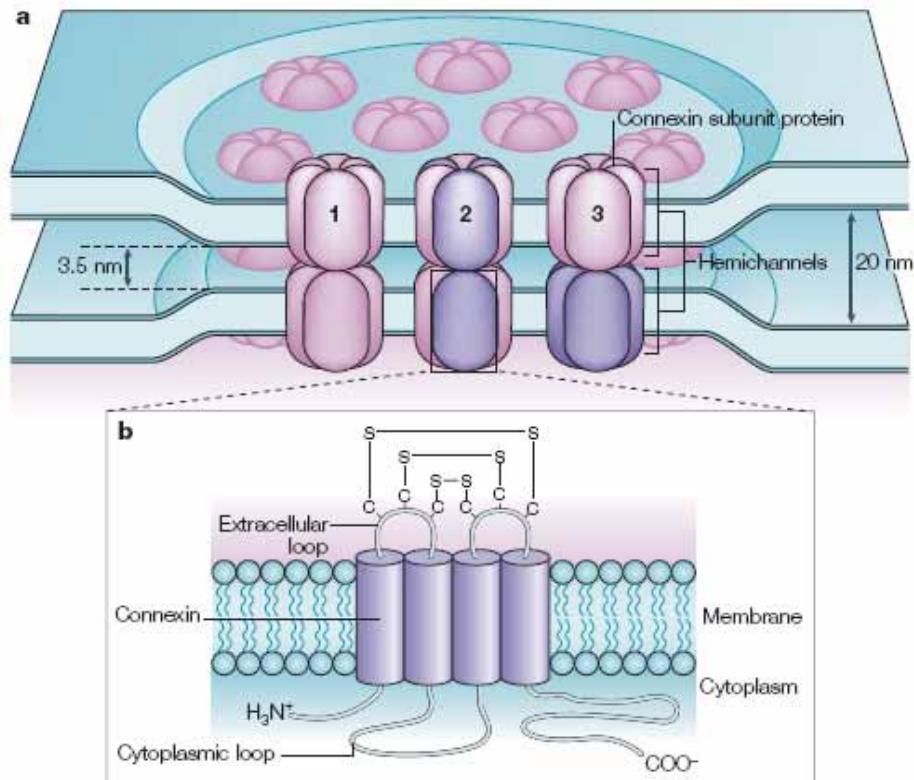


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Gap Junction-Plaques sowie des Aufbaus von Gap Junction-Kanälen und der molekularen Struktur eines Connexins. (a) Gezeigt ist ein Gap Junction-Plaques, in dem zahlreiche Gap Junction-Kanäle organisiert sind, sowie der Aufbau von Gap Junction-Kanälen aus jeweils zwei Halbkanälen, die aus jeweils sechs Proteinuntereinheiten, den Connexinen, bestehen. 1) Homotypische Kopplung homomerer Halbkanäle, 2) Homotypische Kopplung heteromerer Halbkanäle, 3) heterotypische Kopplung homomerer Halbkanäle. (b) Connexine bestehen aus drei zyttoplasmatischen Domänen - dem N- und C-Terminus, sowie der zyttoplasmatischen Schleife -, aus vier Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Schleifen, die über Disulfidbrücken zwischen ihren hochkonservierten Cystein-Resten miteinander verbunden sind (aus Söhl et al., 2005).

1.2 Connexine – Proteinuntereinheiten der Gap Junction-Kanäle

Connexine lassen sich topologisch in verschiedene Bereiche einteilen. Sie besitzen vier α -helikale Transmembrandomänen, einen zytoplasmatischen N- und C-Terminus sowie eine zytoplasmatische Schleife und zwei extrazelluläre Schleifen (Abb. 1b). Es gibt unterschiedliche Connexin-Isoformen, die alle den gleichen Aufbau aufweisen, sich in der Aminosäuresequenz und in ihrer Länge jedoch unterscheiden. Dabei treten die Sequenz- und Längenunterschiede vor allem in der zytoplasmatischen Schleife und im C-Terminus auf. Die Sequenzen der beiden extrazellulären Schleifen sind hingegen hochkonserviert. Insbesondere die Lage der drei Cysteinreste in jeder der Schleifen ist fast immer identisch (1. Schleife: CX₆CX₃C, 2. Schleife: CX₄CX₄C). Zwischen ihnen bilden sich intramolekulare Disulfidbrücken aus (John and Revel, 1991), die für das Aneinanderdocken der beiden Connexone zur Bildung eines Gap Junction-Vollkanals wichtig sind (Foote et al., 1998).

Ein Connexon, das aus identischen Connexin-Isoformen zusammengesetzt ist, wird als homomer bezeichnet im Gegensatz zu einem heteromeren Connexon, das aus verschiedenen Connexin-Isoformen besteht. Von homotypischer Kopplung spricht man, wenn zwei identisch aufgebaute Connexone einen Gap Junction-Vollkanal bilden; ansonsten liegt eine heterotypische Kopplung vor (Abb. 1a). Zwei Zellen gleichen Typs, die über Gap Junction-Kanäle miteinander kommunizieren, weisen eine homologe Kopplung auf; eine heterologe Kopplung stellt hingegen die Ausbildung von Kanälen zwischen unterschiedlichen Zelltypen dar. Die variable Ausbildung von Gap Junction-Kanälen aus verschiedenen Connexin-Isoformen vergrößert die Möglichkeit, Kanäle mit unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften und intrazellulären Regulationsmechanismen auszubilden.

1.3 Die Diversität der Connexine

Zurzeit sind 21 Connexin-Isoformen im Genom des Menschen und 20 Connexin-Isoformen im Genom der Maus bekannt (Söhl und Willecke, 2003). Erste Hinweise auf verschiedene Gap Junction-Proteine wurden durch differentielle Zentrifugation kombiniert mit biochemischen Analysen gefunden (Hertzberg und Gilula, 1979; Henderson et al., 1979; Traub et al., 1982). Die Isolation der ersten cDNA-Sequenz eines Connexins (Heynkes et al., 1986) ermöglichte die Suche nach neuen Connexingenen, z.B. mithilfe von degenerierten PCR-Startermolekülen (Haefliger et al., 1992; Söhl et al., 1998). Durch die Sequenzierung des humanen Genoms und des Mausgenoms wurden in neuerer Zeit die vermutlich letzten unbekanntten Connexin-Gene über Datenbankrecherchen gefunden, bei denen Connexintypische Sequenzen anhand von Algorithmen identifiziert wurden.

Es existieren zwei Nomenklaturen zur Benennung der verschiedenen Connexin-Isoformen: Die „Gja/Gjb“-Nomenklatur stützt sich auf die Gruppenzugehörigkeit der Connexine (Gruppen α , β , γ , δ), die sich aus der Sequenzidentität der Aminosäureabfolge der zytoplas-

matischen Schleife ergibt, sowie auf die Reihenfolge ihrer Entdeckung (Gimlich et al., 1990; Söhl et al., 1998). Die in dieser Arbeit verwendete „Cx“-Nomenklatur nach Beyer et al. (1987) bezieht sich auf die molekulare Masse in Kilodalton (kDa), die sich für jede Connexin-Isoform aus ihrer cDNS-Sequenz errechnet.

Jede Connexin-Isoform hat ihr eigenes entwicklungs- und gewebespezifisches Ausprägungsmuster. Einige Isoformen werden in mehreren Zelltypen ausgeprägt, andere sind stärker restringiert. Umgekehrt exprimieren einige Zelltypen mehrere Connexine, andere nur ein einziges. So wird Cx43, die bekannteste Connexin-Isoform, nahezu ubiquitär ausgeprägt, jedoch nur im Mausembryo in Neuronen (Rozenal et al., 1998; Theis et al., 2001 und 2003). Cx29, Cx32 und Cx47 sind in Oligodendrozyten zu finden (Scherer et al., 1995; Altevogt et al., 2002; Odermatt et al., 2003, Kleopa et al., 2004), Cx32 wird jedoch auch von Hepatozyten exprimiert (Nicholson et al., 1987). Weitere Beispiele finden sich in den folgenden Kapiteln.

Bei Connexin-Genen gibt es einen vorherrschenden Aufbau aus einem untranslatierten Exon 1, einem Intron unterschiedlicher Länge und einem Exon 2, welches das gesamte Leseraster einschließlich des Poly-Adenylierungs-Signals (polyA-Signal) enthält (Willecke et al., 2002). Abweichungen stellen die Gene für Cx36, Cx39 und Cx57 dar. Bei Cx36 und Cx39 verteilt sich die kodierende Region auf Exon 1 und 2. Cx57 besitzt hingegen ein drittes Exon, das den distalen Teil des C-Terminus kodiert. Für andere Connexin-Gene wurde ein alternatives Spleißen beobachtet (Söhl und Willecke, 2003), durch das vermutlich die mRNS-Stabilität und/oder die Translationseffizienz und damit die Stärke der Genexpression reguliert wird (Willecke et al., 2002).

Die Familie der Connexine entstand vermutlich durch Genduplikation und anschließende divergente Evolution. Die Connexin-Gene sind auf verschiedene Chromosomen verteilt. Einige Connexin-Gene liegen jedoch sowohl im Menschen wie auch bei der Maus gekoppelt auf einem Chromosom vor, wie beispielsweise Cx30.3, Cx31, Cx31.1 und Cx37 auf Chromosom 1 des Menschen bzw. Chromosom 4 der Maus (Söhl und Willecke, 2003).

1.3 Funktion von Gap Junction-Kanälen

Die direkte metabolische, signalvermittelnde und elektrische Kopplung, die durch die Gap Junction-Kanäle gewährleistet wird, ist die Grundlage zahlreicher physiologischer Vorgänge im Organismus. Die Aufdeckung der Funktion von Gap Junction-Kanälen wird unter anderem durch die Erzeugung von Mausmutanten ermöglicht, denen das Gen für eine bestimmte Connexin-Isoform fehlt. In den meisten Fällen ist der resultierende Phänotyp relativ mild. Der homozygote Verlust der Connexin-Isoformen Cx26, Cx43 und Cx45 führt jedoch jeweils zu embryonaler bzw. postnataler Lethalität.

Die metabolische Kopplung über Gap Junction-Kanäle spielt eine wichtige Rolle bei der Versorgung von Zellen, die keinen direkten Zugang zu den Blutgefäßen haben, wie es z.B. bei den über Cx46 und Cx50 gekoppelten Faserzellen der Augenlinse der Fall ist (Goodenough,

1992; Zampighi et al., 2000). Cx26-Gap Junction-Kanäle in der Plazenta gewährleisten die lebenswichtige Zufuhr von Glukose aus dem mütterlichen Blut in das des Embryos (Gabriel et al., 1998). Cx26-defiziente Embryonen sterben daher während der Embryonalentwicklung (Filippov et al., 2003).

Eine wichtige Rolle spielen Gap Junction-Kanäle bei der Weiterleitung von Zweitbotenstoffen wie zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP), Kalzium-Ionen (Ca^{2+}), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) oder Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) (Goldberg et al., 2004; Goldberg et al., 1999; Goldberg et al., 1998). Dadurch wird es einem gekoppelten Zellverband ermöglicht, auf extrazelluläre Signale koordiniert zu reagieren, wie es z.B. in der frühen Embryogenese erforderlich ist (Kandler, 1997; Reuss et al., 1997; Kidder und Winterhager, 2001). Eine gestörte Gap Junction-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation wird häufig bei karzinogenen Vorgängen beobachtet (Mesnil et al., 2005).

Auch Peptide können Gap Junction-Kanäle passieren. Dies ist bei der Kreuz-Präsentation im Zuge der Immunantwort der Fall, wenn eine Zelle Peptide endogener Proteine an professionelle Antigen-präsentierende Zellen weitergibt (Neijssen et al., 2005). Valiunas et al. (2005) beschrieben die Gap Junction-vermittelte Ausbreitung von siRNS in Zellkultur-experimenten.

Gap Junction-Kanäle sind am Hörvorgang beteiligt. In der Cochlea koppeln sie die Epithelzellen, die über dieses Netzwerk das von den sensorischen Hörzellen freigesetzte Kalium in die Endolymphe zurückbringen. Entsprechend kann es bei Mutationen in den beteiligten Connexinen, Cx26 oder Cx30, zur Taubheit kommen (Zhao et al., 2006).

Astrozyten, Gliazellen des Zentralen Nervensystems (ZNS), kommunizieren über Kalzium-Wellen miteinander und können auf diese Weise auch neuronale Aktivitäten beeinflussen. Dabei ist die Kopplung über Gap Junction-Kanäle für die Weiterleitung der Ca^{2+} -Signale verantwortlich (Giaume und Venance, 1998). Beteiligt sind astrozytäre Gap Junction-Kanäle auch beim Vorgang des *spatial buffering*, bei dem die von Neuronen in den Extrazellularraum abgegebenen Kalium-Ionen aktiv von Astrozyten aufgenommen und an benachbarte Gliazellen verteilt werden (Wallraff et al., 2006).

Eine wichtige Rolle spielt die elektrische Kopplung über Gap Junction-Kanäle in Neuronen des Zentralen Nervensystems (Kap. 1.6.1) und in Kardiomyozyten des Herzens. Gap Junction-Kanäle im Herzen dienen der Erregungsweiterleitung und koordinierten Kontraktion des Herzmuskels (Gros und Jongsma, 1996). Cx30.2-Gap Junction-Kanäle bewirken durch ihre geringe Einzelkanalleitfähigkeit eine Verlangsamung der Impulsausbreitung im AV-Knoten, so dass eine Kontraktion des Atriums zeitlich vor der des Ventrikels gewährleistet wird (Kreuzberg et al., 2006). Eine essentielle Rolle spielen Cx45 und Cx43 bei der Entwicklung des Herzens. Cx45- bzw. Cx43-defiziente Embryonen sterben embryonal oder kurz nach der Geburt an einem Herzdefekt (Krüger et al., 2000; Reaume et al., 1995).

Mutationen in Connexin-Genen sind die Ursache zahlreicher menschlicher Erbkrankheiten. So bewirken verschiedene Mutationen im Cx31-Gen die autosomal-dominant vererbte Hautkrankheit Erythrokeratoderma variabilis. Dabei kann der Transport von Gap Junction-

Kanälen aus mutiertem Cx31 zur Plasmamembran erschwert sein (Di et al., 2002). Mutationen im Cx32-Gen, das unter anderem in den myelinbildenden Schwann-Zellen des Peripheren Nervensystems ausgeprägt wird, sind verantwortlich für die X-chromosomal vererbte Form der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung, bei der es zu einer Degeneration der Myelinscheiden kommt (Hanemann et al., 2003). Einen ähnlichen Phänotyp weist die Pelizäus-Merzbacher-ähnliche Erkrankung auf, für die Mutationen im Cx47-Gen verantwortlich sind (Uhlenberg et al., 2004). Cx47 wird in den myelinbildenden Oligodendrozyten des ZNS exprimiert (Odermatt et al., 2003).

Im Cx43-Gen sind über 30 verschiedene Mutationen bekannt, die zu der ebenfalls autosomal-dominant vererbten oculodentodigitalen Dysplasie (ODDD) führen (Paznekas et al., 2003). Je nach Ort der Mutation fällt das Krankheitsbild der ODDD-Patienten, zu dem Skelettanomalitäten, mentale Retardation oder Herzinsuffizienz gehören, unterschiedlich aus. Kürzlich wurde beschrieben, dass ODDD-typische Mutationen die Funktion von Cx43-Halbkanälen (Kap. 1.5) unterbinden (Lai et al., 2006).

1.4 Regulation von Gap Junction-vermittelter Kommunikation

Die interzelluläre Kommunikation über Gap Junction-Kanäle wird dynamisch reguliert. Dies erfolgt auf mehreren Ebenen: Zum einen über die Anzahl der Kanäle, über die zwei Zellen gekoppelt sind. Sie ergibt sich aus der Stärke der Ausprägung der beteiligten Connexin-Isoform(en), aus dem Aufbau und Transport der Connexone zur Plasmamembran sowie aus der Geschwindigkeit der proteasomalen oder lysosomalen Degradation von Gap Junction-Kanälen. Andererseits wird auch der Öffnungszustand der Kanäle modifiziert, was eine schnellere Einflußnahme der Zelle auf ihren Kopplungszustand erlaubt. Zur Verschließung eines Gap Junction-Kanals werden zwei Modelle diskutiert: Das Irisblenden-Modell geht von einer Rotation der Connexine in einem Gap Junction-Halbkanal aus (Unwin und Ennis, 1983; Spray et al., 1985). Bei dem neueren Rezeptor-Partikel-Modell schließt der C-Terminus des Connexins die Kanalpore, indem er an eine konservierte Domäne der zytoplasmatischen Schleife bindet (Homma et al., 1998; Seki et al., 2004 a und b).

Connexine haben eine kurze Halbwertszeit von einigen Stunden, d.h. sie werden permanent abgebaut und neu synthetisiert (Laird, 2006). Dies ermöglicht der Zelle, die Kommunikation über Gap Junction-Kanäle über das Expressionsniveau der Connexine schnell hoch- bzw. herunterzuregulieren, um so auf physiologische Veränderungen zu reagieren. So bewirkt ein hoher Glukose-Spiegel eine Verringerung der Cx36-Expression in Insulin-sezernierenden β -Zellen des Pankreas. Dabei wird der cAMP-Proteinkinase A (PKA)-Signalweg aktiviert, der in einer verstärkten Bindung des Transkriptionssuppressors CRE-Modulator1 an die CRE (*cAMP response element*)-Sequenz in der Cx36-Promotor-Region resultiert (Allagnat et al., 2005).

Der Öffnungszustand von Gap Junction-Kanälen wird in Abhängigkeit von dem pH-Wert und der Ca^{2+} -Konzentration innerhalb der Zelle sowie von dem Membranpotential reguliert (Bukauskas und Verselis, 2004). Einen weiteren wichtigen Einfluss hat die Modifikation der Connexin-Moleküle durch Phosphorylierung (Laird, 2005). Cx36 in AII-Amakrinzellen der Retina wird unter Tageslicht-Bedingungen durch die Dopamin/cAMP-aktivierte PKA phosphoryliert, wodurch das Ausmaß der Kopplung herunterreguliert wird. Dabei bleiben die Cx36-Transkript- und -Proteinmengen unverändert. Die Phosphorylierung von Cx36 bewirkt ein Schließen der Gap Junction-Kanäle, so dass eine Lichtadaption der Retina erreicht wird (Urschel et al., 2006).

Wie dieses Beispiel zeigt, tragen zur Regulation der Gap Junction-vermittelten Kommunikation Connexin-interagierende Proteine wie z.B. verschiedene Proteinkinasen, jedoch auch Proteine anderer Klassen bei. Untersuchungen zu Cx43 sind hier am umfassendsten: So bindet ZO-1 (zonula occludens 1), ein Mitglied der MAGUK (Membran-assoziierte Guanylat-Kinase)-Familie, an Cx43 (Giepmans und Moolenaar, 1998), jedoch auch an verschiedene andere Connexin-Isoformen wie z.B. Cx32 und Cx36 (Li et al., 2004 a und b), und reguliert dadurch, zumindest im Fall von Cx43, die Größe und Stabilität von Gap Junction-Plaques (Hunter et al., 2005; Singh et al., 2005). Einen ähnlichen Einfluß übt das Aktin-bindende Protein Drebrin aus, welches Cx43 mit Mikrofilamenten verbindet und die Stabilität von Gap Junction-Kanälen an der Zelloberfläche gewährleistet (Butkevich et al., 2004). Mikrotubuli unterstützen den Connexon-Transport zur Plasmamembran (Giepmans et al., 2001; Guo et al., 2003). CIP85 (Cx43-interagierendes Protein von 85 kDa) beeinflusst die Halbwertszeit von Cx43 (Lan et al., 2005). β -Catenin, ein weiteres Cx43-interagierendes Protein, verknüpft möglicherweise die interzelluläre Kommunikation über Gap Junction-Kanäle mit dem Wnt-Signalweg (Ai et al., 2000), durch den extrazelluläre Signale Einfluss auf die Genexpression einer Zelle nehmen.

1.5 Gap Junction-Halbkanäle

In den letzten Jahren haben sich Hinweise gehäuft, dass bereits Gap Junction-Halbkanäle eine funktionelle Bedeutung haben (Stout et al., 2004). Ihr Öffnungszustand muss durch die Zelle kontrolliert werden, da bei der großen Einzelkanalleitfähigkeit von Halbkanälen die Ionenhomöostase der Zelle kollabieren würde (Bennett et al., 2003). Die Aktivität der Halbkanäle wird durch die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, das Membranpotential, mechanischen Stress, Aktivierung purinergeer Rezeptoren und intrazelluläre Kinasen beeinflusst (Saez et al., 2005). Eine Öffnung von Cx43-Halbkanälen in kultivierten Astrozyten wurde durch eine metabolische Unterversorgung induziert, erkennbar an dem Einstrom der Farbstoffes Lucifer Yellow oder Ethidiumbromid in die Zellen (Cortreras et al., 2002). Zugesprochen wurde Connexin- und auch Pannexin-Halbkanälen (Locovei et al., 2006) eine biologische Bedeutung bei der Entstehung von Kalzium-Wellen durch die Freisetzung von ATP. In Astrozyten-

Netzwerken wird ATP durch Cx43-Halbkanäle in der Astrozyten-Membran freigesetzt und bindet an purinerge Rezeptoren in der Plasmamembran der Nachbarzelle. Dies sorgt für eine Aktivierung der intrazellulären Phospholipase C, wodurch die zytosolische IP₃- und damit die Kalzium-Konzentration ansteigen. Daraus resultiert eine Öffnung der Cx43-Halbkanäle; ATP strömt aus. Auf diese Weise pflanzt sich die Kalzium-Welle über das gesamte Netzwerk aus gekoppelten Astrozyten fort (Stout et al., 2002). Kalzium stimuliert in Astrozyten die Freisetzung von Glutamat, wodurch sie die neuronale Aktivität beeinflussen (Parpura und Haydon, 2000). Eine ähnliche Rolle für Halbkanäle wurde bei einer bakteriellen Infektion von HeLa-Zellen mit *Shigella flexneri* beobachtet (Tran Van Nhieu et al., 2003). In Cx26-transfizierten HeLa-Zellen verbreiten sich die Erreger schneller als in nicht-transfizierten HeLa-Wildtyp-Zellen. Vermutlich induziert *Shigella flexneri* eine Öffnung der Cx26-Halbkanäle. Das freigesetzte ATP und die resultierenden Kalzium-Wellen erleichtern den Befall gesunder Zellen. Auch Auslöser-Zellen, *trigger cells*, des retinalen Pigmentepithels nutzen die Ca²⁺-induzierte Freisetzung von ATP über Halbkanäle, um neurale retinale Vorläuferzellen zur Proliferation zu stimulieren, vermutlich über Kalzium-Wellen (Pearson et al., 2005). Die meisten Untersuchungen an Halbkanälen wurden in Zellkulturexperimenten durchgeführt. Ein direkter struktureller oder physiologischer Nachweis von Halbkanälen im Tier steht noch aus (Stout et al., 2004). Bisher war es schwierig, die Funktionen von Gap Junction-Kanälen und Halbkanälen getrennt voneinander zu betrachten. Mithilfe von synthetischen Peptiden, die in ihrer Aminosäuresequenz identisch zu einem Abschnitt des Connexin-Proteins sind, können Halbkanäle jedoch nun selektiv blockiert werden (De Vuyst et al., 2005).

Neben ihrer kanalbildenden Funktion scheinen Connexine jedoch auch davon unabhängige Aufgaben zu erfüllen. So wurde berichtet, dass der C-Terminus von Cx43 das Zellwachstum inhibiert (Dang et al., 2006). Cx43 schützt darüber hinaus kultivierte Gliazellen vor Apoptose, selbst wenn die Zellen voneinander isoliert sind oder die Kopplung durch Gap Junction-Blocker inhibiert wird (Lin et al., 2003).

1.6 Connexine und Gap Junction-Kanäle im Zentralen Nervensystem

Gap Junction-Kanäle sind im Zentralen Nervensystem (ZNS) weit verbreitet. Ihre Proteinuntereinheiten, die Connexine, kommen in verschiedenen Isoformen vor. Auch Pannexine werden im ZNS ausgeprägt (Bruzzone et al., 2003). Zu den Hauptzelltypen des ZNS zählen die Neuronen und die Gliazellen, wobei die Neuronen vor allem während der Entwicklung gekoppelt sind und sich die Kopplung in adulten Mäusen auf neuronale Subpopulationen beschränkt (Söhl et al., 2005). Gliazellen, zu denen die Astrozyten und die Oligodendrozyten zählen, weisen im adulten Tier eine starke Kopplung auf (Theis et al., 2005).

1.6.1 Neurone

Gap Junction-Kanäle zwischen Neuronen werden auch als elektrische Synapsen bezeichnet. Zu den Connexinen, die elektrische Synapsen in der adulten Maus ausbilden, zählen Cx30.2, Cx36, Cx45 und Cx57, die größtenteils in unterschiedlichen neuronalen Subtypen ausgeprägt werden. Elektrische Synapsen ergänzen nicht nur die Kommunikation zwischen Neuronen über chemische Synapsen (Bruzzone und Ressot, 1997), sondern führen zur Bildung von neuronalen Synzytien, in denen die untereinander gekoppelten Neurone als eine synchronisierte Einheit agieren. Nachgeschaltete Nervenzellen erhalten dadurch präzisere Informationen (Hormuzdi et al., 2004). Neurone sind ausschließlich mit anderen Neuronen gekoppelt, obwohl vereinzelt auch Kopplung zwischen Neuronen und Gliazellen beobachtet wurde (Pakhotin und Verkhratsky, 2005). Im Goldfisch wurde die gemischte Synapse (*mixed synapse*) beschrieben, bei der sich Gap Junction-Kanäle, bestehend aus Cx35, dem Fischortholog zum murinen Cx36, in direkter räumlicher Nähe zur chemischen Synapse befinden (Pereda et al., 2003 a und b). Eine enge Lokalisation wurde auch zwischen AMPA-Rezeptoren und Cx36 in der postsynaptischen Membran der OFF-Zapfen-Bipolarzellen in der Retina der Maus gefunden (Feigenspan et al., 2004). Dies legt eine gegenseitige Regulation nahe, möglicherweise über Kalzium. Cx45 ist das am stärksten während der Entwicklung regulierte neuronale Connexin. Es wird bereits sehr prominent vor der Geburt im ZNS ausgeprägt, während seine Expression in der heranwachsenden Maus immer mehr eingeschränkt wird (Maxeiner et al., 2003). Im Gegensatz zu Cx30.2, Cx36 und Cx57, die sich fast ausschließlich in Interneuronen befinden, wird Cx45 z.B. auch in Pyramidenneuronen des Hippocampus ausgeprägt. Ihm wird eine Rolle bei der neuronalen Homöostase und Apoptose zugesprochen (Condorelli et al., 2003). Cx36- und Cx45-Gap Junction-Kanäle haben grundlegend verschiedene biophysikalische Eigenschaften: Im Gegensatz zu Cx45-Kanälen zeigen Cx36-Kanäle eine sehr geringe Spannungssensitivität und Einzelkanalleitfähigkeit (Moreno et al., 1995; Srinivas et al., 1999).

1.7 Die Retina

Ein leicht zugänglicher Teil des ZNS ist die Retina (Netzhaut). Sie stellt ein spezialisiertes sensorisches Nervengewebe an der hinteren Innenseite des Auges dar, das die Lichtinformation, die durch die Linse in das Auge fällt, in elektrische Reize umwandelt, sie verrechnet und über den Sehnerv zu höheren Hirnzentren sendet. Bei Wirbeltieren spricht man von einer inversen Retina, da das Licht zunächst alle Zellschichten durchdringen muss, bis es auf die äußerste Schicht der lichtsensitiven Photorezeptoren fällt (Benninghoff, 2002). Der Aufbau der Retina ist hochkonserviert (Masland, 2001 b). Sie ist klar geschichtet und weist ein hierarchisches, vertikales Verschaltungsschema auf (Abb. 1.2).

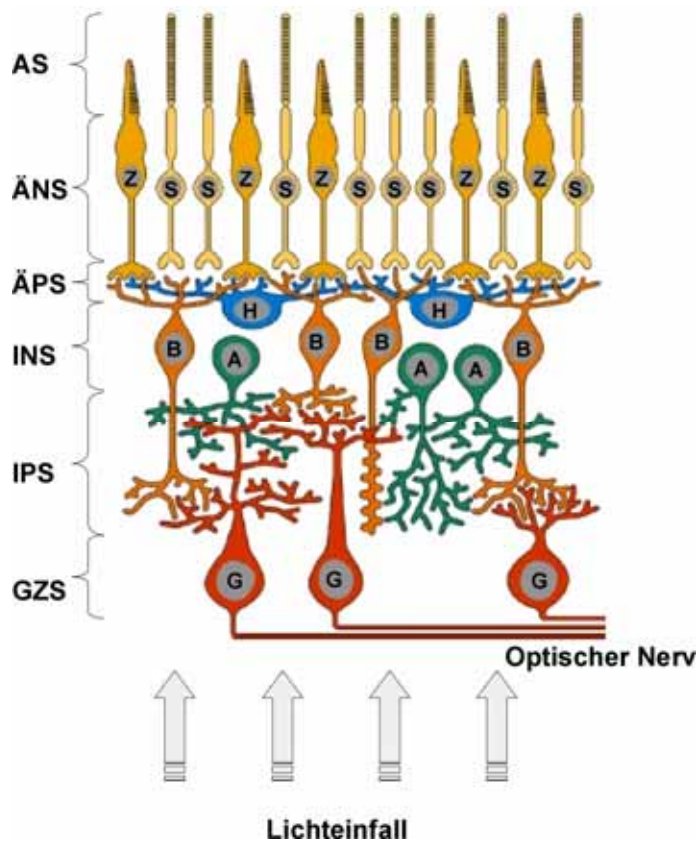


Abb. 1.2: Schematischer Aufbau der Retina. Die Verschaltung erfolgt in vertikaler Richtung von den Photorezeptoren, den Zapfen (Z) und Stäbchen (S), über die Bipolarzellen (B) hin zu den Ganglienzellen (G), deren Axone den optischen Nerv bilden. Horizontal (H)- und Amakrinzellen (A) vermitteln eine laterale Verschaltung. Das retinale Pigmentepithel ist nicht gezeigt. AS: Außensegmente der Photorezeptoren; ÄNS: Äußere Nukleäre Schicht; ÄPS: Äußere Plexiforme Schicht; INS: Innere Nukleäre Schicht; IPS: Innere Plexiforme Schicht; GZS: Ganglienzellschicht (Quelle: www.uni-oldenburg.de/fg-retina; modifiziert).

Nach außen hin ist die Retina durch das retinale Pigmentepithel abgegrenzt, das die Netzhaut metabolisch versorgt, zur Blut/Hirn-Schranke gehört und sehr eng mit den Photorezeptoren assoziiert ist (Strauss, 2005). Auf die Schicht der Photorezeptoren, die ihrerseits in die Schicht der Photorezeptoraußensegmente und der Äußeren Nukleären Schicht (ÄNL) unterteilt ist, folgt die Äußere Plexiforme Schicht (ÄPL), in der die Photorezeptoren auf die Interneurone projizieren. Die Somata der Interneurone bilden die auf die ÄPL folgende Innere Nukleäre Schicht (INL) und sind mit den Prinzipalneuronen der Retina, den Ganglienzellen, in der Inneren Plexiformen Schicht (IPL) verknüpft. Die Ganglienzellen sind in der innersten Schicht der Retina, der Ganglienzellschicht, organisiert. Ihre Axone bündeln sich zum Sehnerv, der aus der Retina hinausführt und ins Gehirn projiziert. Die Retina der Säugetiere besteht aus ca. 55 morphologisch unterscheidbaren neuronalen Subtypen (Masland, 2001 a), wobei die Interneurone die höchste Diversität erreichen. Sie werden klassifiziert in Bipolar-, Amakrin- und Horizontalzellen. Bipolar- und Amakrinzellen teilen sich in weitere Subtypen auf. Horizontal- und Amakrinzellen ermöglichen eine zusätzliche laterale Verschaltung in der Retina. Die Photorezeptoren sind unterteilt in die Zapfen, verantwortlich für das photopische Farbsehen bei Tageslicht, und die Stäbchen, verantwortlich für das skotopische Schwarz/Weiß-Sehen unter Sternenlichtbedingungen. Die Retina der nachtaktiven Maus besteht zu ca. 97 % aus Stäbchen (Jeon et al., 1998).

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

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

1.8 Connexin36

Cx36 bildet elektrische Synapsen zwischen Neuronen, aber auch anderen elektrisch erregbaren Zellen aus, wie z.B. den Insulin-produzierenden β -Zellen des Pankreas (Serre-Beinier et al., 2000) und den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (Degen et al., 2004). Es war die erste Connexin-Isoform, die hauptsächlich in Neuronen des Säugerhirns gefunden wurde (Condorelli et al., 1998). Cx36 besteht aus 321 Aminosäuren; das kodierende Gen ist auf dem Chromosom 2 der Maus lokalisiert (Al-Ubaidi et al., 2000). Als Orte der Cx36-Ausprägung im Gehirn sind insbesondere die Retina (Kap. 1.8.1), die inferiore Olive (Kap. 1.8.2), der *Bulbus olfactorius* (Belluardo et al., 2000; Zhang und Restrepo, 2003), die Kleinhirnerkerne sowie der Hippocampus und der Cortex zu nennen (Teubner et al., 2000), wobei Cx36 insbesondere jeweils in der Plasmamembran der Dendriten zu finden ist.

Wie Cx36-Defekt-Mäuse zeigen, bewirkt ein Verlust von Cx36 keinen auffälligen Phänotyp. Die Tiere sind lebensfähig, fertil und zeigen keine prominenten Bewegungs- oder Verhaltensabnormalitäten (Kistler et al., 2002). Die Architektur von Geweben, die in Wildtyp-Mäusen Cx36 ausprägen, weist keine Veränderungen auf (Güldenagel et al., 2001; De Zeeuw et al., 2003). Unterschiede zum Wildtyp lassen sich erst durch elektrophysiologische Analysen belegen.

Generell vermitteln Cx36-Gap Junction-Kanäle die Synchronisation von Aktivitäten neuronaler Ensembles im Gehirn (Hormuzdi et al., 2004; Deans et al., 2001). Dies wurde z.B. für die Mitralzellen des *Bulbus olfactorius* (Christie et al., 2005) und für die inferiore Olive (Kap. 1.8.2) beschrieben. Die Deletion von Cx36 resultiert in einer beeinträchtigten oder fehlenden Signalweiterleitung über elektrische Synapsen. Eine fast gänzlich fehlende elektrische Kopplung wurde für inhibitorische Interneurone im Neocortex (Deans et al., 2001), im Hippocampus (Hormuzdi et al., 2001) und im retikulären thalamischen Nukleus (Landisman et al., 2002) beschrieben. Im Hippocampus kommen dadurch z.B. Gamma-Oszillationen neuronaler Netzwerke (20 – 90 Hz) zum Erliegen (Buhl et al., 2003; Hormuzdi et al., 2001). Es wird vermutet, dass Gamma-Oszillationen bei kognitiven Vorgängen wichtig sind (Miltner et al., 1999). Da Cx36 zu der Synchronisation neuronaler Netzwerke beiträgt,

wurde lange Zeit vermutet, dass Mutationen in diesem Connexin zur Entstehung von Epilepsie führen. Unter dem Begriff Epilepsie (Fallsucht) sind Krankheitsbilder zusammengefasst, die unterschiedliche Areale des Gehirns betreffen und sich in krampfartigen Anfällen äußern. Ursache dafür sind rhythmische und synchrone Entladungen von Neuronengruppen im Gehirn. Tatsächlich wurde das Cx36-Gen mit einem Subtyp der idiopathischen Epilepsie, die auf genetische Prädispositionen zurückzuführen ist, in Verbindung gebracht (Mas et al., 2004). Hempelmann et al. (2006) bestätigten das gehäufte Auftreten eines Einzelnukleotidpolymorphismus in Exon 2 von Cx36 bei diesen Patienten, der vermutlich die Effizienz des Spleißens oder die Stabilität von Cx36-mRNS beeinflusst (Mas et al., 2004) und somit zu einer Regulation der Cx36-Expression beiträgt. Im Tiermodell für Epilepsie wurde eine Abnahme in der Cx36-Expression auf mRNA- und Proteinebene im Hippocampus beobachtet (Söhl et al., 2000).

Da der Fokus der vorliegenden Arbeit insbesondere auf Untersuchungen an der Retina liegt, wird im Folgenden näher auf die Expression und Funktion von Cx36 in der Netzhaut eingegangen. Ein Teilaspekt beschäftigt sich darüber hinaus mit Cx36 im olivocerebellären System, das im Anschluss behandelt wird.

1.8.1 Cx36 in der Retina

Cx36 wird in der Retina im Vergleich zu anderen Arealen des ZNS stark exprimiert. Immunfluoreszenzanalysen mit einem Cx36-spezifischen Antikörper führen zu charakteristischen punktförmigen Signalen in der OPL und IPL der Retina, wo auch chemische Synapsen lokalisiert sind. Cx36 in der IPL wird vor allem in den Dendriten von AII-Amakrinzellen ausgeprägt, deren Somata sich im inneren Bereich der INL befinden (Abb. 1.3). AII-Amakrinzellen koppeln homolog über Cx36-Gap Junction-Kanäle mit anderen AII-Amakrinzellen, aber auch heterolog mit den Axonterminalien zu ON-Zapfen-Bipolarzellen (Feigenspan et al., 2001). Dabei wird von den Zapfen-Bipolarzellen Cx45 exprimiert. Es kommt somit zu einer heterotypischen Kopplung zwischen Cx36 und Cx45, die letztendlich die Einspeisung der Signale, die von den Stäbchen kommen, in den Zapfenweg erlaubt (Dedek et al., 2006; Maxeiner et al., 2005). Entsprechend ist der Stäbchen-Signalweg in Cx36- und Cx45-defizienten Mäusen gestört, was am Elektretinogramm dieser Tiere deutlich wird (Güldenagel et al., 2001; Maxeiner et al., 2005). Eine Expression von Cx36 wurde auch in den Dendriten von OFF-Zapfen-Bipolarzellen und in den Zapfen-Endfüßchen beschrieben (Feigenspan et al., 2004). Wahrscheinlich optimiert die homologe Zapfen-Kopplung die Kontraststärke ohne Beeinflussung der Sehschärfe (DeVries et al., 2002). Mit dem Nachweis in alpha-Ganglienzellen wurde die Cx36-Ausprägung zum ersten Mal in Prinzipalneuronen belegt (Schubert et al., 2005). Wie Farbstoffinjektionen an Wildtyp- und homozygot Cx36-defizienten Mäusen zeigen, vermitteln Cx36-Gap Junction-Kanäle eine homologe Kopplung der OFF-alpha-Ganglienzellen untereinander und eine heterologe Kopplung von ON- und

OFF-alpha-Ganglienzellen zu Amakrinzellen, wobei die Connexin-Isoform in diesem Zelltyp noch unbekannt ist.

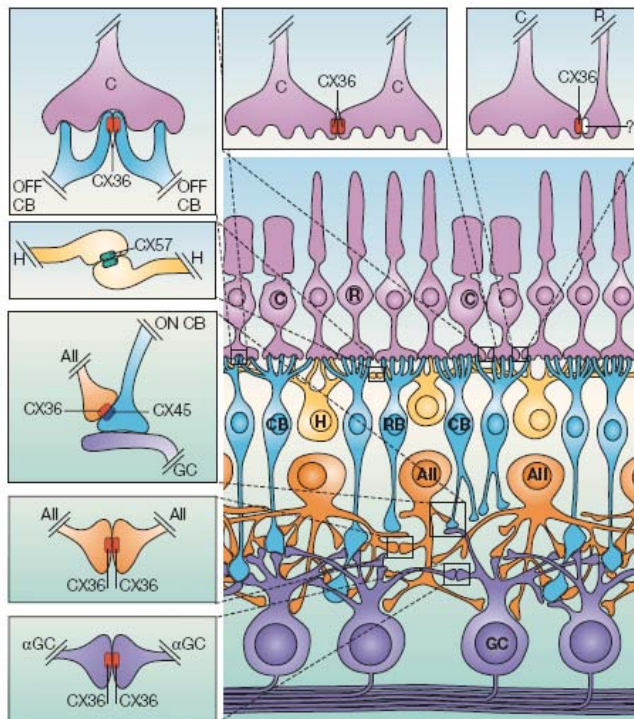


Abb. 1.3: Elektrische Synapsen in der Retina. Cx36 bildet homotypische Gap Junction-Kanäle zwischen Zapfen (cones, C), All-Amakrinzellen (All), OFF-Zapfen-Bipolarzellen (OFF cone bipolar cells, OFF CB) und OFF-alpha-Ganglienzellen (α -GZ). Heterotypische Cx36-Gap Junction-Kanäle befinden sich zwischen Zapfen und Stäbchen (rods, R), zwischen All-Amakrin- und ON-Zapfen-Bipolarzellen sowie zwischen OFF- bzw. ON-alpha-Ganglienzellen und Amakrinzellen (nicht eingezeichnet). Der Kopplungspartner auf der Seite der ON-Zapfen-Bipolarzellen wurde als Cx45 identifiziert. Horizontalzellen sind über Cx57-Gap Junction-Kanäle gekoppelt (aus Söhl et al., 2005).

1.8.2 Cx36 im olivocerebellären System

Das olivocerebelläre System besteht einerseits aus den Neuronen der inferioren Olive, deren Axone, die Kletterfasern, die Purkinjezellen, die Prinzipalneuronen des Kleinhirns, innervieren. Die Purkinjezellen wiederum projizieren auf die Kleinhirnkerne, die in einer Rückkopplungsschleife auf die Olivenneurone einwirken. Die synchrone rhythmische Aktivität des Membranpotentials der Olivenneurone, die unterschwelligen Oszillationen im theta-Frequenzbereich, bestimmt die präzise zeitliche Koordination ihrer Aktionspotentiale und damit auch die zeitliche Koordination der komplexen Entladungen (*complex spikes*) der Purkinje-Zellen (Llinás, 1991; Lampl und Yarom, 1993). Die inferiore Olive trägt somit zur Bewegungskontrolle des Kleinhirns bei. Olivenneurone zeigen eine starke Expression von Cx36 (Condorelli et al., 1998; Rash et al., 2000; Teubner et al., 2000; Degen et al., 2004) und ein hohes Maß an elektrischer Kopplung, die durch Cx36-Gap Junction-Kanäle vermittelt wird (Long et al., 2002). In Cx36-defizienten Mäusen weisen die unterschwelligen Oszillationen der Olivenneurone keine wesentlichen Veränderungen auf. Sie sind jedoch nicht synchronisiert (Long et al., 2002). Die Bewegungskoordination ist in Cx36-Defekt-Mäusen hingegen nicht gestört (Kistler et al., 2002). Olivenneurone von Cx36-defizienten Mäusen besitzen verdickte Dendriten sowie veränderte Membraneigenschaften, die vermutlich

kompensatorische Mechanismen darstellen, um eine rhythmische Aktivität auch ohne Cx36-Gap Junction-Kopplung zu gewährleisten (De Zeeuw et al., 2003). Dies zeigt, wie wichtig die Oszillationen der inferioren Olive für die Funktion des olivocerebellären Systems sind. Neben Cx36 wird vermutlich noch mindestens eine weitere Connexin-Isoform in der inferioren Olive ausgeprägt, die für die geringe Rest-Kopplung in Cx36-Defekt-Mäusen verantwortlich ist (Long et al., 2002). Jüngere Untersuchungen legen nahe, dass es sich dabei um Cx45 handeln könnte (Van Der Giessen et al., 2006).

1.9 Connexin57

Cx57 besitzt ein sehr zelltypspezifisches Expressionsmuster. Wie anhand von Cx57-Defekt-Mäusen gezeigt wurde, die statt Cx57 das Reportergen lacZ unter Kontrolle des Cx57-Promotors ausprägen, ist die Ausprägung von Cx57 neben einer schwachen Expression im Thymus und der embryonalen Niere auf Horizontalzellen der Retina beschränkt (Hombach et al., 2004; Abb.1.3). Horizontalzellen sind in allen Vertebraten stark untereinander gekoppelt (Weiler et al., 1996), was durch Neurobiotinjektionen visualisiert werden kann. Eine Deletion von Cx57 in der Maus hat einen Verlust dieser Farbstoffkopplung zufolge (Hombach et al., 2004). Cx57 zeigt wie Cx36 einen für Connexine untypischen genomischen Aufbau. Der größte Teil der kodierenden Region von Cx57 befindet sich auf Exon 2; die letzten 12 Aminosäuren werden von einem dritten Exon 4 kb stromabwärts kodiert.

1.9.1 Cx57 in der Retina

Die Funktion von Cx57 ist eng verknüpft mit der Biologie der Horizontalzellen. In der Retina der Maus existiert nur ein Typ von Horizontalzellen, der axontragende Typ (Suzuki und Pinto, 1986; He et al., 2000). Er erhält Eingang von den Zapfen über seine Dendriten und Eingang von den Stäbchen über seine Axonterminalien. Die starke Kopplung zwischen den Horizontalzellen bei mittleren Lichtintensitäten bewirkt, dass ihre rezeptiven Felder größer als ihre dendritischen Felder sind, d.h. sie bekommen Eingang von Photorezeptoren, mit denen sie nicht direkt synaptisch verbunden sind (Bloomfield et al., 1995). Shelley et al. (2006) zeigten, dass die rezeptiven Felder der Horizontalzellen in Cx57-Defekt-Mäusen entsprechend reduziert sind. Eine wesentliche Aufgabe des Horizontalzell-Synzytiums besteht in der lateralen Rückkopplungs-Inhibierung der Zapfen (Baylor et al., 1971). Auf diese Weise wird der Informationsfluss von den Photorezeptoren auf die nachgeschalteten Bipolarzellen moduliert (Dowling, 1987). Es wird eine Lichtadaption der Photorezeptoren erreicht und die Kontrastsensitivität erhöht. Neurotransmitter wie z.B. Dopamin (Perlman und Ammermüller, 1994) oder Retinsäure (Weiler et al., 2000) passen das Ausmaß der Horizontalzellkopplung an die Lichtverhältnisse an. Dopamin reduziert die Kopplung zwischen diesen Zellen (He et al., 2000, Reitsamer et al., 2006). Der Verlust der Cx57-vermittelten Horizontalzellkopplung hat

nur minimale Auswirkungen auf den Zentrum/Umgebungs-Antagonismus der Ganglienzellen (Dedek et al., in Vorbereitung). Darunter versteht man die gegensätzliche Reaktion (Aktivierung/Hemmung) der Ganglienzellen, wenn ihr rezeptives Feld, anatomisch dargestellt durch den Dendritenbaum, Eingang von elektrischen Impulsen erhält bzw. wenn ihre Umgebung stimuliert wird.

Es wird postuliert, dass Cx57 wie möglicherweise Cx26 in Horizontalzellen der Karpfen- und Schildkrötenretina (Janssen-Bienhold et al., 2001; Kamermans et al., 2001; Pottek et al., 2003) Halbkanäle bildet. Ähnliches gilt für das mit Cx57 eng verwandte Cx52.6 aus dem Zebrafisch, das exogen Halbkanäle in *Xenopus*-Oozyten ausprägt (Zoidl et al., 2004). Damit wird Cx57 zu einem Kandidatenprotein für die Ausbildung einer ephaptischen Synapse in der Maus, durch die die laterale Rückkopplungs-Inhibierung vermittelt werden soll (Kamermans et al., 2001). Allerdings wurde eine gestörte Rückkopplung an den Cx57-defizienten Mäusen nicht festgestellt (Shelley et al., 2006).

1.9.2 Die ephaptische Synapse

Die ephaptische Synapse wurde von Kamermans et al. (2001) als Mechanismus der lateralen Rückkopplungs-Inhibierung im Goldfisch vorgeschlagen. Ermöglicht wird sie durch die enge

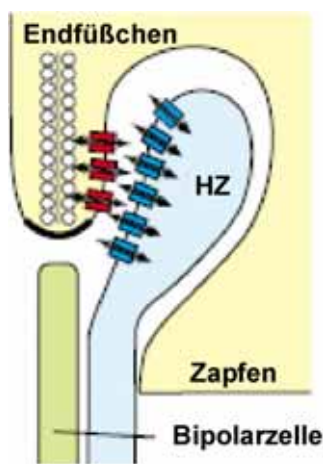


Abb.1.4: Schematische Darstellung der ephaptischen Synapse. Durch die räumliche Nähe der Zapfen-Endfüßchen zu den Dendriten der Horizontalzellen (HZ) beeinflusst eine Veränderung des elektrischen Feldes infolge aktiver Halbkanäle (blau) das Öffnungsverhalten der spannungsgesteuerten Kalzium-Kanäle (rot; nach Kamermans und Fahrenfort, 2004).

Nachbarschaft der dendritischen Endigungen der Horizontalzellen zu den Zapfen-Endfüßchen (*cone pedicles*), die durch die Bandsynapsen (*ribbon synapses*) charakterisiert sind und auf die Bipolarzellen projizieren (Abb. 1.4). Bei Dunkelheit ist die Plasmamembran der Zapfen depolarisiert, und Glutamat wird freigesetzt. Die Aufnahme von Photonen bewirkt eine Hyperpolarisation der Zapfenmembran und somit eine reduzierte Glutamat-Ausschüttung. Dadurch wird die Plasmamembran der Horizontalzell-Dendriten hyperpolarisiert. Die Connexin-Halbkanäle in dieser Membran öffnen sich und dienen als Abflussöffnungen für K^+ und Ca^{2+} -Ionen aus dem synaptischen Spalt; die Horizontalzellen dienen somit als Auffangbecken (*current sink*) von positiven Ladungen. Auf diese Weise wird das Potential über der Zapfenmembran weniger negativ und die dort befindlichen spannungssensitiven Kalzium-Kanäle öffnen sich. Ca^{2+} strömt in die Zapfen ein, die damit wieder mehr Glutamat ausschütten und somit inhibiert sind. Prinzipiell können auch andere Kanäle in der Plasmamembran der Horizontalzell-Dendriten als Abflussöffnungen dienen, z.B. Glutamat-gesteuerte Kanäle (Fahrenfort et al., 2005). Im Goldfisch sind in den dendritischen Endigungen der Horizontalzellen jedoch die

Connexin-Halbkanäle sehr konzentriert, was eine ephaptische Modulation begünstigt. In der Maus wurde das Modell der ephaptischen Synapse bisher noch nicht nachgewiesen.

1.10 Erzeugung genetisch veränderter Mäuse und Werkzeuge zur Manipulation der Maus

Viele Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung von Connexinen *in vivo* wurden an Mäusen gewonnen, in denen das Gen für eine Connexin-Isoform ausgeschaltet war (z.B. Güldenagel et al., 2001, Krüger et al., 2000, Odermatt et al., 2003). Zur genetischen Manipulation der Maus stehen zwei Wege offen: Die Vorkerninjektion und die homologe Rekombination. Bei der Vorkerninjektion wird in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle Vektor-DNS injiziert, die daraufhin an zufälligen Stellen stabil in das Mausgenom integriert, meist mehrfach hintereinander (Vintersten et al., 2004). Die Vektor-DNS enthält neben der kodierenden Region beispielsweise für ein Fusionsprotein oder die Cre-Rekombinase (Kap. 1.10.1) eine aus dem Mausgenom stammende Promotorregion, die die Ausprägung dieses Gens kontrolliert. BACs (*bacterial artificial chromosomes*) sind in der Lage, bis zu 300 kb DNS-Sequenz aufzunehmen (Marshall et al., 2004; Giraldo und Montoliu, 2001), so dass hier ein entsprechend großes Promotorfragment mit möglichst vielen cis-regulatorischen Elementen verwendet werden kann. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass der Promotor seine Zelltypspezifität beibehält. Vorteile der Vorkerninjektion sind die relativ rasche Herstellung einer genetisch veränderten Maus. Da das Vektorkonstrukt jedoch zufällig in das Genom integriert, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dabei kodierende Bereiche zerstört werden, was eventuell zu einem unerwünschten Phänotyp führt. Darüber hinaus sind Wechselwirkungen des eingebrachten Promotors mit endogenen regulatorischen Sequenzen möglich, so dass die Aktivität des Promotors modifiziert wird. Durch Vorkerninjektion erzeugte Mäuse führen meist zu einem Funktionsgewinn. Prägen die Tiere dabei ein wirtsfremdes Gen aus, spricht man von *transgenen* Mäusen.

Alternativ dazu werden beispielsweise Mäuse, in denen ein Gen inaktiviert wurde, sogenannte Deletionsmutanten (Defekt-Mäuse, *knock out*-Mäuse) mithilfe der homologen Rekombination hergestellt (Theis et al., 2000). Dabei findet zunächst die gezielte genetische Veränderung des Kandidaten-Lokus in embryonalen Stammzellen der Maus statt. Diese werden anschließend in isolierte, sich entwickelnde junge Mausembryonen im Blastozystenstadium injiziert, so dass sie an der Entwicklung des Embryos teilhaben. Die manipulierten Embryonen werden anschließend von einem scheinchwangeren Ammentier ausgetragen. Bei den resultierenden Mäusen handelt es sich um Chimären aus Wildtyp- und den veränderten Zellen (Abb.1.5). Haben die genetisch veränderten ES-Zellen an der Entwicklung der Keimdrüsen teilgenommen, kommt es zur Keimbahntransmission. Die eingebrachte Mutation wird vererbt, so dass eine neue Mauslinie entsteht. Das Konstrukt, das bei der homologen Rekombination anstelle der kodierenden Region des Kandidatengens in den Lokus eingebracht werden soll,

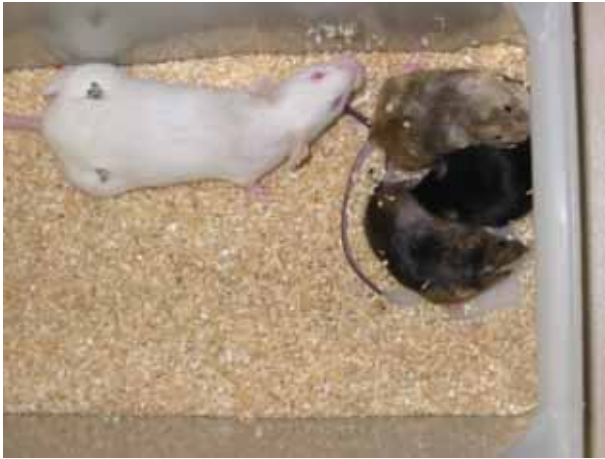


Abb. 1.5: Ammentier mit Wurf. Die Nachkommen, aus Blastozysten mit einer Anlage für schwarze Fellfarbe sowie aus genetisch veränderten embryonalen Stammzellen mit einer Anlage für braune Fellfarbe (*agouti*) resultierend, zeigen einen unterschiedlichen Chimärismusgrad, je nach Agouti-Anteil an der Gesamtfellfarbe (von oben nach unten): 100 %, 0 %, 50 %.

befindet sich in einem Austauschvektor und wird dabei von homologen Regionen flankiert, die zu den Sequenzen, die den zu verändernden Bereich einrahmen, identisch sind. Nach der Transfektion von ES-Zellen mit diesem Vektor kommt es somit durch die homologe Rekombination im Mausgenom zu einem Austausch des Kandidatengens gegen das Konstrukt. Je nachdem wie das Konstrukt durch die Technik der DNS-Klonierung konzipiert wurde, weist der Locus neue Eigenschaften auf. Eine Deletion eines Gens, ein *knock out*, wird häufig ergänzt durch den *knock in* eines Reportergens. Dabei wird anstelle des

Kandidatengens unter der Kontrolle seines Promotors ein Protein ausgeprägt, das über die Aktivität des Promotors und damit über die Expression der eigentlichen kodierenden Region - zumindest auf Transkriptionsebene - Auskunft gibt. Zu diesen Reporterproteinen zählen beispielsweise die β -Galaktosidase, ein Enzym, das bei Umsetzung seines Substrates zu einem blauen Niederschlag führt, oder das grün fluoreszierende Protein (GFP, *green fluorescent protein*) aus der Qualle *Aequoria victoria*, das bei Anregung mit geeigneter Wellenlänge fluoresziert (Chalfie et al., 1994). Wird ein Gen bereits auf ES-Zell-Ebene inaktiviert bzw. deletiert, spricht man von einem konventionellen *knock out*. Werkzeuge zur weiteren Manipulation des Mausgenoms stellen das Cre/loxP-System bzw. das FLP/frt-System sowie das DTR/DT-System dar. Erstere ermöglichen eine konditionale Deletion bestimmter Gene, letzteres die konditionale Deletion bestimmter Zelltypen.

1.10.1 Das Cre/loxP-System

Das Cre/loxP-System (Gu et al., 1993) aus dem Bakteriophagen *P1* dient der konditionalen zelltypspezifischen Deletion von Genen und besteht aus zwei Komponenten: zum einen aus der Cre-Rekombinase (*Cre*, *causes recombination*) und zwei palindromischen Erkennungssequenzen für dieses Enzym, den loxP-Stellen (*loxP*, *locus of crossing over of P1*). Um ein Gen konditional auszuschalten, muss es stromauf- und stromabwärts von zwei gleichorientierten loxP-Erkennungssequenzen flankiert sein („gefloxt“; Abb. 1.6a). Dazu wird das von loxP-Stellen eingerahmte gefloxt Gen über homologe Rekombination gegen sein Wildtyp-Allel ausgetauscht. Durch Verpaarung dieser Mutanten mit meist durch Vorkerninjektion hergestellten transgenen Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter einem zelltypspezifischen Promotor ausprägen, wird der gefloxt Bereich aus dem Genom dieser

unwirksame synthetische Östrogenderivat an die ER^T -Untereinheit und löst damit eine Konformationsänderung des Komplexes aus, die zur Dissoziation von HSP90 führt. Das $CreER^T$ -Protein gelangt daraufhin in den Zellkern und deletiert von $loxP$ -Stellen flankierte Bereiche. Somit kann der Zeitpunkt der Deletion von geflochten Genen nicht nur zelltypspezifisch, sondern auch zeitlich determiniert werden (Eckardt et al., 2004).

1.10.2 Das *DTR/DT*-System

Während das $CreER^T/loxP$ -System die induzierte zelltypspezifische Deletion von Genen erlaubt, ermöglicht das Diphtherietoxin-Rezeptor/Diphtherie-System (kurz: *DTR/DT*-System) die induzierte Ablation ganzer Zelltypen. Auf diese Weise kann die *in vivo*-Funktion bestimmter Zellen in einem Gewebe analysiert werden.

Das Diphtherietoxin (DT) wird von *Corynebacterium diphtheriae* sezerniert. Es lässt sich in zwei Komponenten spalten, DT-Fragment A und DT-Fragment B. DT-Fragment B bindet an einen Rezeptor auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen, woraufhin das gesamte Toxin durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. DT-Fragment A gelangt ins Zytosol und katalysiert dort die ADP-Ribosylierung eines modifizierten Histidinrestes (*Diphthamid*) des Translationselongationsfaktors EF-2 (Honjo et al., 1968). Auf diese Weise wird die Proteinbiosynthese inhibiert; die Zelle unterliegt der Apoptose (Morimoto und Bonavida, 1992). Dazu genügt ein einziges aufgenommenes DT-Molekül (Yamaizumi et al., 1978), da es die Ribosylierung von einigen tausend EF-2-Molekülen katalysiert. Zusätzlich scheint Diphtherie-Toxin mit Komponenten des Todesrezeptor-Signalweges zu interagieren (Thorburn et al., 2003), was unterstreicht, dass es sich bei dem Absterben der Zelle um Apoptose handelt. Als ein Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) wurde eine membranständige Form des heparinbindenden Epidermis-Wachstumsfaktor-ähnlichen Wachstumsfaktors (HB-EGF-Vorläufer) identifiziert (Naglich et al., 1992). Das DT-Fragment B bindet den HB-EGF-Vorläufer von Primaten, nicht aber von Ratten und Mäusen (Mitamura et al., 1995). Dementsprechend sind murine Zellen 10^5 fach resistenter gegenüber DT als Primaten-Zellen (Pappenheimer et al., 1982). In dem *DTR/DT*-System wird der DTR aus Primaten unter einem zelltypspezifischen Promotor im Genom der Maus ausgeprägt (Abb. 1.7). Auf diese Weise erlangt der entsprechende Zelltyp Sensitivität gegenüber DT; bei Injektion des Toxins geht er gezielt zugrunde (Cha et al., 2003). Die Expression des DTR allein hat keine Auswirkungen auf die Zelle. Das injizierte DT übt auch in hohen Dosierungen keinen negativen Effekt auf murine Zellen aus, die den DTR nicht ausprägen (Saito et al., 2001). Dadurch wird eine sensitive Induktion der Ablation eines gewünschten Zelltyps in der Maus erreicht. Das *DTR/DT*-System ermöglicht die Erzeugung und Analyse von Mausmodellen, die das pathologische Zugrundegehen von Zellpopulationen im Menschen - z.B. die dopaminergen Neuronen von Parkinson-Patienten oder die B-Zellen bei AIDS-Kranken – simulieren. Durch seine Induzierbarkeit sind Studien zur Regeneration von Zellen möglich.

Wie bei dem *Cre/loxP*-System wurde das *DTR/DT*-System bisher meist über Vorkerninjektion (Saito et al., 2001, Jung et al., 2002), aber auch über homologe Rekombination (Buch et al., 2005, Bennett et al., 2005) in das Genom der Maus integriert.

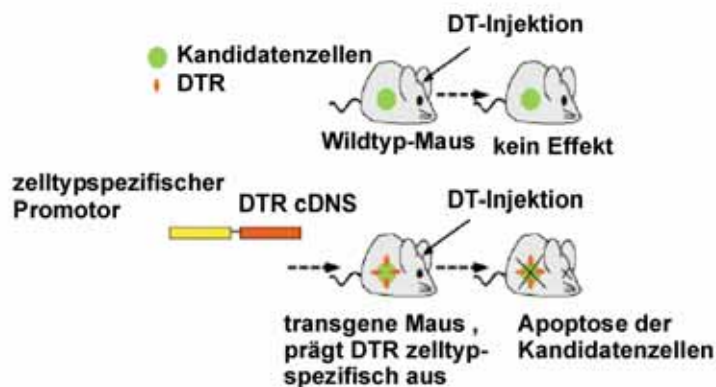


Abb. 1.7: Das DTR/DT-System. Zellen, die in der transgenen Maus den Primaten-Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) ausprägen, gehen nach Injektion von Diphtherietoxin (DT) zugrunde. Auf Wildtyp-Mäuse hat DT keinen Effekt (nach Saito et al., 2001).

1.11 Ziel dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die konditional Cx36-defiziente Mausmutante *Cx36flox(CFP)* mit dem von Dr. Joachim Degen klonierten ES-Zell-Austauschvektor *pJD-Cx36flox* erzeugt und charakterisiert werden. Durch anschließende Verpaarungen von *Cx36flox(lacZ)*- und *Cx36flox(CFP)*-Mäusen mit verschiedenen Cre-transgenen Mäusen sollten die Zelltypen bestimmt werden, in denen es zu einer zelltypspezifischen Deletion von Cx36 in der Retina kommt. Dadurch sollte die Bedeutung der Cx36-vermittelten Kopplung für die einzelnen neuronalen Subtypen analysiert werden. Eine induzierte Deletion von Cx36 sollte Aufschluss über mögliche Phänotypen oder Anomalien in den Gehirnen adulter Mäuse geben, wo erwartet wurde, dass kompensatorische Mechanismen weniger stark als während der Entwicklung ausgeprägt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten Antikörper gegen das Cx57-Protein mittels transfizierten HeLa-Zellen auf ihre Aktivität hin untersucht und anhand von Cx57-Defekt-Mäusen auf ihre Spezifität in der Retina analysiert werden. Gleichzeitig sollte darüber hinaus Cx57 als Protein in den Horizontalzellen nachgewiesen werden.

Darüber hinaus stand die Erzeugung eines Austauschvektors zur homologen Rekombination in ES-Zellen an, wodurch die Etablierung einer neuen Mauslinie ermöglicht werden sollte. In dieser Mauslinie sollte die gezielte Ablation von Horizontalzellen induziert oder alternativ eine Deletion von geflochten Genen in Horizontalzellen erreicht werden können. Dazu war der Austauschvektor so zu konstruieren, dass der Diphtherie-Toxin-Rezeptor und die *Cre*-Rekombinase in den Cx57-Lokus des Mausgenoms rekombiniert werden können. In Zellkulturexperimenten sollte die Funktionalität des verwendeten *DTR/DT*-Systems sowie der *Cre*-Rekombinase untersucht werden.

2 MATERIAL

2.1 Allgemeine Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien werden, sofern nicht anders vermerkt, in Analysequalität (p.a.) von den Firmen Difco, Fluka, Gibco BRL, ICN Biomedicals, Merck, Perbio Science (Pierce), Renner, Riedel-de-Haen, Roth, Serva und Sigma bezogen. Enzyme und Nukleotide stammen von den Firmen Amersham Biosciences, MWG-Biotech, New England Biolabs, Promega und Roche. Radiochemikalien werden bei Amersham Biosciences erworben. Die Verwendung dieser Radiochemikalien erfolgt unter Berücksichtigung von Kalibrierungsdatum und Halbwertszeit. Falls nicht anders angegeben, werden Lösungen, Puffer und Medien in sterilem A. bidest angesetzt, wenn möglich 20 min (RNS-Lösungen: 1 h) autoklaviert und bei RT aufbewahrt. Die pH-Werte werden mit 10 N NaOH oder HCl konz. eingestellt.

2.2 Allgemeine Labor- und Zellkulturmaterialien

Material	Hersteller
Faltenfilter, Rotrandfilter (0,2 µm, steril), 3MM-Papier	Schleicher und Schuell
Glaswolle	Roth
Hybond™-ECL™ Nitrozellulosemembran	Amersham Biosciences
Hybond™-N Nylonmembran	Amersham Biosciences
Objektträger, Deckgläschen	Marienfeld
Pipettenspitzen, Reagenzgefäße	Sarstedt, Falcon
Röntgenfilm Super RX	Fuji
Röntgenfilm X-OMAT AR	Sigma
Sterile Zellkulturartikel	Falcon, Sarstedt, Nunc, Becton Dickinson
SuperFrost Objektträger (für Gefrierschnitte)	Menzel-Gläser

2.3 Allgemeine Lösungen

PBS⁻
pH 7,2

133 mM NaCl
2,7 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
Für die Kultur von HeLa-Zellen 20 min autoklavieren. Für die Kultur von HM1-Zellen wird kommerziell erworbenes endotoxinfreies PBS⁻ verwendet.

Tris-HCl
pH 7,4

1 M Tris-HCl (Sigma)
Zu ca. ¾ in 1 M HCl ansetzen,
auffüllen.

2.4 Lösungen für die Nukleinsäureanalytik

Denaturierungslösung Southern Blot	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
DEPC-H₂O	0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (toxisch!) Lösung mehrere h rühren lassen, dann 1 h autoklavieren.
Depurinierungslösung Southern Blot	0,25 M HCl
DNS-Ladepuffer (6x)	0,25 % (v/v) Bromphenolblau 0,25 % (v/v) Xylencyanol 30 % (v/v) Glycerin Bei 4 °C lagern.
dNTP-Mix (10 mM)	je 0,1 Vol. 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP 0,6 Vol. TE-Puffer (pH 8,0) Bei -20 °C lagern.
ES-Lysis-Puffer	50 mM NaCl 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM EDTA 0,5 % SDS-Lösung 2 mM CaCl ₂ Sterilfiltrieren.
Ethidiumbromid	10 mg/ml Stammlösung (karzinogen!) Lichtgeschützt bei -4 °C lagern.
Hybridisierungspuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 70 mM NaCl
Lösung I (Minipräparation)	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA
Lösung II (Minipräparation)	0,2 M NaOH 1 % SDS
Lösung III pH 5,5 (Minipräparation)	3 M Kaliumacetat 1,8 M Essigsäure
MOPS-Laufpuffer (10x) pH 7,0	400 mM MOPS 100 mM Natriumacetat 10 mM EDTA 1 h autoklavieren.
Natriumacetat pH 5,2	3 M Natriumacetat Ad 100 ml, pH 4,8 einstellen.
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml Proteinase K (Roche) 1 ml-Aliquots bei -20 °C lagern.
RNase 2000	100 mg RNase A 1 ml RNase T (1 x 10 ⁵ U) 49 ml RNase-Puffer 15 min kochen, langsam abkühlen lassen und in 2 ml-Aliquots bei -20 °C lagern.

RNS-A. bidest	Einstündig autoklaviertes A. bidest
RNS-Denaturierungspuffer	11,25 µl deionisiertem Formamid 4,5 µl Formaldehyd (35 %) 2,25 µl 10 x MOPS 2,25 µl Ethidiumbromid-Lösung (400 µg/ml) 0,5 µl DEPC-H ₂ O Frisch ansetzen.
RNS-Ladepuffer (10x)	0,4 % Bromphenolblau (Serva) 0,4 % Xylencyanol (Sigma) 1 mM EDTA 50 % (v/v) Glycerin In DEPC-A.bidest lösen und bei – 20 °C lagern.
Schwanzspitzen-Lysis-Puffer	0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) 5 mM EDTA 0,2 M NaCl 0,2 % SDS-Lösung
Sephadex G50	30 g Sephadex G50 300 ml TE-Puffer Quellen lassen (RT, üN), überschüssigen TE-Puffer durch frischen 1:1 ersetzen, 1h autoklavieren.
SSC (20x) pH 7,0	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat
Stripping-Puffer (für Membranen)	1 mM Tris pH 7,5 - 8 0,1% SDS
TBE-Puffer (0,75x)	181,65 g Tris-HCl (Sigma) 77,025 g Borsäure 5,595 g EDTA Ad 20 l.
TE-Puffer pH 8,0	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA

2.5 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml) (pH 7,4)	0,5 g Ampicillin in 5 ml A. bidest lösen, sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20 °C lagern; Endkonzentration im Selektionsmedium: 100 µg/ml.
IPTG-Stammlösung (0,5 M)	Sterilfiltrieren und in Aliquots bei -20 °C lagern.
LB-Agar	LB-Medium 1,8 % Dunkel-Agar (Difco) 20 min autoklavieren; ggf. Zugabe von Ampicillin bei 55 °C, danach Platten unter der Sterilbank gießen und aushärten lassen. Lichtgeschützt bei 4 °C lagern.
LB-Medium pH 7,4	10 g Bacto-Trypton (Difco) 5 g Hefeextrakt (Difco) 10 g NaCl Ad 1 l, 20 min autoklavieren; Zugabe von Ampicillin bei 55 °C.

TFB I pH 5,8	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl ₂ 100 mM RbCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin Sterilfiltrieren; Lagerung bei 4 °C.
TFB II pH 7,0	10 mM Na-MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin Sterilfiltrieren; Lagerung bei 4 °C
YT⁺⁺-Medium pH 7,5	8 g Bacto-Trypton (Difco) 5 g Hefeextrakt (Difco) 5 g NaCl Ad 1 l; nach Autoklavieren und Abkühlen 20 ml MgSO ₄ (1 M, autoklaviert) 10 ml KCl (1 M, autoklaviert) hinzufügen.

2.6 Medien und Lösungen für die Kultur von HeLa-, N2A- und HM1-Zellen

Die Medien werden bei 4 °C aufbewahrt und vor Gebrauch 15 min in einem 37 °C warmen Wasserbad oder länger bei RT erwärmt.

D 10-AS-Medium (für N2A-Zellen)	DMEM 10% (v/v) fötales Kälberserum (56 °C, 30 min hitzeinaktiviert) 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung 5 ml Aminosäuren 100x (Sigma)
D 10-Hygromycin B-Medium	D 10-Medium 300 µg/ml Hygromycin B
D 10-Medium (für HeLa-Zellen)	DMEM 10% (v/v) fötales Kälberserum (56 °C, 30 min hitzeinaktiviert) 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung
D 10-Puromycin-Medium	D 10-Medium 1 µg/ml Puromycin
DMEM pH 6,9 Doxycyclin-Stammlösung (4 mg/ml)	Dulbecco's Modified Eagle Medium (10 g/l) Lagerung bei -20 °C
ES-EDTA-Lösung	5 mM EDTA Ad 500 ml mit ES-PBS ⁻ (Sigma).
ES-EDTA-Lösung pH 7-8	5 mM EDTA In ES-PBS ⁻ (Sigma) ansetzen.
ES-Einfriermedium	ES-WT-Medium 20 % FCS, ES-Zellkultur-getestet (Sigma) 20 % DMSO (Merck) Bei -20 °C bis zu einem Jahr lagerbar.

ES-Selektionsmedium	ES-WT-Medium 350 µg/ml G418-Stammlösung Bei 4 °C bis zu vier Wochen lagerbar.
ES-Trypsin-Lösung	400 ml ES-PBS ⁻ 100 ml ES-EDTA-Lösung 5 ml Hühnchen-Serum (Gibco) 5 ml Trypsin (2,5 %, Gibco) 50 ml-Aliquots bei -20 °C lagern.
ES-WT-Medium	500 ml Glasgow-MEM (Biochrom AG) 28 ml FCS, ES-Zellkultur-getestet (Sigma) 28 ml NCS, ES-Zellkultur-getestet (Sigma) 5,4 ml Na-Pyruvat, 100 mM (Sigma #S8636) 5,4 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung, 100x (Sigma) 5,4 ml Glutamin, 200 mM (Sigma) 5,4 ml Aminosäuren, 100x (Sigma) 550 µl LIF 550 µl β-Mercaptoethanol-Stammlösung Bei 4 °C bis zu vier Wochen lagerbar.
G418-Stammlösung	50 mg/ml G418-Sulfat aktiv 100 mM PIPES (Sigma) Sterilfiltrieren; 20 ml-Aliquots bei -20 °C lagern.
Gelatine-Gebrauchslösung (0,1 %)	Gelatine-Stammlösung 1:10 in Zellkultur-H ₂ O (Sigma) verdünnen.
Gelatine-Stammlösung (1 %)	1 % Gelatine In Zellkultur-H ₂ O (Sigma), 1 h autoklavieren; Lösung mischen und nochmals 1 h autoklavieren; bei 4 °C bis zu einem Jahr lagerbar.
HeLa-Trypsin-Lösung (pH 7,5)	0,04 % Trypsin (Sigma) 0,5 mM EDTA-Natriumsalz (Serva) In Puck'scher Saline ansetzen; Lagerung bei -20 °C oder angebrochen bei 4 °C.
Isotonische KCl-Lösung	0,56 % Kaliumchlorid In Zellkultur-H ₂ O (Sigma) ansetzen; bei 4 °C lagern.
Penicillin/Streptomycin- Stammlösung (100 x) pH 8,2	0,6% (w/v) Penicillin G 1% (w/v) Streptomycinsulfat In Puck'scher Saline ansetzen, Lagerung bei -20° C.
Puck'sche Saline	137 mM NaCl 5,4 mM KCl 5,5 mM D(+)-Glukose 4,5 mM NaHCO ₃ Sterilfiltrieren; Lagerung bei -20 ° C.
Puromycin-Stammlösung (0,5 mg/ml)	0,05 % Puromycin In Zellkultur-H ₂ O (Sigma) ansetzen, sterilfiltrieren; 1 ml-Aliquots bei -20 °C lagern.
β-Mercaptoethanol-Stammlösung	0,7 % β-Mercaptoethanol (Sigma) In Zellkultur-H ₂ O (Sigma), sterilfiltrieren; 1,2 ml-Aliquots bei - 20 °C bis zu einem Jahr lager- bar.

2.7 Lösungen für die Narkose von Mäusen und die Superovulation von Mäuseweibchen

FSH-Lösung (50 U/ml)	5000 U Pregnant Mare Serum (Calbiochem) Ad 100 ml mit isotonischer NaCl-Lösung, sterilfiltrieren; 1ml-Aliquots bei -20 °C etwa ein Jahr haltbar.
hCG-Lösung (50 U/ml)	hCG-Stammlösung Ad 10 ml mit isotonischer NaCl-Lösung, sterilfiltrieren; 1 ml-Aliquots bei -20 °C maximal einen Monat haltbar.
hCG-Stammlösung (50 U/Aliquot)	5000 U Predalon (Organon, rezeptpflichtig) Ad 1 ml mit isotonischer NaCl-Lösung; 100 µl-Aliquots lyophilisieren, Pulver bei -70 °C ca. ein Jahr haltbar.
isotonische NaCl-Lösung (0,9 %)	4,5 g NaCl Ad 500 ml, 1h autoklavieren; Lagerung bei 4 °C.
Xylazin-Ketamin (Narkotikum)	4,25 ml isotonische NaCl-Lösung 0,5 ml Rompun (2 %, Bayer) 0,25 ml Ketavet (100 mg/ml, Pharmacia & Upjohn) Bei 4 °C mind. eine Woche lagerbar; 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal injizieren.

2.8 Lösungen für die Proteinanalytik

Sämtliche Lösungen werden, sofern nicht anders vermerkt, mit deionisiertem Wasser (Millipore, Eschborn) angesetzt.

Ammoniumpersulfat (APS) (10 %)	0,1 g APS in 1 ml deionisiertem Wasser lösen, vor Gebrauch frisch ansetzen.
Complete™-Stammlösung (Gemisch aus Protease-Hemmern, 25 x)	1 Tablette Complete™ (Roche) in 2 ml A. bidest lösen; Aliquots bei -20 °C lagern.
Coomassie Brilliant Blue™-Färbelösung	0,25 % Coomassie R250 10 % Essigsäure 50 % Methanol Lösung durch Faltenfilter filtrieren und lichtgeschützt bei RT lagern; kann mehrmals verwendet werden.
Coomassie-Entfärber-Lösung	10 % Essigsäure 30 % Methanol
Cx36-Immunfluoreszenz-Blockierungslösung Retina	4 % BSA 0,1 % Triton®-X 100 Immer frisch in PBS- ansetzen.
DAB-Färbelösung	0,01 % H ₂ O ₂ Immer frisch in DAB-Lösung ansetzen.

Diaminobenzidin (DAB)-Lösung	0,06 % DAB In TBS ansetzen; sterilfiltrieren; Lagerung bei -20 °C.
Elektrophorese-Puffer (10 x) pH 8,3	30 g Tris-Base (Sigma) 144 g Glyzin 100 ml SDS (10 %) Ad 1 l.
Eosin-Färbelösung	0,1 % Eosin Y (Sigma) Filtriert mehrfach wiederverwendbar.
GFP-Immunfluoreszenz-Blockierungslösung Retina	5 % BSA 5 % NGS 0,1 % Triton-X 100 Immer frisch in PBS- ansetzen.
GFP-Immunhistochemie-Blockierungslösung Retina	10 % NGS 0,5 % Triton-X 100 Immer frisch in TBS ansetzen.
Hoechst 33258-Lösung	0,1 % (w/v) Hoechst 33258 In PBS- ansetzen; 1 ml-Aliquots bei -20 °C lagern; bei Gebrauch 1:1000 in PBS- verdünnen.
Immunfluoreszenz-Blockierungslösung (für HeLa-Zellen)	4 % (w/v) BSA 1 % (w/v) NGS 0,1 % (v/v) Triton® X-100 Lösung immer frisch in PBS ⁻ ansetzen.
Immunoblot-Blockpuffer	5 g Magermilchpulver (Sucofin) Ad 100 ml mit Immunoblot-Waschpuffer (1x); Lösung immer frisch ansetzen.
Immunoblot-Waschpuffer (10x) (Lagerung)	13,4 g Tris-HCl (Sigma) 2 g Tris-Base (Sigma) 29 g NaCl Ad 1l.
Immunoblot-Waschpuffer (1x) gebrauchsfertig	50 ml Immunoblot-Waschpuffer (10x) 500 µl Tween [®] 20 Ad 500 ml; Lösung immer frisch ansetzen.
Kopplungspuffer	200 mM Triethanolamin (pH 8,2) 20 mM Dimethylpimelimidat-Hydrochlorid
Laemmli-Puffer (4x)	0,25 M Tris-HCl (pH 7,4) 12 % SDS 40 % Glycerin 20 % β-Mercaptoethanol 0,1 % Bromphenolblau Aliquots lagerbar bei -20 °C; vor Gebrauch auf RT erwärmen, mit A.bidest auf 1x verdünnen und 1x Complete [™] hinzugeben; angebrochene Aliquots bei RT aufbewahren.
Nagy-Perfusionslösung 1	50mM Natriumphosphat-Puffer pH7,4 0,1 % Natriumnitrit 1 U/ml Liquemin (Roche)

Nagy-Perfusionslösung 2	160 mM Natriumphosphat-Puffer pH7,0 0,2 % Picrinsäure 1 % PFA
Nagy-Perfusionslösung 3	25 mM Natriumphosphat-Puffer pH7,4 10 % Sucrose
Nagy-Sucroselösung	25 mM Natriumphosphat-Puffer pH7,4 10 % Sucrose 0,04 % NaN ₃
Nagy-TBS-T-Puffer pH 7,6	6,05 g Tris-Base (Sigma) 15 g NaCl 0,3 % Triton-X 100 Ad 1 l.
Phosphatpuffer (0,1 M) pH-Wert je nach Anforderung	100 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 9,16) pH-Wert einstellen mit 100 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4,7)
Ponceau-Färbelösung	0,2 % Ponceau S 1 % Essigsäure Lagerung lichtgeschützt bei RT; Lösung nach Gebrauch filtriert mehrfach wiederverwendbar.
Propidiumjodid-Lösung	10 mg Propidiumjodid (Sigma) Ad 1 ml mit PBS ⁻ ; Bei 4 °C dunkel lagern; vor Gebrauch 1:25.000 in PBS- verdünnen.
Proteinsammelgel-Puffer pH 6,8	30,25 g Tris-Base (Sigma) 20 ml SDS (10 %) Ad 500 ml.
Proteintrenngel-Puffer pH 8,8	91 g Tris-Base (Sigma) 20 ml SDS (10 %) Ad 500 ml.
RIPA-Lysispuffer pH 7,2	10 mM Phosphatpuffer 0,1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Triton-X100 0,1 % (w/v) Natriumdesoxycholat 40 mM NaF Vor Verwendung 1 x Complete™ hinzugeben.
RIPA-Waschpuffer pH 7,0	10 mM Phosphatpuffer 1 M NaCl 10 mM EDTA 40 mM NaF 0,2 % (v/v) Triton-X100
RNase 2000-Lösung	Vor Gebrauch 1:100 in PBS- verdünnen.
Sepharose/ProteinA-Sepharose	200 mg Sepharose bzw. Protein A-Sepharose in 1 ml TBS drehend quellen lassen (4 °C, 4-6 h), Sepharose abzentrifugieren (6000 UpM, 4 °C, 10 min,) und in 1 ml TBS drehend inkubieren (4 °C, üN); wie oben abzentrifugieren und mit einem der Sepharose entsprechenden Volumen NaN ₃ -haltigem TBS versetzen; Lagerung bei 4 °C.

Sucroselösung	30 % Sucrose In PBS- ansetzen.
TBS-Puffer pH 7,5-pH 7,6	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl
Tris-Puffer pH 7,4-pH 7,6	50 mM Tris-HCl
Western Blot-Transferpuffer (1x)	200 ml Western Blot-Transferpuffer (5x) 200 ml Methanol Ad 1 l; Lösung immer frisch ansetzen.
Western Blot-Transferpuffer (5x) pH 8,1 - 8,3	15,4 g Tris-HCl (Sigma) 18,5 g Tris-Base (Sigma) 144,2 g Glyzin Ad 2 l (pH muß nicht eingestellt werden).

2.9 Lösungen für die β -Galaktosidase-Nachweisreaktion

lacZ-Basislösung	385 ml Na ₂ HPO ₄ (0,2 M) 115 ml NaH ₂ PO ₄ (0,2 M) 25 ml MgCl ₂ (50 mM) 10 ml EGTA (0,5 M, pH 8,0) Ad 1 l; Lagerung bei RT.
lacZ-Fixierlösung	lacZ-Basislösung 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd Immer frisch ansetzen.
lacZ-Substratlösung	lacZ-Waschlösung 5 mM K ₃ [Fe(CN) ₆]-Lösung 5 mM K ₄ [Fe(CN) ₆]-Lösung 1 mg/ml X-Gal-Lösung (Roth) Bei 4 °C dunkel lagern; Lösung filtriert mehrfach verwendbar.
lacZ-Waschlösung	lacZ-Basislösung 0,01 % (v/v) Na-Deoxycholat 0,02 % (v/v) Nonidet P40 (Roche)

2.10 Kommerzielle Reagenziensätze

Name	Referenz
Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit	Sigma
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Jetstar Plasmid Midi Kit 50	Genomed
Lipofectamine™ 2000 Reagent	Invitrogen
Multiprime DNA Labelling System	Amersham Biosciences
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
ReadyMix™ REDTaq™ PCR Reaction Mix with MgCl ₂	Sigma
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Pierce

SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate

Pierce

2.11 Geräte

Gerät	Hersteller
Axiophot: Durchlicht-/Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossener AxioCam Color HR	Zeiss
Binokular MS5	Leica
Blotting-Chamber Mighty-Small II (Western Blot)	Bio-Rad
Elektrophoresekammer Mighty Small II SE250/SE260 mit SE245 (SDS-PAGE)	Hoefer
Elektrophoresekammern Pharmacia GNA-100 und -200 (Nukleinsäuren)	Pharmacia
Inkubatoren für die eukaryotische Zellkultur mit CO ₂ -Regelung	Heraeus
Kryostat HM500OM	Microm
Kühlzentrifuge 5415 R (24 Röhren)	Eppendorf
Laser Scan-Mikroskop	Zeiss
Multifuge 3 S-R	Heraeus
PCR Maschine PTC-100 und PTC 200 Programmable Thermal Controller	BioZym
Primus 96 plus Thermocycler	MWG Biotech AG
Spektralphotometer DU 640	Beckman
Szintillationszähler LS 1801	Beckman
Ultraschallbad Transonic T460, ELMA und Ultraschallspitze Sonifer B-12	Branson
UV Stratalinker 2400	Stratagene
UV-Transilluminator Herolab E.A.S.Y Win32	Herolab
Vibratom VT1000S	Leica
Zentrifuge 5415 D (24 Röhren)	Eppendorf
Zentrifuge J2-21 (variabler Rotor)	Beckman
Zentrifuge Universal 2S	Hettich

2.12 Oligonukleotid-Startermoleküle für die Polymerase-Kettenreaktion

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG-Biotech zur Herstellung in Auftrag gegeben. Sie wurden lyophilisiert geliefert und in dem vom Hersteller jeweils empfohlenen Volumen TE-Puffer gelöst. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20 °C.

Name	5'→3'-Sequenz	Bindungsstelle	S/G	PCR
<i>Cx36USP-1</i>	TAA GTG CAA TAA AGG GGG AGG GCC TCG	Cx36-5'-UTR	S	<i>KW-Maus</i>
<i>Cx36DSP-1</i>	GAG ACA GGA GAA GGT ATT CCC AAG GGC	Cx36-Exon 1	G	<i>KW-Maus</i>
<i>DSP-CFP-1</i>	AAG AAG TCG TGC TGC TTC ATG CFP TGG		G	<i>KW-Maus/KW-neo</i>
<i>DSP-CFP-2</i>	TGA ACA GCT CCT CGC CCT TGC CFP TCA CC		G	<i>KW-Maus</i>

Name	5'→3'-Sequenz	Bindungsstelle	S/G	PCR
<i>Cx36deltaneo</i>	AGT TGG CAG GCA TGT TGT TCA ACC	Cx36-3'-HR	S	<i>KW-neo</i>
<i>USP Intron_Cx36</i>	TGC ATT TGC CAG AGT AAA GGT GCG	Cx36-Intron	S	<i>JD-Maus</i>
<i>DSP branch_Cx36</i>	TTC TGT TTC AGC GCT TAC CAG TCC	Cx36-Intron	G	<i>JD-Maus</i>
<i>up-IntCre</i>	TTT GCC TGC ATT ACC GGT CGA TGC	Cre- Rekombinase	S	<i>Cre-JD</i>
<i>up-Nestin-Cre</i>	TCC CTT CTC TAG TGC TCC ACG TCC	Nestin-Promotor	S	<i>Cre-JD</i>
<i>up-PGK-Cre</i>	GCT GTT CTC CTC TTC CTC ATC TCC	PGK-Promotor	S	<i>Cre-JD</i>
<i>up-PrP-Cre</i>	GAA CCA TTT CAA CCG AGC TGA AGC	PrP-Promotor	S	<i>Cre-JD</i>
<i>IntCre_rev</i>	TCC ATG AGT GAA CGA ACC TGG TCG	Cre- Rekombinase	G	<i>Cre-JD</i>
<i>USP-Flp</i>	TAA GGT CCT GGT TCG TCA GTT TGT GG	Flp-Rekombinase	S	<i>Cre-JD</i>
<i>DSP-Flp</i>	GTG ATA TTA TCC CAT TCC ATG CGG GG	Flp-Rekombinase	S	<i>Cre-JD</i>
<i>GT-PCR-DP</i>	CAA TGA GTG GTA GTG GAA GCT TAG	Cx57-Intron	S	<i>GT-Cx57</i>
<i>GT-WT-UP1</i>	GGC CCA TAT ACA CCA AAG AAG GG	Cx57	G	<i>GT-Cx57</i>
<i>lacZ UP</i>	TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AAC	lacZ	G	<i>GT-Cx57</i>
<i>RT-PCR-365UTR</i>	TAC TGC CCA GTC TTT GTC TGC TGC	Cx36-Exon 1	S	<i>RT-Cx36</i>
<i>RT-PCR-36cod_rev</i>	CAC ACC ATT ATG ATC TGG AAG ACC	Cx36-Exon 2	G	<i>RT-Cx36</i>
<i>Aktin-USP</i>	CGT GGG CCG CCC TAG GCA CCA G	Aktin-Gen	S	Aktin
<i>Aktin DSP</i>	TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G	Aktin-Gen	G	Aktin
<i>Up-ES-DTR 4</i>	TGG GCA AGC AGC ACG TAG TCA ATT AGG	<i>pKW-DTRfritCre- PCR-Test</i>	S	<i>ES-DTRfritCre</i>
<i>Down-ES-DTR 4</i>	GTG ACT CTC AAA ACG TCC AGA TCT GCC	<i>pKW-DTRfritCre- PCR-Test</i>	G	<i>ES-DTRfritCre</i>
<i>Cx57 USP4</i>	GGC CCC AAG AAT GCA ATG TCT CAG	Cx57 Exon 2	S	<i>Cx57Touch</i>

Name	5'→3'-Sequenz	Bindungsstelle	S/G	PCR
<i>Cx57 DSP6a</i>	AA GAT CTT GAA AGT AGA TAA TAC TTT	Cx57 Exon 3	G	<i>Cx57Touch</i>
<i>Cx57ko neo-USP</i>	GCT ATC AGG ACA TAG CGT TGG CTA CC	neoR	S	PCR zur Amplifikation des neoR-Cx57-Exon 2-Übergangs in genomischer DNS der <i>Cx57KO</i> -Mausmutante
<i>Cx57ko Exon 2-DSP</i>	AGA GGT GAT GGG CTG TTT TCT CCG TG	Cx57-Exon 2	G	
<i>Syn sense</i>	CCA CGT GGA AGT TCC TAT TCT - CTA GAA AGT ATA GGA ACT TCG		S	Synthetische Oligonukleotidmoleküle zur Hybridisierung; ergeben artifizielles Zwischenstück für Klonierung von <i>pKW-DTRfritCre</i>
<i>Syn antisense</i>	AAT TCG AAG TTC CTA TAC TTT - CTA GAG AAT AGG AAC TTC CAC GTG GGG CC		G	
<i>Cx57-Promotor sense</i>	GAA GCA GCT CCC AAG GAT TTG CCT GGC TG	Cx57-5'-HR <i>Cx57 KO</i>	in S	PCR zur Klonierung von <i>pKW-DTRfritCre</i>
<i>Cx57-Promotor antisense</i>	GGC CAG CTC GAG GGT TAG GAA GTC ACA TC	Cx57-5'-HR <i>Cx57 KO</i>	in G	

S: Sinn-Oligonukleotid-Startermolekül, G: Gegensinn-Oligonukleotid-Startermolekül.

2.13 Größenstandards

Standard	Fragmentgrößen in kb bzw. kDa	Konzentration	Auftrag
100 bp-DNS Leiter (Invitrogen)	2,0; 1,5; in 0,1 kb-Schritten bis 0,1 kb Die 0,6 kb-Bande ist hervorgehoben.	50 ng/μl	10 μl
1 kb-DNS Leiter (Invitrogen)	12,2; 11,2; 10,2; 9,15; 8,15; 7,1; 6,1; 5,1; 4,1; 3,05; 2,05; 1,65; 1,0; 0,5; 0,4; 0,34; 0,3; 0,22; 0,2; 0,15; 0,13; 0,08 Die 1,65 kb-Bande ist hervorgehoben.	50 ng/μl	10 μl – 25 μl
Lamba-DNS (Roche); HindIII/EcoRI-gespalten	21,2; 5,1; 5,0; 4,3; 2,0; 1,9; 1,7; 1,4; 0,95; 0,83; 0,5; 0,125	80 ng/μl	5 μl
0,5 – 1 kb RNS Leiter (Invitrogen)	10; 8; 6; 4; 3; 2; 1,5; 1; 0,5;	1 μg/μl	4 μl
Precision Plus Protein Prestained Standard™ (Bio-Rad)	250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 20; 15; 10		5 μl

2.14 Rekombinante Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
<i>Cx57 KO</i>	ES-Zell-Austauschvektor zur Herstellung der <i>Cx57KO</i> -Mausmutante	Sonja Hombach, Diplomarbeit 2000
<i>pBluescript II SK(+)</i> (<i>pBSK</i>)	Klonierungsvektor	Stratagene
<i>pBSK-DTReGFP-NC10</i>	Kodierende Region des DTReGFP-Fusionsproteins ohne polyA in <i>pBSK</i>	unpubliziert; erhalten von Dr. Thorsten Buch, Uni Köln
<i>pBSK-frt-neo-frt</i>	PGK-Neomycin-Selektionskassette, flankiert von <i>frt</i> -Stellen in <i>pBSK</i>	Joachim Degen, Dissertation 2003
<i>pCre-Pac</i>	Eukaryotischer Expressionsvektor, der für die Cre-Rekombinase und die Puromycin-N-Acetyltransferase unter Kontrolle des PGK-Promotors kodiert	Taniguchi et al., 1998
<i>pJD-Cx36flox</i>	ES-Zell-Austauschvektor zur Herstellung der <i>Cx36flox(CFP)</i> -Mausmutante	Joachim Degen, Dissertation 2003
<i>pmCx36</i>	<i>pBSK</i> mit 9,8 kb des <i>Cx36</i> -Lokus aus dem Mausstamm 129Sv/Ola	Goran Söhl, Dissertation 1999
<i>pMJ-CFP</i>	Eukaryotischer Expressionsvektor mit CFP-Gen unter Kontrolle des CMV-Promotors, MCS, Ampicillin- und Puromycinresistenzgen	unpubliziert; erhalten von Dr. Tanja Auth, Uni Bonn
<i>pMJ-Cx57Go</i>	<i>pMJ</i> , kodiert für das <i>Cx57eGFP-Fusionsprotein</i>	Steffen Latt, Diplomarbeit 2004
<i>pMJ-Cx57Stop</i>	<i>pMJ</i> , kodiert für <i>Cx57</i>	Steffen Latt, Diplomarbeit 2004
<i>pMJ-Green</i>	Eukaryotischer Expressionsvektor mit kodierender Region des eGFPs unter Kontrolle des CMV-Promotors, MCS, Ampicillin- und Puromycinresistenzgen	Joachim Degen, Dissertation 2003
<i>pPGK-Cre bp A</i>	Eukaryotischer Expressionsvektor mit kodierender Region der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des PGK-Promotors, gefolgt von einem polyA-Signal	unpubliziert; erhalten von Dr. Kurt Fellenberg, Uni Köln
<i>ClaI-Subklon</i>	<i>Cx57</i> -Exon 2 mit 5'-gelegener Region in <i>pBSK</i>	Sonja Hombach, Dissertation 2004
<i>Cx57_retcdNA-Subklon</i>	retinale cDNS von <i>Cx57</i> in <i>pBSK</i>	Sonja Hombach, Dissertation 2004
<i>pGex-6T-Cx57-CL6xHis</i> bzw. <i>pGex-6T-Cx57-CT6xHis</i>	Bakterielle Expressionsvektoren zur induzierbaren Überexpression der zytoplasmatischen Schleife bzw. des C-Terminus von <i>Cx57</i>	Sonja Hombach, Dissertation 2004

2.15 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> -Stamm	Genotyp	Verwendung/Eigenschaft	Referenz
XL1-blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, Δ(mcr)A183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, supE44, relA1, lac[F'proAB lacI ^q ZΔM15, Tn10 (Tet ^r 12,5 μg/ml)].	Plasmidvermehrung	Bullock et al., 1987
BL21 (DE3)pLysS	F ⁻ ompThsdS _B (r _B m _B)galdcM(DE3)pLysS (Cam ^R)	Induzierbare Proteinexpression	Novagen
294-Flp	F ⁻ , λ, supE44, endA1, thi-1, hsdR17, lacZ:cI857-Flp	Expression der Flp-Rekombinase; Plasmidrekombination und -vermehrung	Buchholz et al., 1996

2.16 Zelllinien

Name	Eigenschaften	Referenz
HeLa-Wildtyp-Zellen	etablierte Zelllinie aus humanem Zervix-Karzinom; aneuploid, kopplungsdefizient.	Jones et al., 1971
HeLa-HrTam2-1-Zellen	HeLa-TetON-Linie mit chromosomalen Kopien eines tTA/rtTA-abhängigen Luziferase-Gens; konstitutive Expression des reversen Transaktivators rTA2-M2; HygromycinB-Resistenz	Urlinger et al., 2000
HTOCx57IRES-eGFP	HeLa-HrTam2-1-Zellen, transfiziert mit dem eukaryotischen Expressionsvektor pTetOCMV-Cx57-eGFP	Steffen Latt, Diplomarbeit 2004
N2A-Zellen	etablierte Zelllinie aus einem Neuroblastom der Maus	Olmsted et al., 1970
HM1 Embryonale Stammzellen	Embryonale Stammzellen der Maus, gewonnen aus dem Mausstamm Sv129P2/OlaHSD	Magin et al., 1992
Cx45flox(eGFP)-HM1-Zellen	HM1-Zellen, die nach homologer Rekombination in den Cx45-Lokus ein gefloxtes Cx45-Exon 3 gefolgt von einem eGFP-Reportergen aufweisen.	Stephan Maxeiner, Dissertation 2005

2.17 Mauslinien

Stamm	Kurzbeschreibung	Bezugsquelle und Referenz
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, vasktomierte Männchen zur Erzeugung von schein-schwangeren Leihmüttern	Charles River; eigene Zucht

Stamm	Kurzbeschreibung	Bezugsquelle und Referenz
deleter-Flp	Transgene Mauslinie, welche die Flp-Rekombinase ubiquitär unter Kontrolle des menschlichen β -Aktin Promotors exprimiert	Rodriguez et al., 2000
PGK-Cre	Transgene Mauslinie, welche die Cre-Rekombinase ubiquitär unter Kontrolle des PGK-Promotors exprimiert	Lallemand et al., 1998
Nestin-Cre	Transgene Mauslinie, welche die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Nestin-Promotors in allen neuronalen Vorläuferzellen exprimiert	Tronche et al., 1999
PV-Cre	Transgene Mauslinie, welche die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Parvalbumin Promotors in neuronalen Subtypen exprimiert	unpubliziert, erhalten von Hannah Monyer, Heidelberg
PrP-CreER ^T	Transgene Mauslinie, welche die Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des in Neuronen aktiven Prionprotein-Promotors exprimiert	Weber et al., 2001
Emx1-Cre	Transgene Mauslinie, welche die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des in Neuronen aktiven Emx1-Promotors exprimiert	Guo et al., 2000
CamKII α -Cre	Transgene Mauslinie, welche die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CamKII α -Promotors in neuronalen Subtypen exprimiert	Casanova et al., 2001

2.18 Kommerzielle Antikörper

Antikörper	Einsatz	Verdünnung	Referenz
anti-Cx36 aus Kaninchen (polyklonal) 46-3600	primär	1:100 (IF)	Zymed
anti-Cx36 aus Kaninchen (polyklonal) 51-6300	primär	1:500 (IB)	Zymed
anti-Glyzin aus Ratte (polyklonal)	primär	1:1000	Chemikon
Cx57-Mid aus Kaninchen (polyklonal)	primär	1:75 – 100 (IF + IB)	Zymed
Cx57-CT aus Kaninchen (polyklonal)	primär	1:100 (IF + IB)	Zymed
anti-Cx57 aus Hühnchen (monoklonal)	primär	1:200-500 (IF + IB)	Diatheva
anti-GFP aus Kaninchen (polyklonal)	primär	1:1000 (IF)	Molecular Probes
anti-GFP aus Kaninchen (polyklonal)	primär	1:100 (IB)	Living Colors
anti-GFP aus Maus (monoklonal)	primär	1:400 (IHC)	Abcam
anti- α -Tubulin aus Maus (monoklonal)	primär	1:10.000 (IB)	Sigma
Alexa594 Ziege anti-Kaninchen (polyklonal)	sekundär	1:2500	MoBiTec
Alexa488 Ziege anti-Kaninchen (polyklonal)	sekundär	1:2500	MoBiTec
Cy3 Ziege anti-Ratte (polyklonal)	sekundär	1:400	Dianova
FITC Ziege anti-Hühnchen	sekundär	1:1000	Sigma
Ziege anti-Kaninchen (polyklonal), HRP konjugiert	sekundär	1:20.000	Dianova
Ziege anti-Maus (polyklonal), HRP konjugiert	sekundär	1:20.000	Dianova

IF: Immunfluoreszenz-, IHC: Immunhistochemie-, IB: Immunoblot-Analyse.

3 METHODEN

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

3.1 Nukleinsäureanalytik

3.1.1 DNS-Präparation

3.1.1.1 Analytische Plasmid-Isolierung (Minipräparation) aus Bakterien

Dieses Verfahren eignet sich zur raschen alkalischen Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien (Birnboim und Doly, 1979), um rekombinante Klone beispielsweise durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen charakterisieren zu können. Je ein Bakterienklon wird in 2 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum angeimpft und üN bei 37 °C (294-Flp-E.colis (siehe unten): 30 °C) und 225 UpM in einem Thermoschüttler kultiviert. 1,5 ml dieser üN-Kultur werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und sedimentiert (13.000 UpM, 1 min). Nach sorgfältiger Entfernung des Überstandes wird das Sediment in 100 µl Lösung 1 auf dem Strudelmischer resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Der Chelatbildner EDTA in Alkali-Lösung 1 komplexiert dabei zweiwertige Ionen und bewirkt dadurch eine Destabilisierung der bakteriellen Zellwand. Durch die Zugabe von 200 µl SDS- und NaOH-haltiger Lösung 2 und mehrmaligem Invertieren wird die Bakterienzellwand aufgebrochen und die bakteriellen Proteine denaturiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 4 °C werden 150 µl Alkali-Lösung 3 hinzupipettiert, der Ansatz erneut invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Durch das Kaliumacetat, den Eisessig und die Kälte werden dabei die Proteine sowie die daran anheftende genomische Bakterien-DNS gefällt, während die Plasmid-DNS weiterhin in Lösung bleibt. Nach einem Zentrifugationsschritt befindet sich die Plasmid-DNS im Überstand. Sie wird in einem neuen Reaktionsgefäß durch die Vermischung mit 500 µl EtOH abs. gefällt, durch Zentrifugation (13.000 UpM, 5 min, 4 °C) sedimentiert und in 500 µl 70 % EtOH gewaschen (13.000 UpM, 5 min, RT). Nach der Trocknung des Pellets für 5 – 10 min wird die DNS in 100 µl TE aufgenommen. Eine Inkubation für 5 min bei 65 °C im Wasserbad fördert ein vollständiges Lösen der Plasmid-DNS und inaktiviert evtl. noch vorhandene DNAsen. Auf diese Weise werden pro 1,5 ml Bakterienkultur ca. 2 - 5 µg DNS gewonnen.

Bei der Präparation von Plasmiden speziell aus 294-Flp-E.colis fallen sämtliche Inkubationszeiten weg, um zu verhindern, dass die DNS durch im Zusammenhang mit 294-Flp-E.colis auftretenden DNAsen abgebaut wird. Die isolierten Plasmide werden direkt in

XL1-Blue-Bakterien retransformiert (10 µl pro Retransformation in 100 µl Bakterien-suspension), dort erneut vermehrt, wie gewohnt isoliert und analysiert.

3.1.1.2 Präparative Plasmid-Isolierung (Midipräparation) aus Bakterien

Größere Mengen Plasmid-DNS mit hohem Reinheitsgrad werden durch Ionenaustausch-Chromatographie gewonnen. Hierfür wird der Reagenziensatz Jetstar Plasmid Midi Kit 50 (Genomed) verwendet. Die Präparation erfolgt nach Angaben des Herstellers. Je nach Ausbeute (100 - 200 µg bei *high copy*-Plasmiden und einem Kulturvolumen von 50 ml) und in Abhängigkeit von ihrer weiteren Verwendung wird die Plasmid-DNS in 100 – 200 µl A. bidest oder TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und ist bei 4 °C bzw. -20 °C lagerbar.

3.1.1.3 Endotoxinfreie Plasmid-Isolierung (Maxipräparation) aus Bakterien

Zur Transfektion von embryonalen Stammzellen werden große Mengen (bis zu 500 µg) von Plasmiden mit höchstem Reinheitsgrad ohne Verunreinigungen durch bakterielle Proteine benötigt. Die Isolierung der Plasmide erfolgt daher mit dem EndoFree Plasmid Maxi.Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben und unter sterilen Bedingungen.

Nach Präzipitation wird die Plasmid-DNS in endotoxinfreiem TE-Puffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.1.1.4 Isolierung genomischer DNS aus embryonalen Stammzellen

Eine erste Identifizierung homolog rekombinierter HM1-Zellen erfolgt mithilfe der PCR (Kap. 3.1.8). Dazu wird die Zellsuspension (Kap. 3.3.7) in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt, die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (13.000 UpM, RT, 5 min) und in 40 µl Proteinase K-Mix durch Strudelmischen resuspendiert. Nach einer Inkubation von 60 min bei 65 °C und erneutem Strudelmischen wird das Lysat einer Heiß-Start-PCR (Kap. 3.1.8) unterzogen. Für eine DNS-Aufreinigung zur Durchführung einer Southern Blot-Analyse (Kap. 3.1.9) wird ein mit ES-Zellen konfluent bewachsener T25-Kolben zweimal mit PBS⁻ gewaschen und mit 1,5 ml ES-Lysis-Puffer 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Das Lysat wird in ein 13 ml-Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt und zwei Tage bei 55 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 1 Vol. Roti Phenol/Chloroform und kurzem Mischen wird der Ansatz zentrifugiert (6.000 UpM, 10 min, 4 °C) und die obere DNS-haltige Phase in ein neues Röhrchen überführt. Sie wird 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vermischt, erneut zentrifugiert (6.000 UpM, 10 min, 4 °C) und die obere Phase isoliert. Die DNS-Fällung erfolgt durch Zugabe von 2,5 Vol. EtOH abs. und Mischen, bis eine DNS-Flocke sichtbar wird, die mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen wird. Die DNS-Flocke wird durch Zugabe von 5 ml 70 % EtOH, kurzer Zentrifugation (6.000 UpM, 5 min, RT) und Abdekantieren des Überstandes zweimal gewaschen, bei RT getrocknet und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Zum vollständigen Lösen wird der Ansatz 1 h bei 55 °C im Wasserbad, dann 10 min bei 65 °C inkubiert und nach Bestimmung der DNS-Konzentration (Kap. 3.1.6)

zur Restriktionsspaltung und anschließender Southern Blot-Analyse eingesetzt. Eine Lagerung der genomischen DNS bei 4 °C ist möglich.

3.1.1.5 Isolierung genomischer DNS aus der Schwanzspitze und den Retinae von Mäusen

Für die Untersuchung von genomischen Loci mittels PCR - beispielsweise bei der Genotypisierung von Mäusen anhand von Schwanzspitzenbiopsien oder der Analyse der Retina nach zelltypspezifischer Cre-vermittelter Deletion (Kap. 1.10.1) - wird das Gewebe (eine 0,5 cm lange Schwanzspitzenbiopsie oder zwei Retinae einer durch zervikale Dislokation getöteten Maus) in 500 µl Schwanzspitzen-Lysis-Puffer (Laird et al., 1991) mit 2,5 µl Proteinase K-Lösung bei 55 °C üN lysiert. Haare und unlösliche Zellrückstände werden durch Zentrifugieren (13.000 UpM, 10 min, RT) abgetrennt und der Überstand in ein frisches 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, RT) wird der Überstand entfernt und die DNS anschließend durch Zugabe von 500 µl 70 % EtOH und Zentrifugation (13.000 UpM, 5 min, RT) gewaschen. Der Überstand wird sorgfältig entfernt, die DNS 5 min bei RT getrocknet, in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und üN bei 55°C in Lösung gebracht. Bis zur Analyse mittels PCR kann die DNS bei 4 °C gelagert werden.

3.1.1.6 Isolierung von genomischer DNS aus der Niere von Mäusen

Zur Gewinnung sauberer DNS aus Mausgewebe für Southern Blot-Analysen eignet sich die Niere. Den durch zervikale Dislokation getöteten Mäusen werden die Nieren entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gegebenenfalls bei -70°C gelagert. Jeweils eine Niere wird zu Pulver zermörsert und in 5 ml ES-Lysis-Puffer in phenolresistenten 50 ml-Röhrchen aufgenommen. Nach der Lysis bei 55 °C üN im Schüttelwasserbad werden 25 µl Proteinase K-Lösung zusätzlich hinzugefügt und die Ansätze üN bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis keine Gewebeklumpen mehr sichtbar sind. Ab der Zugabe von 1 Vol. Roti-Phenol/Chloroform entspricht das Protokoll Kap. 3.1.4. Die DNS wird in jeweils 200 µl TE aufgenommen.

3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Größenfraktionierung nativer DNS

Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf dem Verhalten von Nukleinsäuren im elektrischen Feld: Da sie im gelösten Zustand bei neutralem pH-Wert aufgrund ihrer sauren Phosphatgruppen negativ geladen sind, wandern sie zur Anode. Dabei wirkt die Gelmatrix, die die Nukleinsäuren zu durchwandern haben, als molekulares Sieb, das große Nukleinsäure-Moleküle stärker zurückhält als kleine. Die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Moleküle ist somit annäherungsweise umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer molekularen Masse. Auf diese Weise wird eine Größenfraktionierung erreicht. Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur analytischen und präparativen Auftrennung nativer, d.h.

doppelsträngiger DNS-Fragmente. Die Agarosekonzentration der Gelmatrix bestimmt den Größenbereich, in dem die höchste Auflösung erreicht wird (Tab. 3.1). Sie wird den zu erwartenden Fragmentgrößen angepasst.

Agarosekonz. in % (w/v):	2,0 %	1,5 %	0,7 %	0,5 %
Fragmentgröße in kb:	0,05 - 0,6	0,15 - 2	0,3 - 10	0,5 - 20

Tab. 3.1: Auflösungsvermögen von Agarosegelen bei verschiedenen Agarosekonzentrationen.

Der Nachweis der DNS-Fragmente erfolgt durch interkalierendes Ethidiumbromid, ein planarer, aromatischer Fluoreszenzfarbstoff, der bei Anregung durch UV-Licht im sichtbaren Spektrum fluoresziert. Anhand eines Größenstandards, parallel zu den Proben aufgetragen, ist eine Größenordnung der aufgetrennten DNS-Fragmente möglich.

Je nach Anzahl der Proben und der gewünschten Trennstrecke werden kleine (8 x 11,5 cm, 50 ml, 11 bis 22 Proben) oder große (12 x 14 cm, 100 ml, 20 bis 40 Proben) Gelträger verwendet. Der Ansatz aus der entsprechenden Menge Agarose (Gibco BRL) und 0,75 x TBE-Puffer wird in einem Erlenmeyerkolben im Mikrowellenofen zum Kochen gebracht, zum vollständigen Lösen der Agarose kurz geschwenkt und nochmals kurz aufgeköcht. Nach Abkühlen der A. bidest-korrigierten Agaroselösung auf ca. 50 °C (Handknöchelprobe) wird sie mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,6 µg/ml versetzt und in den durch Gewebeband abgeklebten Gelträger gegeben. Die Probenaschen werden mit einem bzw. zwei Kämmen ausgespart. Das erstarrte Gel wird mit dem Gelträger, von welchem zuvor die Gewebebänder entfernt wurden, in die mit 0,5 x TBE gefüllte Laufkammer plaziert. Die Proben, vermischt mit 1/5 Vol. 6 x DNS-Ladepuffer, werden ebenso wie ein geeigneter Größenstandard in die Taschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgt bei 7 - 9 V/cm. Zur Auswertung und Dokumentation wird das Gel mit einem UV-Transilluminator (Herolab E.A.S.Y Win32) fotografiert. Gegebenenfalls wird als Längenvergleich ein Fluoreszenzlineal angelegt.

3.1.3 RNS-Präparation aus Gehirnen und Retinae von Mäusen

Die Isolierung von Gesamt-RNS aus Mausgewebe erfolgt mithilfe des TRIzol®-Reagenz nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). TRIzol® ist eine homogene Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat. Guanidiniumisothiocyanat bewirkt eine Inhibition von RNasen, die bei Aufschluß von Zellen freigesetzt werden. Der Abbau von RNS durch exogene RNasen bei der Präparation ist ein Problem, dem durch ein sehr sauberes Arbeiten (Handschuhe, 70 % EtOH-gereinigte Arbeitsflächen und Geräte, einstündiges Autoklavieren von Lösungen, für RNS-Arbeiten reservierte Reagenzien) auf Eis begegnet wird. Wenn möglich werden alle Lösungen mit DEPC-H₂O angesetzt. DEPC ist ein Reagenz, das Proteine methyliert und somit RNasen inaktiviert.

Das Gehirn einer bzw. die Retinae von fünf durch zervikale Dislokation getöteten Mäuse werden möglichst rasch entnommen, durch kurzes Schwenken in sterilem PBS- von

Verunreinigungen befreit, sofort in einem 13 ml-Röhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und gegebenenfalls bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zu dem gefrorenen Gewebe werden 2,5 ml TRIzol[®] zugegeben und mit einem Polytron-Homogenisatorstab (Kinematica, Luzern, Schweiz) zerkleinert (30 sec, Stufe 5). Nach der Zugabe von 0,5 ml Chloroform, Schütteln und einer Inkubation von 5 min auf Eis erfolgt eine Phasentrennung durch Zentrifugation (12.000 UpM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min, Beckman mit JA-20-Rotor). Die obere RNS-haltige Phase wird in ein neues 13 ml-Röhrchen überführt, mit 1,25 ml Isopropanol vermischt und die präzipitierte RNS sedimentiert (12.000 UpM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min). Es folgt ein Waschschriff mit 5 ml 70 % EtOH (12.000 UpM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min), bevor die RNS an der Luft getrocknet, anschließend in 100 μl DEPC-H₂O aufgenommen und 10 min. bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelöst wird. Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung (Kap. 3.1.6) wird die RNS gegebenenfalls erneut gefällt (Kap. 3.1.5) und auf eine Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gebracht. Die so behandelte RNS ist bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagerbar.

3.1.4 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese zur RNS-Größenfraktionierung

Da Sekundärstrukturen in RNS-Molekülen deren elektrophoretische Beweglichkeit beeinflussen, werden die RNS-Proben in einer formamid- und formaldehydhaltigen Lösung denaturiert und in einem formaldehydhaltigen Agarosegel (1,2 %) aufgetrennt. Auch hier sollte auf sehr sauberes Arbeiten mit einstündig autoklavierten Lösungen geachtet werden, um einen Abbau der RNS durch RNasen zu vermeiden.

1,5 g Agarose (Gibco BRL) werden mit 109 ml RNS-A.bidest in einem Mikrowellenofen aufgeköcht und das Verlustvolumen mit RNS-A.bidest korrigiert. Unter dem Abzug werden 12,5 ml 10 x MOPS-Puffer und 3,125 ml Formaldehyd (35 %) hinzugegeben, der Ansatz gut vermischt und in einen abgeklebten Gelträger (12 cm x 14 cm) gegossen. Das erstarrte Agarosegel wird in eine mit 1 x MOPS-Puffer gefüllte Laufkammer platziert. Jeweils 4 μl RNS (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) werden mit 20,75 μl RNS-Denaturierungspuffer versetzt, 10 min bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Heizblock denaturiert und auf Eis abgekühlt. Mit dem RNS-Größenstandard (4 μl) wird auf gleiche Weise verfahren. Anschließend werden die Proben mit 2,25 μl 10 x RNS-Ladepuffer versetzt, in die Taschen des Agarosegels pipettiert und bei 100 V für etwa 3 bis 4 h aufgetrennt. Während dieser Zeit wird der Laufpuffer gelegentlich umgerührt, um ein Überhitzen zu vermeiden. Nach der Auftrennung wird das Gel mit einem UV-Transilluminator (Herolab E.A.S.Y Win32) fotografiert. Als Längenvergleich wird ein Fluoreszenzlineal angelegt.

3.1.5 Natriumacetat-Fällung von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren in Lösung umzupuffern oder einzuengen, werden sie gefällt. Dazu werden 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. EtOH abs. zu der zu fällenden Nukleinsäure-Lösung gegeben und mindestens 10 min bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach einem

Zentrifugationsschritt (13.000 UpM, 15 min, 4 °C) wird das DNS- bzw. RNS-Sediment mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die luftgetrocknete DNS bzw. RNS im gewünschten Volumen TE-Puffer oder A. bidest aufgenommen. Im Fall von RNS werden nur in DEPC-H₂O hergestellte Lösungen verwendet werden.

3.1.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren können anhand der Absorption von UV-Licht bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum der heterozyklischen Nukleotidbasen liegt bei 260 nm (A₂₆₀) und das der aromatischen Aminosäurereste bei 280nm (A₂₈₀).

Die Absorptionen von in TE verdünnten Nukleinsäurelösungen werden unter Verwendung von Quarzküvetten bei 260 nm und 280 nm gegen TE-Puffer als Referenz gemessen. Eine Absorptionseinheit entspricht bei einem Strahlengang von 1 cm Länge einer Konzentration von 50 µg/ml (DNS) bzw. 40 µg/ml (RNS). Bei der Berechnung der Konzentration muss der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden. Der Quotient A₂₆₀/A₂₈₀ gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der Lösung und sollte für DNS zwischen 1,8 und 2,0 bzw. für RNS zwischen 1,9 und 2,2 liegen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung durch Proteine und Phenol hin.

3.1.7 Reverse Transkription/RT-PCR

Bei der Reversen Transkription (RT) wird mRNA aus Gesamt-RNS (Kap. 3.1.3) mithilfe der Moloney-Maus-Leukämie-Virus-Reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben. 1 µl Gesamt-RNS (etwa 2-5 µg) werden mit 1 µl Oligo-dT₁₅-Startermolekülen (0,5 µg/µl, Promega) versetzt und mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird 10 min bei 70 °C denaturiert und zur Anlagerung der Startermoleküle 2 min auf Eis abgekühlt. 1 µl dNTP-Mix, 4 µl 5 x RTase-Puffer (First Strand Buffer, Promega), 2 µl 0,1 M DTT, und 1 µl RNasin[®] (40 U/µl, Promega) als RNase-Inhibitor werden hinzugefügt und der Ansatz 1 min bei 42 °C inkubiert, bevor die RT-Reaktion mit der Zugabe von 1 µl Superskript[™] Reverse Transcriptase II (200 U/µl, Invitrogen) gestartet wird. Nach 50 min Inkubation bei 42 °C wird die RT-Reaktion durch Denaturierung des Ansatzes (70 °C, 15 min) beendet. Die cDNS ist bei -70 °C lagerbar. Die Kombination der reversen Transkription mit einer spezifischen PCR (Kap. 3.1.8), die RT-PCR, erlaubt den Nachweis von geringen Transkriptmengen in einem Gewebe.

3.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) dient der selektiven enzymatischen *in vitro*-Vervielfältigung eines bestimmten DNS-Abschnittes (Mullis und

Falloona, 1987). Dabei binden zwei Oligonukleotid-Startermoleküle gegenläufig an die denaturierten komplementären DNS-Stränge, die das gewünschte Fragment flankieren und deren Sequenz bekannt ist. Ausgehend von den 3'-Enden dieser beiden Startermoleküle synthetisiert die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammende hitzestabile Taq-DNS-Polymerase (Promega) nach Vorgabe der DNS-Matrizen neue komplementäre DNS-Stränge, die nach erneuter Denaturierung selbst als Matrize fungieren. Viele hintereinander ablaufende Zyklen aus Denaturierung der DNS-Doppelstränge, Anlagerung der Startermoleküle und DNS-Synthese bewirken eine exponentielle Amplifikation der gewünschten Sequenz. Kontaminierende Fremd-DNS, die ebenfalls als Matrize dienen könnte, wird durch Mitführen einer Kontrollreaktion ohne Matrizen-DNS identifiziert. Die PCR-Amplikons werden mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 3.1.2) nachgewiesen. Oligonukleotid-Startermoleküle für eine PCR bestehen meist aus bis zu 30 bp und enthalten eine zu den Enden des entsprechenden DNS-Fragmentes komplementäre Sequenz. Dabei leitet sich ein Startermolekül vom Sinnstrang (USP, *upstream primer*), das andere vom Gegensinnstrang (DSP, *downstream primer*) ab. Das Verhältnis von G/C-Gehalt zu A/T-Gehalt in einem Startermolekül liegt idealerweise bei 1; die Schmelztemperatur eines PCR-Startermolekül-Paares, der T_m -Wert, sollte in etwa gleich sein und zwischen 60 bis 74°C liegen. Er ergibt sich für Startermoleküle von mehr als 14 Nukleotiden Länge aus folgender Gleichung:

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

Es ist darauf zu achten, dass sich am 3'-Ende eines PCR-Startermoleküls ein Nukleotid mit einer Cytosin- oder Guaninbase befindet. Die drei Wasserstoffbrückenbindungen, die diese Nukleotide zu ihrem komplementären Partner ausbilden, bewirken eine festere Bindung des DNS-Doppelstranges, wodurch die DNS-Polymerase einen geeigneten Synthesestart vorfindet.

Neben dem Einsatz bei Klonierungsschritten (Kap. 3.2.5) wird die PCR insbesondere zur Genotypisierung von Mausmutanten und als Bestandteil der RT-PCR mit cDNS (Kap. 3.1.7) zur Analyse des Transkriptoms von Geweben eingesetzt. Im Folgenden sind die in dieser Arbeit durchgeführten Genotypisierungs-PCRs und PCRs mit cDNS mit ihrem Verwendungszweck zusammengestellt. Mit Ausnahme der *ES-Cx36flox(CFP)*-PCR, bei der ein Komplett-PCR-Mix (ReadyMix REDTaq PCR Reaction Mix with MgCl_2 (Sigma) verwendet wird, kommt bei allen anderen PCRs die GoTaq[®]-DNS-Polymerase (Promega) zum Einsatz. Es wird eine 25 mM MgCl_2 -Lösung verwendet. Die Konzentration der eingesetzten Oligonukleotid-Startermoleküle beträgt 100 pmol/ μl , die Konzentration der dNTPs 10 pmol/ μl pro Desoxynukleotid. Da stets mehrere Proben in einer PCR analysiert werden, empfiehlt sich die Herstellung eines Gesamt-Ansatzes (*Master-Mix*), aus dem der PCR-Mix zu den DNS-Proben pipettiert wird. Zum Schutz vor Verdunstung werden die PCR-Ansätze mit 50 μl Mineral-Öl (Sigma) überschichtet.

ES-Cx36flox(CFP)-PCR

Die *ES-Cx36flox(CFP)*-PCR dient der Analyse der homologen Rekombination des Austauschvektors *pJD-Cx36flox* in isolierten ES-Zellklone. Im Heißstartverfahren wurde zunächst die im ES-Zelllysate (12,5 µl) vorhandene Proteinase K (Kap. 3.3.7) inaktiviert (95 °C, 15 min), bevor die PCR nach Zugabe des PCR-Mixes bei 80 °C gestartet wurde.

Ein Amplikon von 1,8 kb zeigt die 5'-homologe Integration von *pJD-Cx36flox* in den Cx36-Lokus an.

PCR-Mix (12,5 µl + 12,5 µl ES-Zelllysate)		PCR-Programm		
0,2 µl	dNTP	95 °C	15 min	1x
0,2 µl	<i>ES-36Prom2</i>	80 °C	∞	1x
0,2 µl	<i>ES-loxP_rev</i>	95 °C	30 sec	} 15 x
11,6 µl	ReadyMix™ REDTaq™ PCR Reaction Mix with MgCl ₂	64 °C	1 min	
0,3 µl	Taq-Polymerase (Promega)	72 °C	2 min	
		95 °C	30 sec	} 30 x
		64 °C	1 min	
		72 °C	2 min + 3 sec/Zyklus	
		72 °C	10 min	1 x
		25 °C	∞	1 x

KW-Maus-PCR

Mithilfe der Genotypisierungs-PCR *KW-Maus* werden die Cx36-Allele *Cx36WT* (311 bp-Amplikon), *Cx36flox(CFP)* (384 bp-Amplikon) und *Cx36CFP* (504 bp-Amplikon bei Verwendung des Oligonukleotid-Startermoleküls DSP-CFP-1 bzw. 276 bp-Amplikon bei Verwendung des Oligonukleotid-Startermoleküls DSP-CFP-2) im Genom der *Cx36flox(CFP)*-Mausmutante unterschieden. Des Weiteren dient die PCR zum Nachweis chimärer *Cx36-5'-UTR-CFP*-Transkripte (504 bp) in der RT-PCR-Analyse.

PCR-Mix (23 µl + 2 µl DNS oder cDNS)		PCR-Programm		
0,1 µl	dNTP	95 °C	5 min	1x
0,2 µl	<i>Cx36USP-1</i>	95 °C	45 sec	} 40 x
0,2 µl	<i>Cx36DSP-1</i>	56 °C	45 min	
0,2 µl	<i>DSP-CFP-1</i> oder <i>DSP-CFP-2</i>	72 °C	1 min	
1,5 µl	MgCl ₂	72 °C	10 min	1x
5,0 µl	5 x GoTaq-Puffer	4 °C	10 min	1 x
0,2 µl	GoTaq	25 °C	∞	1 x
15,6 µl	H ₂ O			

KW-neo-PCR

Die Genotypisierungs-PCR *KW-neo* weist bei Auftreten eines 509 bp Amplikons eine Deletion der geflirteten neo-Kassette im *Cx36flox(CFP)*-Lokus nach.

PCR-Mix (23 μ l + 2 μ l DNS)		PCR-Programm		
0,1 μ l	dNTP	95 °C	5 min	1x
0,2 μ l	<i>Cx36deltaneo</i>	95 °C	45 sec	} 40 x
0,2 μ l	<i>Cx36DSP-1</i>	56 °C	45 min	
1,5 μ l	MgCl ₂	72 °C	1 min	
5,0 μ l	5 x GoTaq-Puffer	72 °C	10 min	1x
0,2 μ l	GoTaq	4 °C	10 min	1 x
16,8 μ l	H ₂ O	25 °C	∞	1 x

JD-Maus-PCR

Mithilfe der Genotypisierungs-PCR *JD-Maus* werden die *Cx36*-Allele *Cx36WT* (326 bp-Amplikon), *Cx36flox(lacZ)* (554 bp-Amplikon) und *Cx36lacZ* (215 bp-Amplikon) im Genom der *Cx36flox(lacZ)*-Mausmutante unterschieden.

PCR-Mix (24 μ l + 1 μ l DNS)		PCR-Programm		
0,2 μ l	dNTP	95 °C	5 min	1x
0,2 μ l	<i>USP Intron_Cx36</i>	94 °C	1 min	} 40 x
0,2 μ l	<i>DSP branch_Cx36</i>	70 °C	2 min	
1,5 μ l	MgCl ₂	72 °C	10 min	1x
5,0 μ l	5 x GoTaq-Puffer	25 °C	∞	1 x
0,2 μ l	GoTaq			
16,7 μ l	H ₂ O			

Cre-JD-PCR

Die *Cre-JD-PCR* dient dem Nachweis des Cre-Rekombinase-Gens und des Flp-Rekombinase-Gens in transgenen Mäusen. Das Sinn-Oligonukleotid-Startermolekül *up-IntCre* hybridisiert wie das Gegensinn-Oligonukleotid-Startermolekül *IntCre_rev* in der kodierenden Region der Cre-Rekombinase und führt zu einem 420 bp-Amplikon. Mit den Sinn-Oligonukleotid-Startermolekülen *up-PGK-Cre* (500 bp-Amplikon), *up-Nestin-Cre* (600 bp-Amplikon) und *up-PrP-Cre* (500 bp-Amplikon), die im Promotorbereich des entsprechenden Cre-Transgens hybridisieren, lassen sich einige Cre-Rekombinase-Transgene genauer identifizieren.

Die Oligonukleotid-Startermoleküle *USP-Flp* (Sinn) und *DSP-Flp* (Gegensinn) hybridisieren innerhalb der kodierenden Region der Flp-Rekombinase und ergeben ein 1,2 kb-Amplikon.

PCR-Mix (24 μ l + 1 μ l DNS)		PCR-Programm		
0,2 μ l	dNTP	94 °C	5 min	1x
0,2 μ l	Sinn-Oligonukleotid-Startermolekül	94 °C	1 min	} 40 x
0,2 μ l	Gegensinn-Oligonukleotid-Startermolekül	60 °C	1 min	
2 μ l	MgCl ₂	72 °C	2 min	
5,0 μ l	5 x GoTaq-Puffer	72 °C	10 min	1x
0,2 μ l	GoTaq	25 °C	∞	1 x
16,2 μ l	H ₂ O			

GT-Cx57-PCR

Die Genotypisierungs-PCR *GT-Cx57* unterscheidet das *Cx57KO*-Allel (500 bp-Amplikon) von dem *Cx57*-Wildtyp-Allel.

PCR-Mix (24 µl + 1 µl DNS)		PCR-Programm		
0,5 µl	dNTP	94 °C	5 min	1x
0,1 µl	<i>GT-WT-UP1</i>	94 °C	45 sec	} 25 x
0,2 µl	<i>GT-PCR-DP</i>	63 °C	1 min	
0,1 µl	<i>lacZ UP</i>	72 °C	1 min	
1,5 µl	MgCl ₂	72 °C	7 min	
5,0 µl	5 x GoTaq-Puffer	25 °C	∞	1 x
0,2 µl	GoTaq			
16,4 µl	H ₂ O			

RT-Cx36-PCR

Die *RT-Cx36*-PCR mit cDNS ermöglicht den Nachweis der *Cx36*-mRNS-Expression (298 bp-Amplikon). Die Oligonukleotid-Startermoleküle *RT-PCR-365UTR* und *RT-PCR-36cod_rev* binden in *Cx36*-Exon 1 und 2, d.h. die PCR ist intronüberspannend.

PCR-Mix (24 µl + 1 µl cDNS)		PCR-Programm		
0,2 µl	dNTP	95 °C	5 min	1x
0,2 µl	<i>RT-PCR-365UTR</i>	94 °C	1 min	} 20 x
0,2 µl	<i>RT-PCR-36cod_rev</i>	65 °C - 0,5 °C/ Zyklus	1 min	
1,5 µl	MgCl ₂	72 °C	1 min	
5,0 µl	5 x GoTaq-Puffer	94 °C	1 min	} 25 x
0,2 µl	GoTaq	55 °C	1 min	
15,7 µl	H ₂ O	72 °C	1 min	
		72 °C	10 min	1 x
		25 °C	∞	1 x

Aktin-PCR

Die *Aktin*-PCR mit cDNS wird eingesetzt, um Aufschluss über eine Kontamination der cDNS durch genomische DNS zu erhalten. Dabei wird ein Bereich aus dem β -Aktin-Gen amplifiziert. Die beiden Oligonukleotid-Startermoleküle flankieren einen Bereich, der ein 87 bp großes Intron enthält. Ein 243 bp großes Amplikon resultiert aus der Amplifikation von cDNS, ein 330 bp großes Amplikon zeigt eine Kontamination durch genomische DNS an.

PCR-Mix (49 μ l + 1 μ l cDNS)		PCR-Programm		
2 μ l	dNTP	94 °C	3 min	1x
0,5 μ l	<i>Aktin USP</i>	94 °C	1 min	} 10 x
0,5 μ l	<i>Aktin DSP</i>	65 °C - 1 °C/ Zyklus	1 min	
3 μ l	MgCl ₂	72 °C	2 min	
10 μ l	5 x GoTaq-Puffer	94 °C	1 min	} 25 x
0,5 μ l	GoTaq	55 °C	1 min	
32,5 μ l	H ₂ O	72 °C	2 min	
		72 °C	7 min	1 x
		25 °C	∞	1 x

ES-DTRfrtCre-PCR

Mithilfe der *ES-DTRfrtCre-PCR* können mit dem Austauschvektor *pKW-DTRfrtCre* transfizierte HM1-Zellen auf die homologe Rekombination im 5'-Bereich des Cx57-Lokus analysiert werden. Zur Etablierung dieser PCR wird die genomische Situation mit dem PCR-Testvektor *pKW-DTRfrtCre PCR-Test* (Abb. 4.30) simuliert und die PCR in Anwesenheit von genomischer HM1-DNS durchgeführt. Sie ergibt ein 2,1 kb großes Amplikon.

PCR-Mix (24 μ l + 1 μ l DNS)		PCR-Programm		
0,2 μ l	dNTP	95 °C	5 min	1x
0,2 μ l	<i>Up-ES-DTR 4</i>	95 °C	45 sec	} 10 x
0,2 μ l	<i>Down-ES-DTR 4</i>	60 °C	45 sec	
1,5 μ l	MgCl ₂	72 °C	2 min	
5 μ l	5 x GoTaq-Puffer	72 °C	10 min	1 x
0,5 μ l	GoTaq	8 °C	10 min	1 x
15,4 μ l	H ₂ O	25 °C	∞	1 x

Cx57Touch-PCR

In der *Cx57Touch-PCR* mit cDNS aus Retina hybridisieren die Oligonukleotid-Startermoleküle intronüberspannend in Cx57-Exon 2 und Cx57-Exon 3 und führen bei Vorliegen des Cx57-Transkripts zu einem 398 bp großen Amplikon.

PCR-Mix (49 μ l + 1 μ l cDNS)		PCR-Programm		
0,5 μ l	dNTP	94 °C	2 min	1x
0,5 μ l		94 °C	1 min	} 10 x
0,5 μ l		65 °C - 1 °C/ Zyklus	1 min	
3 μ l	MgCl ₂	72 °C	2 min	
10 μ l	5 x GoTaq-Puffer	94 °C	1 min	} 30 x
0,5 μ l	GoTaq	55 °C	1 min	
35 μ l	H ₂ O	72 °C	2 min	
		72 °C	7 min	1 x
		16 °C	∞	1 x

3.1.9 Southern Blot- und Northern Blot-Analyse

Unter einem Southern Blot bzw. einem Northern Blot versteht man den Transfer von DNS- bzw. RNS-Molekülen aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran. Die DNS bzw. RNS ist damit immobilisiert und ermöglicht den Nachweis spezifischer Nukleinsäuremoleküle durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNS-Sonde. Geeignet ist dieses Verfahren für den Nachweis von Restriktionsfragmenten nach einer enzymatischen Spaltung genomischer DNS oder für den Nachweis von gesuchten mRNA-Transkripten in Gesamt-RNS, die aus Gewebe isoliert wurde.

3.1.9.1 Gewinnung von Membranen mit immobilisierten Restriktionsfragmenten genomischer DNS

Nach der Aufreinigung genomischer DNS (Kap. 3.1.1.6) werden 20 µg mit einem geeigneten konzentrierten Restriktionsenzym (40 bis 50 U/µl) üN gespalten und langsam (2-3 V/cm²) elektrophoretisch in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (Kap. 3.1.2). Nach der Dokumentation (Fluoreszenzlineal!) wird das Gel zur Depurinierung der DNS in Depurinierungslösung inkubiert (Wippe, RT, 10 min), kurz mit Wasser gespült und in Denaturierungslösung inkubiert (Wippe, RT, 30 min). Zum Aufbau des Kapillarblots wird eine Glasplatte quer über eine mit Denaturierungslösung gefüllte Melaminschale gelegt. Auf diese Glasplatte werden zwei mit Denaturierungslösung angefeuchtete 3MM-Papiere (20 cm x 20 cm) als Brücke gelegt, die an beiden Enden in den Puffer reichen. Auf das 3MM-Papier wird das Gel mit den Taschenöffnungen nach unten platziert, darauf eine zuvor in H₂O geschwenkte Hybond-N⁺-Nylonmembran (12 cm x 14 cm) und zwei in Puffer getränkte 3MM-Papiere gleicher Größe gelegt. Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten werden entfernt. Die freie Glasplatte und die Brücke werden mit Parafilm abgedeckt, so dass der Kapillarsog nur durch das Gel und die Membran stattfindet. Der Blot-Aufbau wird mit zwei 15 cm hohen Stapeln Handtuchpapier (Tork) abgeschlossen sowie mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgt üN. Beim Abbau des Blots wird die Orientierung und die Position der Geltaschen mit einem Bleistift auf der Nylonmembran markiert. Die Nylonmembran wird kurz in 2 x SSC gewaschen, um Gelreste zu entfernen und Salzkristallbildung zu vermeiden, 1 h bei RT luftgetrocknet und mit der DNS UV-vernetzt (UV Stratalinker 2400). Sie kann DNase-frei zwischen 3MM-papier gelagert werden. Die Vollständigkeit des DNS-Transfers wird durch Betrachten des Gels auf dem UV-Transilluminator überprüft.

3.1.9.2 Gewinnung von Membranen mit immobilisierter Gesamt-RNS

Die Immobilisierung von Gesamt-RNS auf einer Nylonmembran erfolgt analog zur Immobilisierung von DNS. Als 20 x SSC.

Nach Präparation der Gesamt-RNS aus Gewebe (Kap. 3.1.3) und Auftrennung mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.1.4) wird das Gel zweimal 15 min in 20 x

SSC inkubiert, das auch als Transferlösung dient. Die Nylonmembran wird kurz in RNS-H₂O, dann in 2 x SSC geschwenkt und der Kapillarblot aufgebaut. Beim Abbau des Blots wird die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen, bevor sie luftgetrocknet UV-vernetzt und gegebenenfalls zwischen 3MM-Papier gelagert wird.

3.1.9.3 Herstellung einer radioaktiv markierten DNS-Sonde

Bei der Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde wird der Reagenziensatz Multiprime-DNA labelling Kit (Amersham) verwendet. Dabei hybridisieren hexamere Startermoleküle zufälliger Sequenz mit der als Sondenmatrize einzusetzenden DNS und werden vom Klenow-Fragment der DNS-Polymerase in Anwesenheit von [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP verlängert. Die DNS-Matrize wird durch Restriktionsspaltung aus einem entsprechenden Plasmid ausgeschnitten (Kap. 3.2.1), über ein Agarosegel aufgereinigt (Kap. 3.2.2) und die Konzentration des Eluats auf einem Gel abgeschätzt (Kap. 3.1.6). 50 ng DNS werden mit A. bidest auf ein Volumen von 31 μl aufgefüllt und 5 μl hexamere Startermoleküle zugegeben. Der Ansatz wird 5 min gekocht, 5 min auf Eis abgekühlt und mit 10 μl Markierungspuffer versetzt, der nicht-radioaktives dATP, dGTP und dTTP enthält. Zusätzlich werden 2 μl [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) und 2 μl Klenow-Polymerase (1 U/ μl) zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Abtrennung freier Nukleotide und kurzer Oligonukleotide wird eine Sephadex G50 Säule verwendet. Bei der Herstellung der Säule wird eine 1 ml-Spritze mit autoklavierter, silikonisierter Glaswolle abgedichtet, in ein 13 ml-Röhrchen (Sarstedt) mit 1,5 ml-Schraubdeckelreaktionsgefäß gestellt und mit Sephadex G50 gefüllt. Die Säule wird durch Zentrifugation (1.000 UpM, RT, 5 min) verdichtet, der Durchfluß verworfen und ein neues 1,5 ml-Schraubdeckelreaktionsgefäß unter die Säule in das Röhrchen gestellt. Der die radioaktiv markierte Sonden-DNS enthaltende Ansatz wird mit 150 μl TE-Puffer verdünnt auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (1.000 UpM, RT, 5 min). 1 μl der Sonde wird entnommen und im Szintillationszähler vermessen. Eine Aktivität über 50.000 cpm zeigt eine erfolgreiche Markierung an.

3.1.9.5 Hybridisierung immobilisierter Nukleinsäuren mit einer radioaktiv markierten Sonde

Eine schnelle, sensitive und stringente Hybridisierung von auf einer Membran immobilisierten Nukleinsäuren erfolgt unter Verwendung von QuickHyb[®]-Lösung (Stratagene) bei 68 °C. Die getrocknete, UV-vernetzte Membran wird mit der Nukleinsäureseite nach innen in eine 100 ml-Hybridisierungsröhre (Amersham) überführt, mit A. bidest angefeuchtet und mit möglichst geringer Überlappung luftblasenfrei ausgerichtet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird in 10 ml QuickHyb[®]-Lösung ohne radioaktiv markierte Sonde im Rollofen inkubiert (68 °C, 30 min). Die Sonde wird durch fünfminütiges Aufkochen denaturiert, in 0,5 ml QuickHyb[®]-Lösung aufgenommen und zu der Membran in die 10 ml QuickHyb[®]-Lösung pipettiert. Die Hybridisierung erfolgt 1,5 bis 2 h

bei 68 °C im Rollofen. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonden-DNS wird die Membran in eine Kunststoffschale gelegt und bis zu einer Strahlungsintensität von etwa 100 cpm in 0,1 % SDS-haltiger SSC-Lösung gewaschen (Schüttelwasserbad, 65 °C, 10 min), wobei die SSC-Konzentration mit jedem Waschschrift abnimmt (2 x, 1 x, 0,5 x, 0,1 x) und somit die Waschbedingungen stringenter werden. Die Abnahme der Radioaktivität auf der Membran wird zwischen den Waschschriften mit einem Handmonitor (Berthold LB 1210 B) überprüft. Nach dem letzten Waschschrift wird die Membran in Haushaltsfolie eingeschweißt und in eine Röntgenfilmkassette mit Verstärkerfolie platziert. In der Dunkelkammer wird ein Röntgenfilm exponiert, die Filmkassette bei -70 °C gelagert und der Film nach mehreren Tagen in einer Entwicklermaschine (Agfa Curix 60) entwickelt. Die Größe der auftretenden Banden lässt sich über einen Vergleich mit dem linealnormierten Größenstandard auf dem Gelfoto bestimmen.

3.1.9.6 Regenerierung von radioaktiv markierten Membranen

Zur Regenerierung radioaktiv markierter Nylonmembranen, dem *Strippen*, wird genügend Stripping-Puffer in einem Topf zum Kochen gebracht, der Topf von der Herdplatte genommen und die Membran eine Stunde in der sich abkühlenden Lösung inkubiert.

Um den Erfolg des Strippons zu überprüfen, wird die Membran in Folie eingeschweißt, mit einem Handmonitor vermessen und einer Autoradiographie unterzogen. Die Membran sollte nicht mehr strahlen (< 20 cpm), und es sollten nach einer Expositionszeit von mehreren Tagen keine Signale mehr auf dem Film zu erkennen sein.

3.2 Herstellung rekombinanter Plasmide

3.2.1 Spaltung doppelsträngiger DNS mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II schneiden doppelsträngige DNS an kurzen, palindromischen Nukleotid-Abfolgen, wodurch ein ringförmiges DNS-Molekül linearisiert oder in definierte Fragmente zerlegt wird. Entsprechend den Herstellerangaben werden Restriktionsendonukleasen in den mitgelieferten Puffersystemen bei angegebener Temperatur eingesetzt. Gleichzeitige Spaltung einer DNS-Probe mit mehreren Enzymen ist nur bei kompatiblen Pufferanforderungen möglich, ansonsten muss die Probe vor Behandlung mit jedem neuen Enzym umgepuffert werden (Kap. 3.1.5). Analytische Spaltungen (50 – 200 ng DNS) werden in einem Endvolumen von 10 µl durchgeführt, präparative Spaltungen nach Bedarf skaliert, wobei die eingesetzte Enzymmenge 1/10 des Reaktionsvolumens nicht überschreiten darf. Die Inkubationszeit eines Spaltungsansatzes beträgt 1 bis mehrere h. Die Zugabe von 0,5 µl RNase2000 wirkt Verunreinigungen der DNS-Probe durch RNS entgegen.

3.2.2 Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen

Zur präparativen Aufreinigung von DNS-Fragmenten, z.B. nach einer Spaltung durch Restriktionsendonukleasen (Kap. 3.2.1), werden sie einer Größenfraktionierung durch gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.1.2) unterworfen und anschließend unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Es wird langwellige UV-Strahlung (302 nm) eingesetzt, da DNS im Bereich ihres Absorptionsmaximums (260 nm) geschädigt wird. Die Isolation des gewünschten DNS-Fragmentes aus dem Agarosegel erfolgt mithilfe des Reagenziensatzes QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Das Prinzip dabei beruht auf der hohen Affinität von DNS zu der Silikatmatrix einer Zentrifugationssäule.

3.2.3 Dephosphorylierung von Vektorenden

Weist der Vektor bei einer *in vitro*-Rekombination mit Passagier-DNS komplementäre überhängende Enden auf, muss verhindert werden, dass er bevorzugterweise rezirkularisiert, da sonst bei einer Transformation nicht-rekombinante Klone auftreten. Dies wird durch Dephosphorylierung der Vektorenden mit der alkalischen Krabben-Phosphatase (SAP, *shrimp alkaline phosphatase*, Amersham Biosciences) erreicht. Damit ist eine Verknüpfung des Vektors durch die T4-Ligase nur über die phosphorylierten 5'-Enden der Passagier-DNS möglich.

Die nach Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen über ein Gel aufgereinigte Vektor-DNS (Kap. 3.2.1 und 3.2.2) wird mit 1 µl, maximal jedoch 1/10 des Reaktionsvolumens, SAP versetzt; die optimalen Reaktionsbedingungen werden durch die Zugabe von 10 x SAP-Puffer hergestellt. Nach 30 min Inkubation des Ansatzes im Brutschrank bei 37°C wird, da die SAP sehr hitzelabil ist, erneut 1 µl Enzym hinzugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wird die SAP 20 min bei 75 °C im Wasserbad inaktiviert, um zusätzliche Dephosphorylierungen der Passagier-DNS im Ligationsansatz zu verhindern.

3.2.4 Ligation überhängender, kohäsiver Enden

Die T4-Ligase (Roche) verknüpft ATP-abhängig freie 5'-Phosphatgruppen mit freien 3'-Hydroxylgruppen von DNS-Molekülen durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen. Nach Dephosphorylierung der 5'-Enden des Vektors (Kap. 3.2.3) können daher T4-Ligase-vermittelt nur die 5'-Phosphatgruppen der Passagier-DNS mit den 3'-Hydroxylgruppen des linearisierten Vektors miteinander reagieren. Die jeweiligen Stellen, an denen Vektor- und Passagier-DNS noch nicht verknüpft sind, werden nach der Transformation durch Reparaturenzyme des Bakteriums geschlossen.

Vektor- und Passagier-DNS werden zur Ligation in einem molaren Verhältnis von 1 : 3 eingesetzt; wobei das Reaktionsvolumen zwecks häufiger Interaktionsereignisse zwischen den

Reaktionspartnern mit 10 bis 15 μl möglichst gering gehalten wird. Die DNS-Gesamtmenge sollte 100 ng nicht unterschreiten.

Der Ansatz aus Vektor- und Passagier-DNS, 10 x Ligasepuffer (Roche) und - je nach Gesamtvolumen - 1 bis 1,5 μl T4-Ligase (1 U/ μl) wird in bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Es ist darauf zu achten, dass der 10 x Ligasepuffer nur kurz aufgetaut wird, um einen Abbau des ATP zu vermeiden. Zur Optimierung der Ligationsreaktion werden am nächsten Tag nochmals 1 μl Enzym, 1 μl 10 x Ligasepuffer und 8 μl H₂O pro Ansatz zugegeben und einige Stunden bei RT inkubiert. Zur Kontrolle der Ligation wird eine Reaktion mit dephosphoryliertem Vektor und H₂O anstelle von Passagier-DNS durchgeführt.

3.2.5 Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Klonierung einer bestimmten DNS-Sequenz in einen Vektor wird der gewünschte DNS-Abschnitt zunächst mittels PCR (Kap. 3.1.8) vervielfältigt. Dabei bringen die PCR-Startermoleküle über ihr 5'-Ende für die Klonierungsstrategie günstige Restriktionschnittstellen in das PCR-Produkt mit ein. Das amplifizierte und dabei an seinen Enden modifizierte DNS-Fragment wird mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten (Kap. 3.3.1) und in den Zielvektor einligiert (Kap. 3.2.1 und 3.2.4).

3.2.6 Herstellung kurzer synthetischer DNS-Fragmente

Kurze zu ligierende DNS-Sequenzen bis 80 bp Länge können synthetisch hergestellt werden. Dazu werden die zwei zueinander komplementären DNS-Einzelstränge mit der gewünschten Sequenz und kohäsiven Enden kommerziell synthetisiert und über HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) aufgereinigt (MWG Biotech). Nach Aufnahme in Hybridisierungspuffer (finale Konzentration: 100 ng/ μl) werden jeweils 5 μg pro Einzelstrang zusammengegeben, 10 min im Heizblock bei 94 °C inkubiert und langsam auf RT abgekühlt. Die so entstandenen DNS-Doppelstränge werden als Passagier-DNS verwendet und nach der Ligation in den Zielvektor sequenziert, um Synthesefehler auszuschließen.

3.2.7 Herstellung transformationskompetenter Bakterien und Transformation

Unter Transformation versteht man in Bezug auf Bakterien die Aufnahme von Fremd-DNS zur Erlangung neuer Fähigkeiten. Experimentell wird dieser Vorgang dazu genutzt, Plasmid-DNS in größeren Mengen zu gewinnen oder bakterielle Proteinexpressionssysteme (Kap. 3.5.1) zu etablieren. Eine Retransformation liegt vor, wenn durch eine Midi-Präparation (Kap.3.1.1.2) bereits aufgereinigte Plasmid-DNS zur Transformation weiterer Bakterienkulturen dient.

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wird die Bakterienzellwand durch Behandlung mit CaCl₂ porös gemacht (Hanahan, 1983).

Der XL1-Blue-Bakterien werden auf einer Agarplatte üN bei 37 °C kultiviert. Mit einer Einzelkolonie werden 2,5 ml YT⁺⁺-Medium inokuliert und üN in einem Thermoschüttler (225 UpM) bei 37 °C inkubiert. Mit 50 µl dieser üN-Kultur werden 5 ml YT⁺⁺-Medium inokuliert und 1,5 Std. bei 37 °C geschüttelt (225 UpM). Diese gesamte Vorkultur wird zu 100 ml vorgewärmtem YT⁺⁺-Medium gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45 bis 0,55 bei 37 °C erneut im Thermoschüttler (225 UpM) inkubiert. Anschließend wird die Kultur auf zwei 50 ml Röhrchen (Falcon) verteilt, 5 min auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (3000 UpM, 4 °C, 5 min). Nach vollständiger Entfernung des Kulturmediums werden die sedimentierten Bakterien im 4 °C-Kühllabor in jeweils 10 ml TFB I resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut sedimentiert (3000 UpM, 4 °C, 5 min). Nach Verwerfen des Überstandes werden die Bakteriensedimente im Kühllabor in je 2 ml TFB II aufgenommen, die beiden Ansätze zusammengegeben und nach Aliquotierung von jeweils 100 µl Bakteriensuspension in einem 1,5 ml Schraubdeckelgefäß sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Auf diese Weise sind die kompetenten Bakterien mehrere Monate bei -70 °C lagerbar.

Zur Durchführung der Transformation werden pro Transformationsansatz 100 µl kompetente Bakterien 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend vorsichtig resuspendiert. Da die Zellwand kompetenter Bakterien sehr porös ist, sind die Bakterien äußerst empfindlich. Nach der Zugabe der Plasmid-DNS (10 bis 100 ng) und vorsichtigem Durchmischen erfolgt eine 30 minütige Inkubation der Transformationsansätze auf Eis. In dieser Zeit adsorbiert die DNS an die bakterielle Zellwand. Ein anschließender Hitzeschock der Bakterien für 90 sec bei 42 °C bewirkt die Aufnahme der DNS. Danach werden die Bakterien sofort 5 min auf Eis abgekühlt. Die Kultivierung der Bakterien beginnt zunächst in jeweils 900 µl LB-Medium ohne Antibiotikum für 30 bis 60 min bei 37 °C im Thermoschüttler (225 UpM). In dieser Zeit sollen sich die plasmidkodierte Resistenzeigenschaften der Bakterien ausbilden, welche eine Selektion transformierter Bakterien ermöglichen. Anschließend werden 100 µl einer Bakterienkultur auf einem Selektionsnährboden mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Der Rest der Bakterienkultur wird abzentrifugiert (13.000 UpM, RT, 30 sec) und der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen. Darin wird das Bakteriensediment resuspendiert und auf einem weiteren Selektionsnährboden ausplattiert. Mit dem Deckel nach unten werden die angeimpften und getrockneten Agarplatten üN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.8 Identifizierung rekombinanter Klone

Nur transformierte Bakterien, die das Plasmid mit kodiertem Resistenzgen aufgenommen haben, sind in der Lage, in Anwesenheit eines Selektionsantibiotikums, wie z.B. Ampicillin, zu wachsen. Dabei können neben rekombinanten Bakterien Bakterien existieren, welche rezirkularisierte Vektoren ohne die gewünschte einligierte Passagier-DNS aufgenommen haben. Zu einer Rezirkularisierung von Vektoren kommt es, wenn sie durch die SAP unzureichend dephosphoryliert wurden (Kap. 3.2.3). Der Anteil nicht-rekombinanter Klone wird mithilfe eines Selektionsnährbodens abgeschätzt, auf welchem mit dem

Kontrolligationsansatz (Kap. 3.2.4) transformierte Bakterien ausplattiert werden. Korrekt rekombinierte, nicht- und falsch rekombinierte (z.B. mehrfache Insertion der Passagier-DNS) Bakterienklone werden durch analytische Plasmid-Präparation (Kap. 3.1.1.1) und Restriktionsanalyse der gewonnenen DNS (Kap. 3.2.1) mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese (Kap.3.1.2) identifiziert.

3.2.9 Anlegen von Glycerinkulturen

Glycerinkulturen eignen sich für eine längerfristige Lagerung von Bakterien.

Dazu werden 500 µl einer bakteriellen üN-Kultur mit 1 Vol. sterilem 87 % Glycerin versetzt, gründlich gemischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien können so über 1-2 Jahre bei -70 °C gelagert werden. Häufiges Auftauen ist jedoch zu vermeiden. Zur Rekultivierung wird unter sterilen Bedingungen etwas gefrorenes Material von der jeweiligen Glycerinkultur abgekratzt, zur Vereinzelnung auf einem geeigneten Nährboden ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank üN inkubiert.

3.3 Kultivierung von adhärent wachsenden Säugerzelllinien

Alle Arbeiten zur Kultivierung adhärent wachsender Säugerzelllinien wurden in Sterilbänken mit Laminar-Luftstrom (BDK) nach den konventionellen Methoden der Zellkultur durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken (Heraeus) mit wassergesättigter Atmosphäre bei 37 °C. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Zelllinien HeLa, N2A und HM1 verwendet.

3.3.1 Kultivierung von HeLa- und N2A-Zellen

HeLa-Zellen stammen aus menschlichem Zervix-Karzinom und stellen wie die N2A-Zellen, hervorgegangen aus einem Neuroblastom der Maus, eine etablierte Zelllinie dar. Beide Zelllinien bilden keine Gap Junction-Kanäle aus und sind damit kopplungsdefizient. Transfiziert mit einem oder mehreren Connexin-Genen eignen sie sich daher zur Untersuchung der Eigenschaften von Gap Junction-Kanälen. Desweiteren werden HeLa- und N2A-Transfektanten verwendet, um Konstrukte auf ihre Expression hin zu analysieren und Aussagen über die Spezifität von Antikörpern treffen zu können.

HeLa- und N2A-Zellen werden in unbeschichteten Plastikschalen (Falcon) kultiviert. Je nach Größe der verwendeten Schalen variiert das Volumen des beigefügten Mediums. Als Kulturmedium für HeLa-Wildtyp-Zellen dient D10-Medium, während N2A-Zellen D10-AS-Medium erhalten. Der Wechsel der Kulturmedien erfolgt alle zwei bis drei Tage: Das Medium wird mit einer Glas-Pasteur-Pipette abgesaugt und die Zellen vor Erhalt des frischen Mediums zweimal mit PBS- gewaschen, um tote Zellen und Zelldebris zu entfernen. Ab einer Konfluenz von etwa 80 % ist ein entsprechendes Passagieren der HeLa- bzw. der N2A-Zellen

erforderlich. Dazu werden die gewaschenen Zellen durch eine fünfminütige Inkubation in Trypsin-Lösung bei 37 °C im Brutschrank vom Schalenboden gelöst. Klopfen gegen den Rand der Schale bewirkt eine Vereinzelnung der Zellen. Nach der Inaktivierung des Trypsins durch die Zugabe von Kulturmedium wird die Zellsuspension in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (800 UpM, 5 min, RT). Der trypsinhaltige Überstand wird entfernt und das Zellsediment in frischem Medium resuspendiert, so dass die Zellen in der gewünschten Verdünnung ausplattiert werden können. Soweit nicht anders vermerkt, sind PBS- und die Kulturmedien vor ihrer Verwendung auf 37 °C temperiert.

3.3.2 Einfrieren und Auftauen von HeLa- und N2A-Zellen

Zum Auftauen von in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen HeLa- und N2A-Zellen wird die Einfrierampulle 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und der Inhalt, sobald die Zellsuspension aufgetaut ist, zügig in ein 15 ml-Röhrchen überführt, in welchem ausreichend Medium vorgelegt ist. Nach einem Zentrifugationsschritt (800 UpM, RT, 10 min) werden die sedimentierten Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und in einer Kulturschalen geeigneter Größe ausplattiert. Das Einfrieren von HeLa- bzw. N2A-Kulturen geschieht, indem die Zellen einer Schale nach dem Trypsinieren in Kulturmedium aufgenommen und in ein 15 ml-Röhrchen überführt werden. Nach einem Zentrifugationsschritt (800 UpM, RT, 10 min) werden die sedimentierten Zellen in 900 µl Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Die Zellsuspension wird zu 100 µl DMSO pipettiert, welches in einer Einfrierampulle vorgelegt ist, und nach Verschließen der Ampulle kurz gemischt. Die Ampulle wird sofort auf Eis gestellt und anschließend in die Gasphase eines Flüssigstickstofftanks überführt. Nach einem Tag erfolgt die Überführung der Ampulle zur Langzeitlagerung in die flüssige Phase des Stickstoffs.

3.3.3 Kultivierung von HM1-Zellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Linie HM1 wurden aus agoutifarbenen, männlichen Blastozysten des Mausstammes Sv129P2/OlaHsd isoliert (Magin et al., 1992). Sie benötigen für ihre Kultivierung keine Fibroblasten (*feeder*-Zellen), sondern wachsen auf gelatinisierten Kulturschalen in Gegenwart des Leukämie-inhibierenden Faktors (LIF). LIF unterdrückt die Differenzierung der HM1-Zellen, die daher über mehrere Zellpassagen totipotent bleiben. Die Kultivierung der embryonalen Stammzellen erfolgt in ES-WT-Medium in Heraeus-Inkubatoren mit einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt. Das Medium wird außer bei geringer Zelldichte täglich gewechselt. Ist eine Konfluenz von etwa 90 bis 95 % erreicht, werden die ES-Zellen durch Trypsinierung und anschließender Ausplattierung mit einer Verdünnung von 1:3 passagiert. Bei einer Kulturgröße von 48-Loch- und 24-Loch-Kulturschalenvertiefungen werden die Zellen trypsinisiert und direkt passagiert; ab einer Kulturgröße von 6-Loch-Kulturschalenvertiefungen

werden sie nach dem Trypsinieren zunächst abzentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert. Um ES-Zellen zu trypsinieren, wird das alte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit ES-PBS⁻, einmal mit ES-Trypsin gewaschen und anschließend etwa 1/10 des Kulturvolumens ES-Trypsin zugegeben. Nach 5 min bei 37 °C im Brutschrank wird das Trypsin durch Zugabe von ES-WT-Medium inaktiviert, die Zellen gründlich vereinzelt und in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (800 UpM, RT, 5 min) wird das Zellsediment in ES-WT-Medium oder ES-Selektionsmedium aufgenommen und auf gelatinisierte Kulturschalen ausplattiert, in denen frisches ES-Medium vorgelegt ist. Die Gelatinisierung erfolgte zuvor durch eine Inkubation der Kulturschalen mit 0,1 %-iger Gelatine-Arbeitslösung für 10 min. Die Passagenzahl gibt Auskunft über den Kultivierungszeitraum der ES-Zellen und wird auf den Kulturgefäßen notiert.

3.3.4 Einfrieren und Auftauen von HM1-Zellen

Zum Einfrieren werden die HM1-Zellen eines konfluent bewachsenen T75-Kolbens nach dem Trypsinieren und Zentrifugieren in 1,5 ml ES-WT-Medium aufgenommen und resuspendiert. Je 500 µl dieser Suspension werden in eine beschriftete Einfrierampulle pipettiert und mit den vorgelegten 500 µl ES-Einfriermedium vermischt. Die Ampullen werden in mit Isopropanol (4 °C) gefüllten Einfrierbehältern bei -70 °C üN langsam eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Das Auftauen der HM1-Zellen erfolgt durch zügiges Überführen einer Ampulle aus der Flüssigstickstoffphase in ein 37 °C Wasserbad und anschließender Pipettierung der Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen, in dem 9 ml ES-WT-Medium vorgelegt wurden. Nach einem Zentrifugationsschritt (800 Upm, RT, 5 min) wird das Zellsediment in 5 ml ES-WT-Medium resuspendiert und auf einer gelatinisierten 6-Loch Schale rekultiviert.

3.3.5 Transiente Transfektion von HeLa-, N2A- und HM1-Zellen mittels Lipofektion

Bei der transienten Transfektion werden Kulturzellen hocheffizient mit eukaryotischen Expressionsvektoren transfiziert, die daraufhin kurzzeitig die von ihnen kodierten Gene ausprägen. Eine Selektion erfolgreich transfizierter Zellen findet nicht statt. Im Gegensatz zur stabilen Transfektion wird die transfizierte DNS daher nicht in das Genom der Zellen integriert, sondern innerhalb von einigen Tagen abgebaut. In dieser Zeit erfolgt die Analyse der transfizierten Zellen. Somit bietet die transiente Transfektion die Möglichkeit, die Expression von Genen rasch zu untersuchen, hat jedoch den Nachteil, dass keine stabile und homogen exprimierende Zelllinie entsteht, sondern gegebenenfalls erneut transient transfiziert werden muß. Bei der Methode der Lipofektion wird die DNS über elektrostatische Wechselwirkungen an der Oberfläche kationischer Lipidvesikel komplexiert und über einen bisher noch unverstandenen Mechanismus in die Zellen geschleust.

Die transiente Transfektion von HeLa- N2A- und HM1-Zellen erfolgt mithilfe des kommerziell erhältlichen Lipofectamine™ 2000 Reagenzes (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Dazu werden die Zellen auf 6 cm-Kulturschalen bzw. T25-Kolben bis zu einer Konfluenz von mindestens 50 % kultiviert und 1 h vor der Transfektion in OptiMem/Glutamax-ITM-Medium (HeLa und N2A) bzw. ES-WT-Medium (HM1) ohne Zusatz von Penicillin/Streptomycin-Lösung vorinkubiert. Die Inkubation der zu transfizierenden DNS bzw. des Lipofectamine™ 2000 Reagenzes erfolgt ebenfalls in OptiMem/Glutamax-ITM-Medium. 24 h nach der Transfektion wird das Kulturmedium gewechselt. HeLa- und N2A-Zellen erhalten D 10-Medium, HM1-Zellen frisches ES-WT-Medium ohne Penicillin/Streptomycin-Lösung. 24 bis 48 h nach der Transfektion können die transfizierten Zellen auf die Ausprägung des eingeschleusten Gens mittels Immunfluoreszenz- und Immunoblot-Analysen oder – falls es sich um ein fluoreszierendes Protein handelt – mithilfe der Laser Scan-Mikroskopie untersucht werden.

3.3.6 Stabile Transfektion von HM1-Zellen mittels Elektroporation

Bei der stabilen Transfektion selektioniert man im Gegensatz zur transienten Transfektion (Kap. 3.3.5) auf das Ereignis der Integration der transfizierten DNS in die genomische DNS der Ausgangszellen. Die stabile Transfektion von HM1-Zellen zur Herstellung einer genetisch veränderten Maus erfolgt mittels Elektroporation von linearisiertem Plasmid. Dazu werden 350 µg des mithilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) aufgereinigten Austauschvektors eingesetzt (Kap. 3.1.1.3), der durch eine Restriktionsspaltung linearisiert, gefällt, zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und in 100 µl endotoxinfreien TE-Puffer aufgenommen wird. HM1-Zellen mit möglichst niedriger Passagenzahl werden bis zur Konfluenz eines T75-Kolbens kultiviert, trypsiniert und die Zellkonzentration der Einzelzellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen in HBS-Puffer aufgenommen, so dass in 800 µl 3×10^7 Zellen enthalten sind. Die 800 µl Zellsuspension werden mit dem linearisierten Austauschvektor in 100 µl TE-Puffer vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation erfolgt durch einen Stromimpuls von 0,8 Kilovolt mit einer Kapazität von 3 Mikrofarad (Biorad-Gene Pulser). Nach einer Inkubation von 10 min bei RT werden die Zellen vorsichtig in 10 ml ES-WT-Medium resuspendiert und in unterschiedlicher Verdünnung (0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml) auf mehreren 10 cm-Schalen mit 10 ml ES-WT-Medium ausplattiert.

3.3.7 Selektion von HM1-Zellen auf stabile Integration und homologe Rekombination

24 h nach der Elektroporation wird auf die Anwesenheit des in dem Austauschvektor enthaltenen Selektionsmarkergens Neomycin selektioniert, indem das ES-WT-Medium gegen G418-haltiges ES-Selektionsmedium ausgetauscht wird. Während der größte Teil der Zellen

stirbt, wachsen die stabil transfizierte Zellen zu einzelnen Klonen heran, die nach etwa 10 Tagen Selektion groß genug sind, um isoliert zu werden. Dazu werden die Klone jeweils mithilfe einer Kolbenhubpipette und gelben Spitzen unter dem Mikroskop von der Kulturschale abgeschabt, in 100 µl Kulturmedium aufgesaugt und in eine Vertiefung einer gelatinisierten 48-Loch-Kulturschale transferiert. Der Zellklumpen wird durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Abschließend erfolgt die Zugabe von ES-WT-Medium, das alle zwei bis drei Tage gewechselt wird, bis der Zellklon eine ausreichende Konfluenz zum Passagieren besitzt. Bei der ersten Passage von einer 48-Loch- auf eine 24-Loch-Kulturschalenvertiefung wird die Hälfte der Zellsuspension abgenommen, ein Zellysate hergestellt (Kap. 3.1.1.4) und die DNS mithilfe der ES-Zell-PCR (Kap. 3.1.8) auf das Ereignis der homologen Rekombination analysiert. PCR-positive Zellklone werden schrittweise über eine 12-Loch- und eine 6-Loch-Kulturschale bis hin zu zwei konfluent bewachsenen T25-Kolben expandiert. Die Zellen des einen Kolbens werden zur gegebenenfalls später erfolgenden Blastozysten-Injektion (Kap. 3.3.9) eingefroren (Kap. 3.3.4), die Zellen des anderen Kolbens auf zwei T25-Kolben weiterkultiviert. Ein Kolben wird zur genomischen DNS-Gewinnung aus embryonalen Stammzellen (Kap. 3.1.1.4) und anschließender Southern-Blot-Analyse (Kap. 3.1.9) eingesetzt, der andere Kolben wird für die Karyotypanalyse (Kap. 3.3.8) verwendet.

3.3.8 Karyotyp-Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone

Mithilfe der Karyotyp-Analyse werden die potentiell für die Blastozysten-Injektion einzusetzenden Maus-ES-Zellklone auf ihren normalen Karyotyp von 40 akrozentrischen Chromosomen untersucht. Dazu werden die Zellen eines konfluenten T25-Kolbens 50 min bei 37 °C im Brutschrank mit 0,1 µg/ml Demecolcine (2 ml ES-WT-Medium + 40 µl Demecolcine) inkubiert, so dass es zu einer Arretierung der Mitose in der Metaphase kommt. Die Zellen werden gewaschen, trypsiniert und das Zellsediment nach der Zentrifugation (800 UpM, RT, 5 min) durch Klopfen in 1 ml isotonischer KCl-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 3 ml isotonischer KCl-Lösung und vorsichtigem Mischen sind die Zellen nach 10 min bei RT osmotisch angeschwollen. Anschließend werden die Zellen wieder zentrifugiert (700 UpM, RT, 5 min) und das Sediment durch tropfenweise Zugabe von eiskaltem, frisch angesetztem Methanol:Eisessig (3:1)-Gemisch durch Klopfen resuspendiert. Die Inkubation von 5 min bei RT bewirkt eine erste Fixierung der Zellen, die durch zwei weitere Zentrifugations- (1.200 UpM, RT, 5 min) und Inkubationsschritte in Methanol:Eisessig intensiviert wird. Schließlich wird das Zellsediment in 1 ml Methanol:Eisessig-Gemisch aufgenommen und mit einer Pasteurpipette aus 50 - 60 cm Höhe auf saubere Objektträger aufgetropft, so dass die Zellen aufplatzen. Die Chromosomen werden 1 min in Giemsa-Färbelösung inkubiert und die Färbung durch zweimaliges Waschen mit Leitungswasser differenziert. Die luftgetrockneten Objektträger werden in Entellan

(Merck) eingedeckelt. Mindestens 20 auswertbare Chromosomen-Anhäufungen einzelner Zellen werden pro ES-Zellklon an einem Zeiss-Axiophot mit Phasenkontrastoptik ausgezählt.

3.3.9 Vorbereitung der ES-Zellen für die Blastozysteninjektion

Es werden die homolog rekombinierten HM1-Zellklone für die Blastozysteninjektion ausgewählt, die einen normalen Karyotyp, eine möglichst geringe Passagenzahl und ein undifferenziertes Erscheinungsbild aufweisen. Geeignete Zellklone werden aufgetaut (Kap. 3.3.4), zwei Tage vor der Blastozysteninjektion passagiert und am Tag selbst zweimal in PBS⁻ gewaschen, trypsiniert und gründlich vereinzelt. Nach der Zentrifugation (800 UpM, 5 min, RT) wird das Zellsediment in ES-WT-Medium resuspendiert und bis zur Blastozysteninjektion auf Eis gelagert.

3.4 Blastozysteninjektion, Uterustransfer und Test auf Keimbahngängigkeit

Die Erzeugung transgener Mäuse aus embryonalen Stammzellen mittels Blastozysteninjektion wird von Nagy A. et al. (2003) beschrieben. Die homologe Rekombination findet in HM1-ES-Zellen aus agoutifarbenen Mäusen statt, so dass zur Unterscheidung C57BL/6 Blastozystenspendertiere mit schwarzer Fellfarbe und albinofarbene NMRI-Empfängertiere verwendet werden. Die mit manipulierten HM1-Zellen injizierten Blastozysten werden operativ in den Uterus von scheinsschwangeren NMRI-Weibchen implantiert, die die chimären Embryonen austragen und die resultierenden Jungtiere großziehen. Die Isolierung der Blastozysten, die Injektion der manipulierten HM1-Zellen und der operative Uterustransfer wurden von der technischen Assistentin Ina Fiedler durchgeführt.

3.1.4 Zucht- und Haltungsbedingungen von Versuchsmäusen

Die Mäuse werden in nichtisolierten Tierställen bei einem über das Jahr konstanten Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 / 12 Stunden mit unbeschränktem Zugang zu Futter und Wasser bei einer konstanten Raumtemperatur von 23 °C gehalten. Die Tiere werden zweimal wöchentlich in saubere Käfige umgesetzt. Generell werden männliche und weibliche Tiere getrennt gehalten. Für Verpaarungen werden ein bis zwei Weibchen in den Käfig eines einzelnen Männchens gesetzt. Würfe werden vier Wochen nach der Geburt nach Geschlecht getrennt, mit einer Ohrmarkennummer gekennzeichnet und eine Schwanzbiopsie (0,5 cm) zur Genotypisierung (Kap. 3.1.1.5 und 3.1.8) vorgenommen. Weitere Angaben bezüglich der Zucht und Haltung von transgenen Mäusen sind bei Nagy A. et al. (2003) nachzulesen.

3.4.2 Gewinnung von Blastozysten

Für die Gewinnung von Blastozysten zur Blastozysteninjektion werden vier C57BL/6-Männchen mit je zwei hormonstimulierten C57BL/6-Weibchen verpaart. Für diese Hormonstimulation (Superovulation) wird den acht Weibchen im Alter von vier Wochen etwa zur Mitte des Lichtzyklus (12:00 Uhr) 100 µl FSH-Lösung (5 U) intraperitoneal injiziert. Etwa 47 Stunden später wird der Eisprung durch eine intraperitoneale Injektion von 100 µl hCG-Lösung (5 U) synchron ausgelöst. Anschließend werden die so behandelten Weibchen für eine Verpaarung eingesetzt. Für die genaue Bestimmung des embryonalen Entwicklungsstadiums wird von einer Kopulation zur Mitte der Dunkelphase ausgegangen. Die Verpaarungen werden kurz vor Beginn der Dunkelphase angesetzt. Erfolgreiche Verpaarungen (auch zur Ermittlung der Scheinschwangerschaft, siehe unten) werden zu Beginn der nächsten Lichtphase anhand eines als Vaginalpfropf in der Vagina des Weibchens verbliebenen Ejakulats erkannt. Die Mitte der Lichtphase nach der Kopulation wird als 0,5 dpc (*dies post coitum*) definiert. Weibliche Tiere mit Vaginalpfropf werden bis zur Blastozystenisolierung am Tag 3,5 dpc gesondert gehalten. Ein superovuliertes C57BL/6-Weibchen produziert bis zu 20 Blastozysten.

3.4.3 Scheinschwangere Empfängertiere

Scheinschwangere Mausweibchen werden als Empfängertiere der injizierten Blastozysten benötigt und durch Verpaarung mit sterilisierten Männchen gewonnen. Durch den Kopulationsakt werden die Weibchen empfänglich für die Einnistung von Embryonen in den Uterus, was schließlich dazu führt, dass die Schwangerschaft ausgelöst wird. Operativ implantierte Blastozysten können sich im Uterus von scheinschwangeren Mäusen einnisten, ohne dass die eigenen unbefruchteten Eier des Weibchens einen Einfluß auf die Schwangerschaft haben. Die Verpaarungen zur Erzeugung scheinschwangerer NMRI-Weibchen werden zeitlich so geplant, dass sich die Weibchen beim Retransfer der injizierten Blastozysten an Tag 2,5 dpc ihrer Scheinschwangerschaft befinden.

3.4.4 Test auf Keimbahntransmission

Je nach Beteiligung der ES-Zellen an der Entwicklung des manipulierten Embryos resultieren mosaikfarbene chimäre Mäuse. Das Verhältnis von agoutifarbenem zu schwarzem Fell ergibt eine Auskunft über den Chimärismusgrad einer Maus. Chimären mit einem Agoutianteil von > 70 % werden mit C57BL/6-Mäusen verpaart, um bei Keimbahngängigkeit der manipulierten ES-Zellen agoutifarbenen Nachkommen das zu erhalten. Die Hälfte dieser Nachkommen trägt den durch homologe Rekombination veränderten Genlocus. Mit diesen Mäusen können durch gezielte Verpaarungen transgene Mauslinien etabliert werden.

3.5 Proteinanalytik

Proteine sind empfindliche Makromoleküle, die leicht durch Proteinasen abgebaut werden können. Bei der Arbeit mit Proteinen ist daher darauf zu achten, dass sie sich immer auf Eis bzw. bei 4 °C in gekühlter Umgebung befinden, um sie vor Degradation zu schützen. Die Versuche sollten möglichst rasch und in Gegenwart von Proteinase-Hemmern durchgeführt werden, um den Verlust von Protein durch Abbau zu minimieren.

3.5.1 Präparation der bakteriellen Fusionsproteine *GST-Cx57CL-6xHis* und *GST-Cx57CT-6xHis*

Mithilfe der bakteriellen Fusionsproteine *GST-Cx57CL-6xHis* und *GST-Cx57CT-6xHis* kann die Aktivität gegen Cx57-gerichteter Antikörper überprüft werden. Sie bestehen aus der zytoplasmatischen Schleife bzw. dem C-Terminus von Cx57 sowie einer N-terminal fusionierten GST-Domäne und einer C-terminal fusionierten Hexahistidin-Sequenz. Zur Gewinnung dieser Fusionsproteine werden BI21-*E.coli*-Bakterien, transformiert mit den bakteriellen Expressionsvektoren *pGex-6T-Cx57-CL6xHis* bzw. *pGex-6T-Cx57-CT6xHis*, verwendet (Sonja Hombach, Dissertation 2004). Diese Expressionsvektoren kodieren für die Fusionsproteine *GST-Cx57CL-6xHis* bzw. *GST-Cx57CT-6xHis* und ermöglichen deren induzierte Überexpression durch Kultivierung der transformierten Bakterien in Anwesenheit von Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG). Dabei bindet IPTG an den bakteriellen lac-Repressor, der die Expression der Fusionsproteine verhindert, und bewirkt durch Konformationsänderungen ein Ablösen des lac-Repressors von der Operator/Promotor-Sequenz der Expressionsvektoren. IPTG induziert somit die Überexpression der Fusionsproteine *GST-Cx57CL-6xHis* bzw. *GST-Cx57CT-6xHis* in den transformierten BI21-*E.coli*-Bakterien. Sie werden anschließend lysiert und in einer Immunoblot-Analyse zum Testen von Cx57-Antikörpern verwendet.

Von jeweils einer Glycerinkultur der entsprechenden BI21-*E.coli*-Bakterienstämme wird eine 2 ml-Kultur in ampizillinhaltigem LB-Medium angeimpft (250 UpM, 37 °C, üN). 1 ml dieser Kultur wird in 20 ml ampizillinhaltigem LB-Medium inokuliert und bis zum Erreichen der exponentiellen Phase bei einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert (250 UpM, 37 °C). 1 ml der Kultur werden als Nullwert für die spätere Analysen entnommen, bevor IPTG in einer finalen Konzentration von 1 mM appliziert wird. Nach 4 h wird eine weitere 1 ml-Proben entnommen und zusammen mit der Nullprobe als Lysat aufbereitet. Dazu werden die Proben zentrifugiert (13.000 UpM, RT, 1 min), der Überstand verworfen und die Sedimente in 1 x Laemmli-Puffer resuspendiert (Nullprobe: 100 μ l; 4 h-Probe: 200 μ l). Zur DNS-Fragmentierung werden die Laemmli-Lysate 1 min in einem gekühlten Ultraschallbad behandelt, 10 min bei 65 °C im Heizblock denaturiert und nach einer SDS-PAGE im anschließenden Immunoblot eingesetzt. Bereits bei einer Coomassie-Färbung des Proteingels wird bei der jeweiligen 4 h-Probe eine

Bande auf einer Höhe von 33 kD für das *GST-Cx57CL-6xHis*-Protein bzw. auf einer Höhe von 55 kD für das *GST-Cx57CT-6xHis*-Protein deutlich.

3.5.2 Herstellung von HeLa-Zelllysaten

Die Zellen werden bis zu einer Konfluenz von 85 bis 95 % kultiviert. Nach zwei Waschschrritten mit PBS⁻ (RT) wird die Kultur in RIPA-Lysispuffer lysiert. Das eingesetzte Volumen des Puffers beträgt bei 10 cm-Kulturschalen 100 µl und wird bei anderen Schalengrößen entsprechend skaliert. Der Zusatz von 1 x Complete™ (Roche), einem Gemisch verschiedenster Proteinasen-Hemmer, direkt vor Gebrauch unterbindet eine Degradation der Proteine. Mithilfe eines Gummischabers wird das Lysat in ein Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt und 30 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit wird es alle 5 min für 30 sec im Ultraschallbad homogenisiert und daraufhin auf einem Strudelmischer gemischt. Anschließend wird das Lysat zentrifugiert (13.000 UpM, 4 °C, 30 min) und der Überstand einer Bestimmung der Proteinkonzentration unterzogen. Er ist bei –70°C lagerbar.

3.5.3 Herstellung von Retinalysaten

Die Retinae einer oder mehrerer durch zervikale Dislokation getöteten Mäuse werden in PBS⁻ aus den entnommenen Augen präpariert, in ein Schraubdeckelgefäß überführt und kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend werden die Retinae in 100 µl RIPA-Lysispuffer, dem vor Gebrauch 1 x Complete™ zugesetzt wurde, aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit werden sie alle 5 min für 30 sec im Ultraschallbad homogenisiert und auf einem Strudelmischer gemischt. Anschließend werden die unlöslichen Bestandteile des Lysats abzentrifugiert (13.000 UpM, 4 °C, 30 min) und mit dem Überstand weitergearbeitet (Kap. 3.5.5 und 3.5.8). Zuvor werden 2 µl für die Bestimmung der Proteinkonzentration (Kap. 3.5.4) abgenommen. Das Retinalysat ist bei –70°C lagerbar.

3.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinlysaten

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

3.5.5 Cx36- und Cx57-Immunpräzipitation von Retinalysaten

Die Immunpräzipitation dient der Fällung eines bestimmten Proteins unter nicht-denaturierenden Bedingungen aus einem Proteingemisch mithilfe von Antikörpern. Dadurch wird eine Anreicherung dieses Proteins erreicht, das daraufhin weiter analysiert werden kann, beispielsweise durch einen Immunoblot oder mithilfe der MudPIT-Technik (Kap. 3.5.6).

Zur Durchführung der Cx36-Immunpräzipitation aus Retinalysaten wird Protein A-Sepharose (Amersham Biosciences) verwendet. Protein A bindet wie Protein G (siehe unten) die Fc-Region von Antikörpern und ist selbst kovalent an eine Sepharose-Matrix gebunden. Die auf diese Weise immobilisierten Antikörper ermöglichen die Isolierung spezifischer Proteine aus einem Proteinlysate in Form von Antikörper-Antigen-Komplexen.

Der Überstand des Lysates zweier Retinae (Kap. 3.5.3) wird mit 50 µl Sepharose (überschichtet mit TBS, Amersham Biosciences) versetzt und 30 min bei 4 °C drehend vorinkubiert. Dabei werden durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (6000 UpM, 4 °C, 2 min) Proteine des Lysates sedimentiert, die unspezifisch an Sepharose binden. Eine Vorinkubation mit Protein A-Sepharose ist konsequenter, wird jedoch aus Kostengründen nicht durchgeführt. Der Überstand wird zu einem 30 min lang inkubierten Gemisch aus 20 µl Protein A-Sepharose (überschichtet mit TBS, Amersham Biosciences) und 2 µl Cx36-Antikörper-Lösung (anti-Cx36 Zymed 51-6300) pipettiert. Die Inkubation erfolgt drehend bei 4 °C für 3 h bis 4 h oder üN. Die gebildeten Komplexe aus Antigen, Antikörper und Protein A-Sepharose werden in einem Zentrifugationsschritt sedimentiert (6000 UpM, 4 °C, 2 min) und zweimal mit je 500 µl RIPA-Waschpuffer und einmal mit A.bidest gewaschen. Zwischen den Waschschritten wird erneut zentrifugiert (6000 UpM, 4 °C, 2 min). Für die SDS-PAGE (Kap. 3.5.7) wird das möglichst trockene, sedimentierte Cx36-Immunpräzipitat mit 15 µl 1 x Lämmli-Puffer versetzt, auf einem Strudelmischer gemischt und 5 Minuten bei 65°C im Wasserbad erhitzt. SDS und Hitze bewirken die Auflösung der Antigen-Antikörper-Bindungen, sowie der Bindungen der Antikörper zu Protein A. Der Ansatz wird zur Sedimentation der Protein A-Sepharose zentrifugiert (13000 UpM, 4 °C, 2 min) und der Überstand einer SDS-PAGE (Kap. 3.5.7) mit anschließender Immunoblot-Analyse (Kap. 3.5.8) unterzogen.

Für die Immunpräzipitation von Cx57 aus Retinalysat werden die präzipitierenden Cx57-Antikörper irreversibel an Protein G-Sepharose gekoppelt, um die Analyse des Präzipitats nicht zu stören. Dazu werden 60 µl Protein G-Sepharose (Gerbu Biochemicals) dreimal mit 300 µl Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,0) gewaschen und sedimentiert (1000 UpM, RT, 2,5 min). Nach dem letzten Waschschriff wird die Protein G-Sepharose in 500 µl Phosphatpuffer aufgenommen, 2,0 µg Cx57-Antikörper (*Cx57-Mid* bzw. *Cx57-CT*, Kap. 4.3) hinzugegeben und 1 h drehend bei 4 °C inkubiert. Die Antikörper-Protein G-Sepharose-Komplexe werden sedimentiert (jeweils 1000 UpM, RT, 2,5 min), zweimal mit 300 µl 0,2 M Triethanolamin (pH 8,2) gewaschen und erneut sedimentiert. Die irreversible Kopplung der Antikörper an Protein G erfolgt durch Inkubation des Sediments in 500 µl Kopplungspuffer

für 1 h bei RT. Anschließend wird der Ansatz zentrifugiert (1000 UpM, RT, 2,5 min), einmal mit 300 µl Triethanolamin, dreimal mit 300 µl RIPA-Lysispuffer gewaschen und sedimentiert (1000 UpM, RT, 2,5 min). Der Überstand des Lysates aus sechs Retinae (Kap. 3.5.3) wird zu den sedimentierten Antikörper-Protein G-Sepharose-Komplexen gegeben, der Ansatz mit 500 µl RIPA-Lysispuffer aufgefüllt und drehend bei 4 °C üN inkubiert. Nach Zentrifugation, dreimaligem Waschen mit RIPA-Waschpuffer, einmaligem Waschen mit A. bidest und erneuten Sedimentationen (1000 UpM, RT, 2,5 min) werden die Komplexe in 25 µl 1 x Laemmli-Complete™-Puffer aufgenommen, vermischt und für 10 min im Heizblock bei 65 °C denaturiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (13000 UpM, 4 °C, 2 min) wird der Überstand abgenommen, in einer SDS-PAGE (Kap. 3.5.7) aufgetrennt und mittels Immunoblot (Kap. 3.5.8) analysiert.

3.5.6 Vorbereitung von Cx57-Immunpräzipitaten aus Retinae für die MudPIT-Analyse

Bei der MudPIT (Multidimensionale Proteinidentifikations-Technologie)-Analyse werden Peptide, resultierend aus der tryptischen Spaltung eines Proteins, nach einer zweidimensionalen chromatographischen Auftrennung massenspektrometrisch vermessen. Die ermittelten Spektren werden algorithmusgestützt mit theoretischen Spektren verglichen und die Peptide auf diese Weise identifiziert. Für die MudPIT-Analyse von Cx57-Immunpräzipitaten aus Retinae wird das in Kap. 3.5.5 beschriebene Protokoll mit einer größeren Proteinmenge durchgeführt. 20 Retinae werden in RIPA-Lysispuffer lysiert, und 1,3 mg Protein in 100 µl in der Immunpräzipitation eingesetzt. Zur Herstellung der Antikörper-Protein G-Sepharose-Komplexe werden bei sonst gleichen Mengen 2,5 µg Cx57-Antikörper verwendet. Nach der üN-Inkubation und den anschließenden Waschschritten erfolgt die Elution des Präzipitats in 60 µl 0,1 M Glyzin (pH 2,5) durch Zentrifugation (1000 UpM, RT, 2,5 min). Der Überstand wird mit 10 µl 1 M Tris-HCl (pH 9,0) neutralisiert, lyophilisiert (Lyovac GT 2-Lyophylle, Leybold) und das Lyophilisat in 20 µl 1 M NH₄CO₃ (pH 8,0) aufgenommen. Nach enzymatischer Spaltung in 1/20 Vol. Trypsin (50 °C, üN) und Ansäuerung mit einem Tropfen Ameisensäure (konz.) wird der Ansatz bei 4 °C gekühlt zur MudPIT-Analyse verschickt.

3.5.7 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

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

Proteine sind im Gegensatz zu doppelsträngigen DNS-Molekülen durch verschiedene Parameter gekennzeichnet: Sie unterscheiden sich nicht nur in ihrer molekularen Masse,

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

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

Durchführung der SDS-PAGE: Es werden Gelgieß-Vorrichtungen der Firma Amersham, Freiburg verwendet. Zunächst wird das Trenngel mit einem Polyacrylamid-Gehalt von 10 oder 12,5 % und einer Dicke von 1,5 mm (Tab. 3.2) bis 1 cm unterhalb der Auftrageschalen gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung des Trenngels wird das Isopropanol mit SDS-Lösung gewaschen, der Auftrageschale eingesetzt und das Sammelgel (Tab. 3.2) gegossen. Die fertig polymerisierten Gele werden in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Pufferkammern mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt. Parallel zu den in 1 x Laemmli-Puffer aufgenommenen Proteinlysaten wird ein Molekulargewichtsstandard auf das Gel aufgetragen. Die unter Wasserkühlung durchgeführte Elektrophorese erfolgt bei 20 mA pro Gel, solange sich die Proben im Sammelgel befinden. Sobald sie das Trenngel erreicht haben, wird auf eine Stromstärke von 25 mA pro Gel erhöht. Die Elektrophorese ist beendet, wenn die Bromphenolblau-Lauffront sich der untersten Kante des Gels nähert.

Zusammensetzung	Sammelgel 4%	Trenngel 10 %	Trenngel 12,5 %
Lösung A (40 %)	1,3 ml	6,25 ml	7,5 ml
Trenngelpuffer (pH 8,8)		6,25 ml	6,25 ml
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	2,5 ml		
H ₂ O (Millipore)	6,2 ml	12,5 ml	11,25 ml
APS (10 %)	100 µl	300 µl	300 µl
TEMED	10 µl	30 µl	30 µl

Tab. 3.2: Zusammensetzung von zwei 1,5 mm dicken Gelen für die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli.

Das Gel wird entweder direkt im Anschluss an die SDS-PAGE oder erst nach Durchführung des Transfers von Proteinen auf eine geeignete Membran (Kap. 3.5.8) mit Coomassie Brilliant Blue™ gefärbt. Zur Färbung wird das Polyacrylamidgel in Coomassie Brilliant Blue™-Lösung (Wippe, 30 min bis 1 h, RT) und danach in mehrfach zu wechselnder Entfärbelösung (Wippe, RT, üN) inkubiert, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Die Nachweisgrenze der Proteine liegt bei etwa 50 ng pro Bande. Ist das gesuchte Protein in großer Menge im Proteinlysate enthalten, beispielsweise nach Überexpression in Bakterien (Kap. 3.5.1), wird es anhand seiner Bande, die sich auf Höhe der erwarteten molekularen Masse im Gel befindet, identifiziert. Zur Dokumentation wird das Gel kurz in Wasser geschwenkt, auf 3MM-Papier gelegt und 2 h auf einem Gelrockner getrocknet.

3.5.8 Immunoblot-Analyse

Bei der Immunoblot-Analyse werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (*Western Blot*) und dort einzelne Proteine immunologisch nachgewiesen. Zum Transfer der Proteine wird die Elektroblo-Vorrichtung der Firma Bio-Rad verwendet. Das SDS-Polyacrylamid-Gel wird nach der Elektrophorese in Transferpuffer äquilibriert. Es wird ein „Sandwich“ aus folgenden, ebenfalls mit Western Blot-Transferpuffer durchnässten Komponenten aufgebaut: Schaumstofflappen, eine Lage 3MM-Papier (Schleicher und Schüll), Gel, eine in ihrer Orientierung markierte Hybond-ECL-Nitrozellulosemembran (Amersham Biosciences), eine weitere Lage 3MM-Papier, ein zweiter Schaumstofflappen. Dieser „Sandwich“ wird mithilfe zweier gelöcherter Plastikplatten zusammengepresst und in die mit Transferpuffer gefüllte Elektroblokkammer gesetzt. Dabei ist die Nitrozellulosemembran zur Anode orientiert. Der Proteintransfer erfolgt in Gegenwart eines gefrorenen Kühlelements und Magnetührstäbchens bei einer Spannung von 100 V auf einem Magnetührer im Kühlraum (4 °C, 1 h). Nach einem erfolgreichen Transfer werden die Proteinbanden auf der Membran durch eine Ponceau-Färbung (Kunststoffschale, 2 min) sichtbar. Nach der Entfärbung in Wasser (Kunststoffschale, 5 min, Wasser öfter wechseln) wird die Membran entweder zwischen 3MM-Papier getrocknet gelagert und dann vor Weiterbehandlung 5 min in A. bidest rehydratisiert oder direkt für den immunologischen Nachweis eingesetzt. Dazu wird sie in einer Kunststoffschale mit Immunoblot-Blockpuffer vorinkubiert (Wippe, RT, 1 h), dann mit 3 ml Primärantikörper-Lösung (anti-Cx36 51-6300,

anti-GFP (Living Colors), *Cx57-Mid*, *Cx57-CT* jeweils 1:100) in Folie eingeschweißt und inkubiert (Drehrad, 4 °C, üN). Zur Entfernung von nicht gebundenen Antikörpern wird die Membran dreimal mit Immunoblot-Waschpuffer (Kunststoffschale/Wippe, RT, jeweils 10 min) gewaschen. Die Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase (Dianova) wird 1:20.000 in Immunoblot-Blockpuffer verdünnt und die Membran darin inkubiert (Kunststoffschale/Wippe, RT, 45 min). Nach dreimaligem Waschen in Immunoblot-Waschpuffer wird die Membran in TBS gewaschen (Kunststoffschale/Wippe, RT, 5 min), kurz zwischen 3MM-Papier getrocknet und 5 min von jeder Seite lichtgeschützt in Chemilumineszenz-Lösung (SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) 1:1 angesetzt inkubiert. Die Membran wird erneut kurz zwischen 3MM-Papier getrocknet, zwischen Folie in eine Filmkassette gelegt und ein RX-Film (Fuji) exponiert. Die Filme werden nach verschiedenen Expositionszeiten (5 sec bis 45 min) entwickelt.

Um die Membran für einen weiteren immunologischen Nachweis zu regenerieren (*strippen*), wird sie nach der Chemilumineszenz-Reaktion einmal in Immunoblot-Waschpuffer und einmal in TBS gewaschen (Kunststoffschale/Wippe, RT, 5 min), bevor sie zweimal in Restore[™] Western Blot Stripping-Puffer (Pierce) inkubiert wird (Kunststoffschale/Wippe, RT, 10 min). Beim zweiten Mal wird der Restore[™]-Puffer zuvor auf 37 °C erwärmt. Nach drei Waschschritten in Immunoblot-Waschpuffer (Kunststoffschale/Wippe, RT, 5 min) kann die Membran erneut in Immunoblot-Blockpuffer inkubiert werden.

3.6 Histologische Analytik

3.6.1 Anfertigung von vitalen Retinadickschnitten zur Fluoreszenzanalyse

Zur Darstellung der Fluoreszenz des CFPs in der Retina hat sich die Anfertigung von vitalen Retinadickschnitten bewährt. Dabei wird die Retina nicht fixiert oder eingefroren, da dies die Fluoreszenz des CFPs beeinträchtigt, sondern unter physiologischen Bedingungen Lebenddickschnitte angefertigt. Dazu werden die Augen einer durch zervikale Dislokation getöteten Maus entnommen, die Retinae in AMES-Medium (Sigma) freipräpariert und in möglichst flache Viertel zerteilt. Eine 2 %ige Agar-Agar (Roth)-Lösung, angesetzt in AMES-Medium, wird kurz aufgeköcht, unter Rühren auf 42 °C abgekühlt und in die Vertiefungen einer 24-Loch-Zellkulturschale gefüllt, in der jeweils ein Retinaviertel vorgelegt ist. Die Retinaviertel werden möglichst flach in der erstarrenden Agar-Agar-Lösung eingebettet und der Agar-Agar-Block so auf dem Präparatträger des Vibratoms fixiert, dass die Retina senkrecht und mit der Innenseite zur Klinge orientiert ist. Die am Vibratom hergestellten 150 µm dicken Schnitte (Geschwindigkeit 1, Frequenz 4 - 5) werden vorsichtig auf einen Objektträger platziert, mit einem Deckgläschen bedeckt und zügig mithilfe des Laser Scan-Mikroskops analysiert.

3.6.2 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse und Immunhistochemie

Immunfluoreszenz- und Immunhistochemieanalysen ermöglichen den Nachweis eines Proteins in fixierten Geweben und Zellen mithilfe von Antikörpern. Bei der indirekten Immunfluoreszenzanalyse werden die Antikörper, welche das interessierende Protein spezifisch erkennen, die *primären* Antikörper, von zweiten Antikörpern, welche die ersten Antikörper speziesspezifisch erkennen, den *sekundären* Antikörpern, gebunden. Bei Immunfluoreszenzanalysen sind diese sekundären Antikörper an Farbstoffmoleküle gekoppelt, welche bei Anregung mit Licht einer entsprechenden Wellenlänge fluoreszieren. Bei Immunhistochemieanalysen werden biotinylierte Sekundärantikörper verwendet, die nach Inkubation mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase in einer enzymatischen Reaktion zu einem braunen Niederschlag führen. In beiden Fällen wird somit das gesuchte Protein indirekt nachgewiesen.

3.6.2.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von transient transfizierten HeLa-Zellen mit den Cx57-Antikörpern *Cx57-Mid* und *Cx57-CT*

HeLa-Zellen werden 24 h auf sterilen Deckgläschen in einer 24-Loch-Schale bis zu einer Konfluenz von 50 bis 60 % kultiviert, mit den eukaryotischen Expressionsvektoren *pMJ-Cx57Stop* bzw. *pMJ-Cx57Go* transient transfiziert (Kap. 3.3.5) und weitere zwei Tage kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS⁻ werden die Zellen 10 min mit 4 % PFA (RT) fixiert und erneut zweimal mit PBS⁻ gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen der HeLa-Zellen werden durch Inkubation in jeweils 200 µl Blockierungslösung pro Vertiefung abgesättigt (Wippe, RT, 1 h). Anschließend werden die Zellen mit 200 µl pro Vertiefung der 1:100 in Blockierungslösung verdünnten primären Antikörper *Cx57Mid* bzw. *Cx57-CT* inkubiert (Wippe, 4 °C, üN). Nach dreimaligem Waschen mit PBS⁻ (Wippe, RT, jeweils 5 min) erfolgt die Inkubation mit 200 µl pro Vertiefung der 1:2500 in Blockierungslösung verdünnten sekundären Alexa 594 Ziege anti-Kaninchen-Antikörper (MoBiTec) (Wippe, RT 1 h). Dieser sowie alle weiteren Schritte werden lichtgeschützt durchgeführt, um die Farbstoffmoleküle der sekundären Antikörper nicht auszubleichen. Die Zellen werden zweimal mit PBS⁻ gewaschen (Wippe, RT, 1 h) und in Hoechst 33258-Lösung inkubiert (Wippe, RT, 15 min). Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS⁻ (Wippe, RT, jeweils 5 min) werden die Deckgläschen kurz in A. bidest geschwenkt, trocken getupft und mit der Kulturseite nach unten auf einem Objektträger in einem Tropfen Permafluor[®] (Beckman) eingedeckelt. Die Präparate werden lichtgeschützt bei 4 °C ausgehärtet und zügig mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiophot, Zeiss) ausgewertet.

3.6.2.2 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten mit Cx36-Antikörpern

Die adulten Mäuse werden durch zervikale Dislokation getötet, die Augen entnommen und in Tissue-Tec (Sakura) eingebettet. Mit einem Kryotom werden 10 - 20 µm dicke sagittale

Schnitte angefertigt, wobei die Schnitte des Versuchstieres jeweils auf denselben Objektträgern wie die der Kontrolltiere aufgenommen werden. Nach der einstündigen Trocknung vor einem Ventilator werden die Schnitte zur weiteren Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder direkt in absolutem EtOH fixiert (Küvette, RT, 15 min), zweimal in PBS⁻ gewaschen (Küvette/Wippe, jeweils 5 min, RT) und zur RNS-Spaltung (wichtig für die Propidiumjodid-Färbung) 30 min in 300 μl RNase-Lösung pro Objektträger in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte werden erneut zweimal in PBS⁻ gewaschen (Küvette/Wippe, RT, jeweils 5 min), mit einem Fettstift (Dako) umrandet und in 300 μl Blockierungslösung pro Objektträger (feuchte Kammer, RT, 30 min) abgesättigt. Der primäre Antikörper anti-Cx36 46-3600 (Zymed) wird 1:100 in Blockierungslösung verdünnt und 150 μl Antikörper-Lösung pro Objektträger in einer feuchten Kammer inkubiert (RT, 1 h). Nach dreimaligem Waschen in PBS⁻ (Küvette/Wippe, RT, jeweils 5 min) erfolgt lichtgeschützt die Inkubation mit 300 μl pro Objektträger Sekundäantikörpern Alexa 594 Ziege anti-Kaninchen (MoBiTec) 1:2500 verdünnt in Blockierungslösung (feuchte Kammer, RT, 45 min). Überschüssige Sekundäantikörper werden gewaschen (abgedunkelte Küvette/Wippe, RT, 5 min) und die Schnitte zur unspezifischen Zellkernmarkierung in Propidiumjodid-Lösung inkubiert (abgedunkelte Küvette, RT, 15 min). Nach drei Waschschritten in PBS⁻ (abgedunkelte Küvette/Wippe, RT, jeweils 5 min) werden die Objektträger kurz in A.bidest geschwenkt und trockengetupft, die Schnitte in Permafluor[®] (Beckman) eingedeckelt und bis zur Analyse am Laser Scan-Mikroskop (Zeiss) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgehärtet. Die Lagerung erfolgt lichtgeschützt maximal für eine Woche.

3.6.2.3 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten mit Glyzin-Antikörpern

Sämtliche hierbei verwendeten Lösungen werden in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 angesetzt. Zum Nachweis des Glyzins in der Retina werden die entnommenen Augen einer Augenbecher-Präparation in AMES-Medium (Sigma) unterzogen (Kap. 3.6.2.4), zweimal 10 min in 2 % PFA fixiert (RT), dreimal 10 min gewaschen (RT) und $\ddot{u}\text{N}$ in einer 30 %igen Sucrose-Lösung inkubiert ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die Augenbecher werden in Tissue-Tec (Sakura) eingebettet und 15 μm dicke, sagittale Gefrierschnitte angefertigt. Nach dem Trocknen werden die Schnitte in 300 μl 10 % NGS und 0,3 % Triton[®]-X 100 pro Objektträger blockiert (feuchte Kammer, RT, 1 h), mit einem Fettstift (Dako) umrandet und in 150 μl einer 1:1000-Verdünnung der Glyzin-Primäantikörper mit 0,3 % Triton[®]-X 100 inkubiert (feuchte Kammer, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\ddot{u}\text{N}$). Die Schnitte werden dreimal 10 min gewaschen (Küvette, RT) und in 150 μl einer 1:400 Verdünnung der Cy3 Ziege anti-Ratte-Sekundäantikörper mit 0,3 % Triton[®]-X 100 inkubiert (feuchte Kammer, RT, 2h). Nach erneutem dreimaligen Waschen (Küvette, RT, jeweils 10 min) und kurzem Schwenken in A.bidest werden die Schnitte trockengetupft, in Permafluor[®] (Beckman) eingedeckelt und nach dem Aushärten am Laser Scan-Mikroskop (LSM, Zeiss) ausgewertet.

3.6.2.4 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse und Immunhistochemieanalyse von Gehirn- und Retina-Schnitten mit GFP-Antikörpern

Für die Immunfluoreszenz- und die Immunhistochemieanalyse mit GFP-Antikörpern müssen die zu untersuchenden Mäuse zunächst perfundiert werden, um eine optimale Fixierung des Gewebes zu erreichen. Dazu wird die Maus mit einer intraperitonealen Rompun/Ketovet-Injektion tief narkotisiert und der Brustkorb geöffnet. 300 µl heparinhaltige Liquemin® N 25000-Lösung (Roche) werden zur Unterbindung der Blutgerinnung in die linke Herzkammer des noch schlagenden Herzens gespritzt und der rechte Vorhof angeschnitten, bevor erst 5 ml PBS⁻ zum Ausspülen des Blutes, dann 25 ml 4 % PFA zur Fixierung über das Herz in den Körper der Maus injiziert werden. Nach der Perfusion werden die Augen und das Gehirn entnommen. In einer Augenbecher-Präparation wird die Cornea rund um das Auge herum abgeschnitten und die Linse aus dem Auge entfernt, die Augenbecher 10 min in 4% PFA bei RT nachfixiert und in Sucroselösung üN bei 4 °C auf der Wippe inkubiert. Das Gehirn wird üN bei 4 °C in 4 % PFA nachfixiert.

GFP-Immunfluoreszenzanalyse Retina: Nach der Herstellung von 10 - 20 µm dicken sagittalen Retina-Gefrierschnitten mit denen des Versuchstieres und der Kontrolltiere auf jeweils einem gemeinsamen Objektträger werden diese 1 h vor dem Ventilator getrocknet und anschließend in PBS⁻ geschwenkt (Küvette/Wippe, RT, 5 min). Nach der Inkubation in RNase-Lösung (Küvette, RT, 30 min) werden die fettstiftumrandeten Schnitte in 300 µl Blockierungslösung pro Objektträger blockiert (feuchte Kammer, RT 1 h), bevor sie in 150 µl GFP-Primärantikörper-Lösung (Molecular Probes) 1:1000 verdünnt in Blockierungslösung inkubiert werden (feuchte Kammer, 4 °C, üN). Es folgen vier Waschschrte mit PBS⁻ (Küvette/Wippe, RT, jeweils 5 min). Anschließend werden 300 µl des Sekundärantikörpers Alexa 488 Ziege anti-Kaninchen (MoBiTec) 1:2500 in Blockierungslösung verdünnt auf die Objektträger gegeben und lichtgeschützt inkubiert (feuchte Kammer, RT, 2 h). Nach weiteren vier Waschschrten mit PBS⁻ (abgedunkelte Küvette/Wippe, RT, jeweils 5 min) werden die Objektträger zur unspezifischen Kernfärbung der Schnitte in Propidiumjodid-Lösung inkubiert (abgedunkelte Küvette, RT, 15 min), erneut dreimal in PBS⁻ gwaschen (abgedunkelte Küvette/Wippe, RT, jeweils 5 min), kurz in A. bidest geschwenkt, trockengetupft und in Permafluor® (Beckman) eingedeckelt. Nach einigen Stunden lichtgeschützt bei 4 °C sind die Schnitte ausgehärtet und können am Laser Scan-Mikroskop analysiert werden.

GFP-Immunhistochemieanalyse Retina: Der Ablauf ist ähnlich zu dem Protokoll für die Immunfluoreszenzanalyse der Retina. Die Gefrierschnitte werden nach dem Trocknen vor dem Ventilator in TBS geschwenkt (Küvette/Wippe, RT, 5 min) und direkt blockiert. Der GFP-Primärantikörper (Abcam) wird 1:400 in einer TBS-Lösung mit 2 % NGS und 0,4 % Triton-x 100 verdünnt, während der biotinylierte Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen

(Zymed) 1:200 in einer TBS-Lösung mit 5 % NGS und 1 % Triton-x 100 eingesetzt wird. Die Waschschriffe erfolgen in TBS. Die Schnitte werden mit jeweils 150 µl MOM-ABC-Reagenz (Vektor; 30 min vor Gebrauch angesetzt) inkubiert (feuchte Kammer, RT, 2 h), dreimal mit TBS, dann dreimal mit Tris-Puffer gewaschen (Küvette/Wippe, RT, 5 min) und in jeweils 300 µl DAB-Färbelösung pro Objektträger inkubiert. Nach 10 bis 15 min wird die Färbereaktion durch zweimaliges Waschen der Objektträger mit Tris-Puffer (Küvette/Wippe, RT, 5 min) und kurzes Schwenken in A.bidest gestoppt. Die luftgetrockneten Schnitte werden in Entellan® (Merck) eingedeckelt, ausgehärtet (RT, üN) und an einem Durchlichtmikroskop (Axiophot, Zeiss) betrachtet und dokumentiert.

GFP-Immunhistochemieanalyse Gehirn (Prof. James Deuchars): Von der entsprechenden Region des PFA-fixierten Gehirns werden am Vibratom 30 – 50 µm dicke koronale Schnitte angefertigt, in der Küvette dreimal 10 min mit PBS⁻ gewaschen und mit dem GFP-Primärantikörper (Molecular Probes) 1:1000 verdünnt in PBS⁻ mit 0,1 - 0,2 % Triton-X 100 inkubiert (Küvette, 4 °C, üN). Die Schnitte werden erneut dreimal 10 min mit PBS⁻ gewaschen (Küvette, RT) und mit dem biotinylierten Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen 1:500 verdünnt in PBS⁻ mit 0,1 - 0,2 % Triton-X 100 inkubiert (Küvette, RT, 4 – 6 h). Nach dreimaligem Waschen in PBS⁻ (Küvette, RT) werden die Schnitte in 1:1000 in PBS mit 0,1 - 0,2 % Triton-X 100 verdünnter Extravidin-Peroxidase-Lösung (Sigma) (Küvette, 4 °C, üN) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS⁻ und zweimaligem Waschen in Tris-Puffer (Küvette, RT, jeweils 10 min) werden die Schnitte 10 min in Tris-Puffer, dem DAB hinzugefügt wurde (50 mg DAB auf 100 ml Tris-Puffer), inkubiert (Küvette, RT), bevor 10 ml einer 10 %igen H₂O₂-Lösung hinzupipettiert werden. Nach 10 min werden die Schnitte in Tris-Puffer gewaschen (Küvette, RT), luftgetrocknet und auf Objektträgern in Entellan® (Merck) eingedeckelt. Nach der Aushärtung (RT, üN) können sie am Durchlichtmikroskop (Axiophot, Zeiss) betrachtet werden.

3.6.2.5 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten mit den Cx57-Antikörpern Cx57-Mid und Cx57-CT (Protokoll nach Prof. James Nagy)

Auch für die Immunfluoreszenzanalyse mit den Cx57-Antikörpern *Cx57-Mid* und *Cx57-CT* werden die zu untersuchenden Mäuse zunächst perfundiert. 3 ml Nagy-Perfusionslösung 1 werden der narkotisierten Maus in die linke Herzkammer des noch schlagenden Herzens injiziert und der rechte Vorhof aufgeschnitten. Es folgen 40 ml der Pricrinsäure- und PFA-haltigen Nagy-Perfusionslösung 2 und 10 ml Nagy-Perfusionslösung 3. Die Perfusionslösungen sollten alle gekühlt zum Einsatz kommen. Nach der Perfusion werden die Augen entnommen, einer Augenbecher-Präparation unterzogen und die Augenbecher 24 – 48 h in Nagy-Sucroselösung bei 4 °C auf der Wippe inkubiert. Nach der Anfertigung von 10 - 20 µm dicken Gefrierschnitten mit Versuchs- und Kontrollauge auf jeweils einem Objektträger und der einstündigen Trocknung vor einem Ventilator werden sie 20 min in Nagy-TBS-T-Puffer gewaschen (Küvette, RT) und umkreist mit einem Fettstift (Dako) in 200 µl pro Objektträger

Cx57-Mid- bzw. *Cx57-CT*-Primärantikörperlösung 1:100 verdünnt in Nagy-TBS-T-Puffer mit 5 % NGS inkubiert (feuchte Kammer, 4 °C, üN). Nach dreimaligem Waschen in Nagy-TBS-T-Puffer (Küvette/Wippe, RT, jeweils 20 min) werden die Schnitte lichtgeschützt in 200 µl pro Objekträger Alexa 488 oder Alexa 594 Ziege anti-Kaninchen-Sekundärantikörperlösung (MoBiTec) 1:000 verdünnt in Nagy-TBS-T-Puffer inkubiert (feuchte Kammer, RT, 1,5 h). Sie werden einmal in Nagy-TBS-T-Puffer, dem zur Zellkernmarkierung Hoechst 33258-Lösung (1:1000) zugegeben wurde, dann zweimal in Nagy-Tris-Puffer (50 mM, pH 7,4) gewaschen (abgedunkelte Küvette/Wippe, RT, 20 min), kurz in A. bidest geschwenkt, trockengetupft und in Permafluor[®] (Beckman) eingedeckelt. Nach dem Aushärten lichtgeschützt bei 4 °C können die Schnitte am Laser Scan-Mikroskop (Hoechst 33 258-Färbung über Laser nicht darstellbar, dient nur zur Orientierung) oder am Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss) ausgewertet werden.

3.6.3 β -Galaktosidase-Nachweis in Retinagefrierschnitten

Retina-Gefrierschnitte nicht-perfundierter Mäuse (Kap. 3.6.2.2) werden 5 min in LacZ-Fixierlösung (RT), zweimal 5 min in LacZ-Waschlösung (RT) und üN in LacZ-Substratlösung bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Schnitte werden 5 min in LacZ-Waschlösung und 5 min in A.bidest gewaschen, bevor sie 15 bis 30 min in Eosin-Färbelösung inkubiert und anschließend in öfter zu wechselndem Wasser gewaschen werden, bis sich kein Farbstoff mehr löst. Die luftgetrockneten Schnitte werden mit Entellan[®] (Merck) eingedeckelt. Nach dem Trocknen kann die Blaufärbung an einem Durchlichtmikroskop (Axiophot, Zeiss) betrachtet und dokumentiert werden.

3.7 Tamoxifen-vermittelte Induktion der PrP-CreER^T-Rekombinase

Transgenen Mäusen, die die CreER^T-Rekombinase unter Kontrolle des zelltypspezifischen Prionprotein (PrP)-Promotors ausprägen, wird Tamoxifen appliziert, so dass die Cre-Rekombinase in den Zellkern gelangen und dort gefloxe Gene deletieren kann (*Induktion*, Kap. 1.10.1). Dazu werden pro Maus pro Tag 1 mg Tamoxifen (Sigma) in 5 µl EtOH abs. gelöst und in 95 µl Erdnussöl (Apotheke) als Trägersubstanz aufgenommen. Es empfiehlt sich die Herstellung eines Gesamtansatzes für fünf Tage, der dunkel bei 4 °C gelagert wird. 100 µl der Tamoxifen-Lösung werden einer Maus pro Tag über einen Zeitraum von fünf Tagen intraperitoneal injiziert. Kontrollmäuse erhalten die Alkohol-Öl-Lösung ohne Tamoxifen. Nach mindestens sechs Tagen Inkubationszeit können die Mäuse auf die Ausprägung des Reporterproteins analysiert werden.

4 Ergebnisse

4.1 Projekt I: Erzeugung und Charakterisierung der konditional Cx36-defizienten Mausmutante *Cx36flox(CFP)*

Zu Beginn dieser Arbeit lagen bereits zwei Cx36-Mausmutanten aus unserer Arbeitsgruppe vor: zum einen eine Cx36-Defekt-Maus (Güldenagel et al., 2001), bei der die Cx36-kodierende Region durch eine gefloخته HPRT-Selektionskassette ersetzt worden war, zum anderen eine Cx36-Reporter-Maus (Degen et al., 2004), die bei Deletion der von loxP-Erkennungssequenzen flankierten Cx36-kodierenden Region das Reportergen lacZ unter Kontrolle des Cx36-Promotors ausprägt. In Anlehnung an die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur wird sie im Folgenden als *Cx36flox(lacZ)*-Mausmutante bezeichnet. Obwohl in dieser *Cx36flox(lacZ)*-Maus die Cx36-kodierende Region konditional durch die Aktivität spezifischer Cre-Rekombinasen deletiert werden kann, stellt diese Maus keine konditionale Cx36-Defekt-Maus dar, da das gefloخته Cx36-Gen nicht exprimiert wird (Joachim Degen, Dissertation 2003). Um die Expression von Cx36 und damit die elektrische Kopplung über Cx36-Gap Junction-Kanäle zu einem bestimmten Zeitpunkt und/oder in bestimmten neuronalen Subtypen, die Cx36 ausprägen, zu unterbinden, wurde in einem zweiten Ansatz eine konditional Cx36-defiziente Mausmutante, die *Cx36flox(CFP)*-Maus, hergestellt. Dies erfolgte wie bereits zuvor mittels homologer Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen). Für diesen Zweck wurde von Dr. Joachim Degen der Austauschvektor *pJD-Cx36flox* (Abb. 4.1) kloniert und Teilsequenzen im HeLa-Zellsystem auf ihre Funktionalität hin analysiert (Joachim Degen, Dissertation 2003). Der Vektor *pJD-Cx36flox* wurde dahingehend konstruiert, dass die Cx36-kodierende Region auf Exon 1 und 2 mit sämtlichen potentiellen regulatorischen Sequenzen im Intron und im 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) so wenig wie möglich durch die loxP-Erkennungssequenzen verändert wurde. Diese befinden sich daher im 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) von Cx36 sowie hinter der von frt-Erkennungssequenzen flankierten Neomycin-Resistenz (neoR)-Kassette, die auf den 3'-UTR mit dem endogenen poly-Adenylierungssignal (polyA-Signal) von Cx36 folgt. Daran schließt sich die kodierende Region des Reportergens CFP (*cyan fluorescent protein*, blau fluoreszierendes Protein) an, deren 5'- und 3'- umgebender Bereich, ein Teil des 5'-UTRs bzw. der gesamte 3'-UTR mit endogenem Cx36-polyA-Signal, dem Cx36-Lokus entspricht. Dies soll gewährleisten, dass Cx36 in Anwesenheit der loxP-Erkennungssequenzen ausgeprägt wird und die CFP-Expression nach Deletion von Cx36 dessen Expression widerspiegelt. Die gefloخته neoR-Kassette kann durch Verpaarung von *Cx36flox(CFP)*-Mäusen mit ubiquitär deletierenden deleter-Flp-transgenen Mäusen (Rodriguez et al., 2000) entfernt werden, um dem Cx36-Wildtyp-Lokus noch stärker zu entsprechen (Schema der homologen Rekombination und der resultierenden Genotypen: Abb. 4.4).

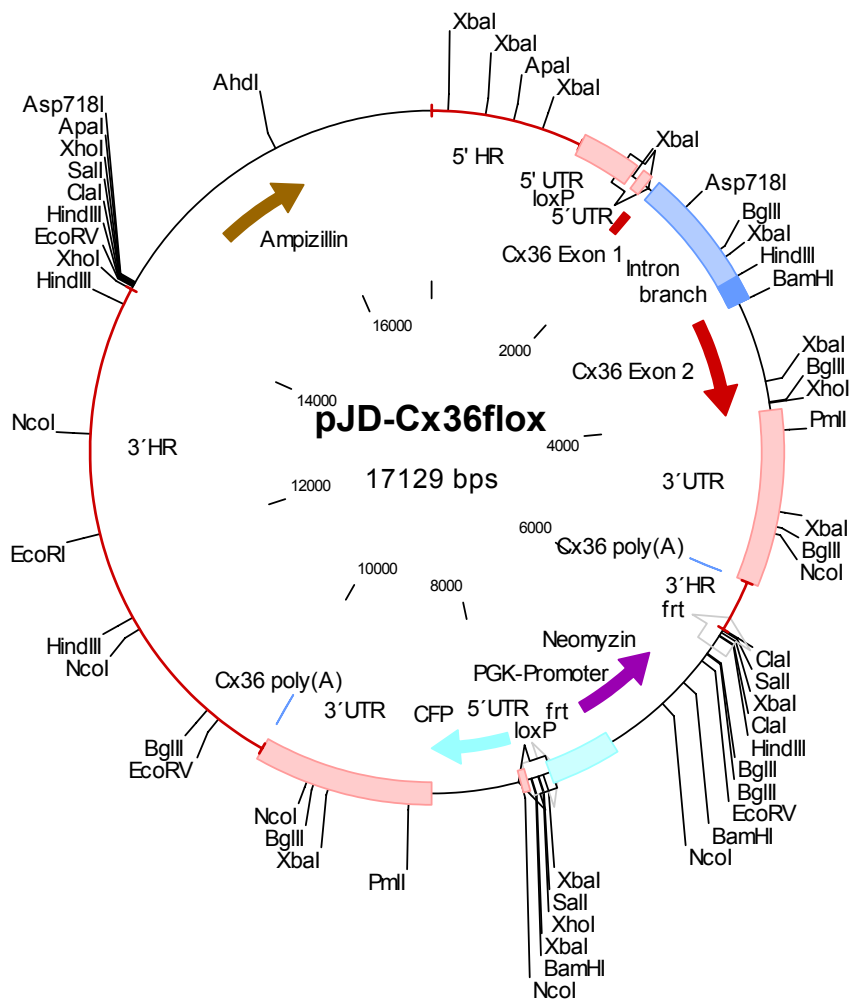


Abb. 4.1: Der Austauschvektor *pJD-Cx36floxed*. Er wurde für die homologe Rekombination in ES-Zellen zur Herstellung der konditional Cx36-defizienten Mausmutante *Cx36floxed(CFP)* kloniert (Joachim Degen, Dissertation 2003).

4.1.1 ES-Zellkultur, Blastozysteninjektion und Chimärenverpaarung

4.1.1.1 Transfektion der murinen ES-Zelllinie HM1 mit dem Vektorkonstrukt *pJD-Cx36floxed*

HM1-Zellen (Magin et al., 1992) mit der Passagenzahl 19 wurden analog zu dem Protokoll nach Theis et al. (2000) mit dem *AhdI*-linearisierten Austauschvektor *pJD-Cx36floxed* transfiziert (siehe auch Kap. 3.3.6 und folgende). Eine Selektion transfizierter Klone erfolgte in Anwesenheit des Antibiotikums Gentamycin418 (G418). Sechs Tage nach der Transfektion wurden die ersten Klone sichtbar. Ab acht Tagen nach der Transfektion wurden insgesamt 528 von über 1000 Klonen isoliert und kultiviert.

4.1.1.2 Analyse G418-selektionierter ES-Zellklone mittels PCR

Die G418-selektionierten Klone wurden zunächst mithilfe der *ES-Cx36flox(CFP)*-PCR (etabliert von Joachim Degen, Dissertation 2003; Kap. 3.1.8) auf die homologe Rekombination in den Cx36-Lokus überprüft. Durch die Lage der Oligonukleotid-Startermoleküle stromaufwärts von der 5'-homologen Region und in der 5'-loxP-Erkennungssequenz entstand ein PCR-Amplikon von 1,8 kb bei Klonen, in denen eine korrekte 5'-homologe Rekombination stattgefunden hatte (Abb. 4.4). Durch die *ES-Cx36flox(CFP)*-PCR wurden 31 potentiell positive Klone von 400 getesteten gefunden, was einer Rekombinationsrate von etwa 7,8 % entspricht.

4.1.1.3 Analyse PCR-positiver ES-Zellklone mittels Southern Blot

Die PCR-positiven ES-Zellklone wurden anhand einer Southern Blot-Analyse (Kap. 3.1.9) genauer charakterisiert. Die Untersuchung des Cx36-Wildtyp-Allels mit einer 3'-externen Sonde, die stromabwärts der 3'-homologen Region des *pJD-Cx36flox*-Austauschvektors hybridisierte, führte nach Spaltung der genomischen DNS mit der Restriktionsendonuklease *Asp718I* zum Nachweis eines Fragmentes von 8,5 kb Größe, das veränderte *Cx36flox(CFP)*-Allel zum Nachweis eines 13,2 kb-Fragmentes. Dadurch wurde im 3'-Bereich wie zuvor mit der ES-Zell-PCR im 5'-Bereich von Cx36 überprüft, ob das von den homologen Regionen flankierte *Cx36flox(CFP)*-Konstrukt des Austauschvektors und nicht auch das Vektorrückgrat in das Genom der Maus rekombiniert wurde. Um auszuschließen, dass das *Cx36flox(CFP)*-Konstrukt nicht nur homolog in den Cx36-Lokus, sondern auch an anderen Stellen ins Genom rekombiniert worden war, wurde die Southern Blot-Analyse zusätzlich mit einer internen Sonde durchgeführt, die in Exon 1 von Cx36 und dem sich anschließenden Intron bindet. Dies führte beim Wildtyp-Allel sowie bei einer einmaligen Insertion des *Cx36flox(CFP)*-Konstruktes in den Cx36-Lokus zum Nachweis eines Fragmentes von 6,5 kb Größe. Die Anwesenheit der 5'-loxP-Erkennungssequenz im veränderten Cx36-Lokus fällt dabei nicht ins Gewicht.

Nur sechs der dreizehn getesteten Klone, Klon-Nr. 18, 42, 76, 152, 222, 359, sind als eindeutig positiv zu bestimmen (Abb. 4.2a). Bei allen Klonen hybridisierte wie bei der Wildtyp-HM1-DNS eine 8,5 kb-Bande für das Wildtyp-Fragment. Es fehlt jedoch in acht Fällen der Nachweis einer Bande für das 13,2 kb-Fragment, das sich bei einem homolog rekombinierten Cx36-Lokus ergibt, oder die hybridisierende Bande befindet sich auf einer anderen Höhe. Klon Nr. 210 zeigt eine mehrfache Insertion des *Cx36flox(CFP)*-Konstruktes (Abb. 4.2b).

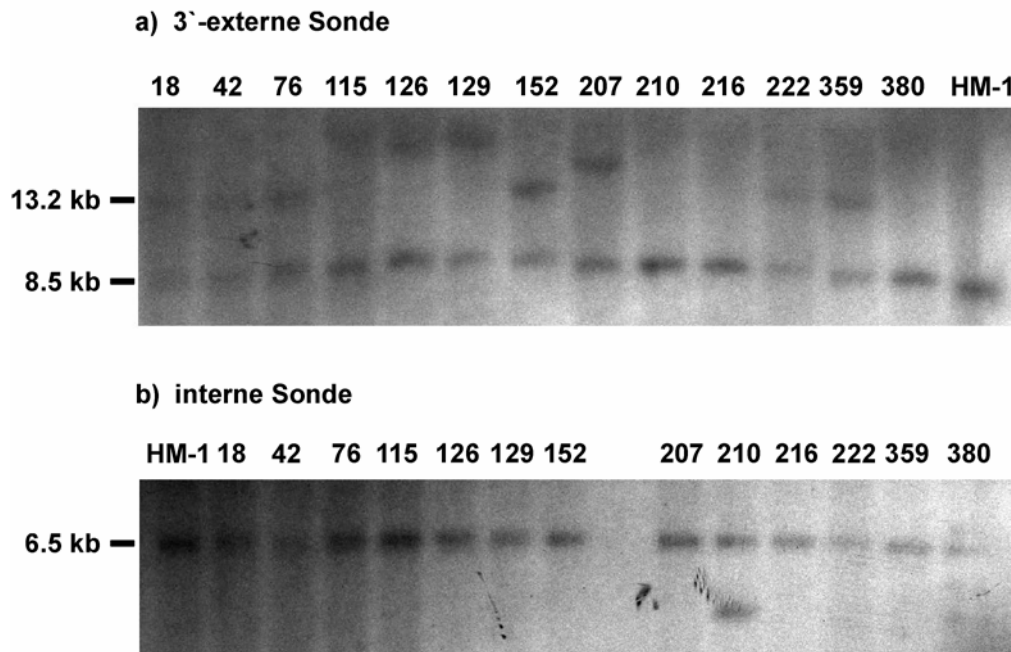


Abb. 4.2: Southern Blot-Analyse mit einigen der PCR-positiven ES-Zellklone. a) Nachweis des *Asp718I*-Restriktionsfragmentes aus dem *Cx36*-Lokus mit einer 3'-externen Sonde. Für alle Klone ergibt sich eine Bande bei 8,5 kb für das Wildtyp-Allel. Klon 18, 42, 76, 152, 222 und 359 zeigen zusätzlich eine Bande bei 13,2 kb für das veränderte *Cx36lox(CFP)*-Allel. b) Nachweis des *Asp718I*-Restriktionsfragmentes aus dem *Cx36*-Lokus mit einer internen Sonde. Eine Bande bei 6,5 kb deutet darauf hin, dass das *Cx36lox(CFP)*-Konstrukt einmal ins Genom inserierte. Klon 210 ist ein Beispiel für eine Mehrfachintegration. HM1: genomische DNS untransfizierter HM1-Zellen als Negativkontrolle.

4.1.1.4 Blastozysteninjektion ausgewählter homolog rekombinierter ES-Zellklone und Verpaarungen resultierender Mäuschimären

Die ES-Zellen der homolog rekombinierten Klone Nr. 18, 76 und 42 wurden in Blastozysten injiziert (Kap. 3.4). Dabei resultierten aus Klon 18 sechs chimäre Mäuse, aus Klon 42 38 größtenteils hochchimäre Mäuse und aus Klon 76 sechs teilweise hochchimäre Mäuse. Chimären aller drei Klone wurden mit C57Bl/6-Tieren verpaart und zeigten anhand agoutifarbener Nachkommen Keimbahntransmission des Genotyps der injizierten HM1-Zellen.

4.1.2 Analyse der Chimärennachkommen

Agoutifarbene Nachkommen aus den Chimären-Verpaarungen wurden mithilfe der *KW-Maus*-PCR (Kap. 3.1.8; Abb. 4.3) auf die Anwesenheit der 5'-loxP-Erkennungssequenz als charakteristischen Marker für das *Cx36lox(CFP)*-Konstrukt analysiert. Die Hälfte der Nachkommen mit Agouti-Fellfarbe aus den ES-Zellklonen 18 und 76, nicht aber aus dem ES-Zellklon 42 wies den veränderten *Cx36*-Lokus auf. Durch die Überprüfung der genomischen

DNS dieser Mäuse mithilfe einer weiteren Southern Blot-Analyse (nicht gezeigt) wurde festgestellt, dass die 5'-loxP-Erkennungssequenz in Klon 42 nicht vorhanden war. Aufgrund von Zuchtproblemen der aus Klon 18 resultierenden Mäuse wurde die gesamte Zucht der *Cx36flox(CFP)*-Mauslinie mit Klon 76-Tieren aufgebaut.

4.1.3 Etablierung der PCRs zur Bestimmung der verschiedenen Genotypen der *Cx36flox(CFP)*-Mausmutante

Ausgehend von den agoutifarbenen Chimärennachkommen mit dem Genotyp $Cx36^{+/flox(CFP)}$ wurden kontinuierlich Verpaarungen mit C57Bl/6-Mäusen angesetzt, um den C57Bl/6-Hintergrund der *Cx36flox(CFP)*-Linie zu erhöhen. Des Weiteren wurden heterozygote *Cx36flox(CFP)*-Mäuse untereinander verpaart, so dass homozygote $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}$ -Nachkommen geboren wurden. Verpaarungen dieser Tiere mit deleter-Flp- und PGK-Cre-transgenen Mäusen führten zu Nachkommen mit dem Genotyp $Cx36^{+/flox\Delta neo(CFP)}$ und $Cx36^{+/CFP}$ (Kap. 4.1.4). Mit DNS aus Schwanzspitzenbiopsien dieser Mäuse wurden PCRs zur Bestimmung der verschiedenen Genotypen etabliert (Kap. 3.1.6; Abb. 4.3).

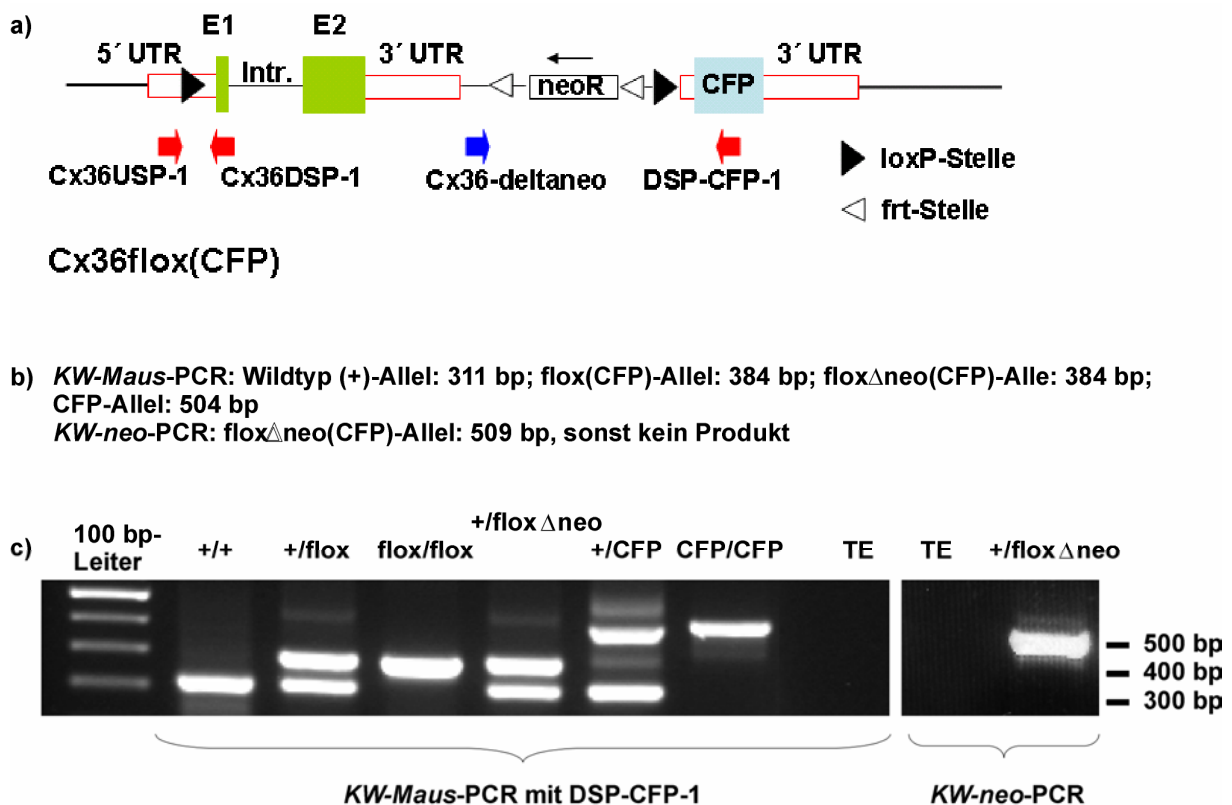


Abb. 4.3: Strategien der Genotypisierungs-PCRs *KW-Maus* und *KW-neo*, Größen der PCR-Produkte und exemplarisches Gelfoto beider PCRs. a) Die *KW-Maus-PCR* stellt mit den verwendeten Oligonukleotid-Startermolekülen *Cx36USP-1*, *Cx36DSP-1* und *DSP-CFP-1* eine Drei-Oligonukleotid-Startermolekül-PCR dar und testet auf das Vorhandensein der 5'-loxP-Erkennungsstelle im *Cx36flox(CFP)*-Lokus bzw. auf Rekombination nach Cre-vermittelter Deletion. Die *KW-neo-PCR* mit den verwendeten Oligonukleotidstartermolekülen *Cx36-deltaneo* und *DSP-CFP-1* führt zu einem Produkt, wenn die neo-Kassette durch die Flp-Rekombinase deletiert wurde. In b) sind die Größen der jeweiligen PCR-Produkte angegeben. c) zeigt exemplarisch das Foto eines Agarosegels, auf dem die

verschiedenen PCR-Ansätze aufgetrennt wurden. Die Bezeichnungen der Allele *flox(CFP)* und *flox Δ neo(CFP)* wurden in dieser Abbildung zu *flox* und *flox Δ neo* verkürzt.

Die *KW-Maus*-PCR diskriminiert zwischen dem Cx36-Wildtyp-, dem *Cx36flox(CFP)*- und dem *Cx36CFP*-Allel, während die *KW-neo*-PCR die Deletion der neo-Kassette nachweist. In der *KW-Maus*-PCR liegen das Aufwärts-Oligonukleotid-Startermolekül *Cx36USP-1* im 5'-UTR und das Abwärts-Oligonukleotid-Startermolekül *Cx36DSP-1* in Exon 1 von Cx36, stromauf- und stromabwärts von der 5'-loxP-Erkennungsstelle in der *Cx36flox(CFP)*-Maus. Somit ergibt sich für das *Cx36flox(CFP)*-Allel mit 384 bp ein größeres Amplikon als für das Wildtyp-Allel mit 311 bp, da der Bereich zwischen *Cx36USP-1* und *Cx36DSP-1* um die loxP-Erkennungsstelle ergänzt ist. Nach der Deletion des von den loxP-Erkennungsstellen flankierten Bereiches kann das Abwärts-Oligonukleotid-Startermolekül *Cx36DSP-1* nicht mehr an die DNS hybridisieren; es ergibt sich ein PCR-Produkt von 504 bp zwischen dem Aufwärts-Oligonukleotid-Startermolekül *Cx36USP-1* und dem zweiten Abwärts-Oligonukleotid-Startermolekül *DSP-CFP-1*. Die *KW-Maus*-PCR unterscheidet nicht zwischen dem *Cx36flox(CFP)*- und dem *Cx36flox Δ neo(CFP)*-Allel. Zur Identifikation des *flox Δ neo(CFP)*-Allels wird die *KW-neo*-PCR durchgeführt. Sie führt zu einem Amplikon von 509 bp, wenn die von *frt*-Erkennungssequenzen flankierte neo-Kassette deletiert wurde.

4.1.4 Charakterisierung der konditional Cx36-defizienten *Cx36flox(CFP)*-Mausmutante

Die konditional Cx36-defiziente Mausmutante *Cx36flox(CFP)* wurde bezüglich des veränderten genomischen Locus von Cx36 nach Flp- und Cre-Aktivität sowie hinsichtlich der Cx36- und der CFP-Reportergenexpression charakterisiert. Bei diesen Analysen wurden soweit möglich alle aus der *Cx36flox(CFP)*-Maus resultierenden Genotypen im hetero- und homozygoten Zustand berücksichtigt. Dazu zählen: $Cx36^{+/flox(CFP)}$, $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}$, $Cx36^{+/flox\Delta neo(CFP)}$, $Cx36^{+/CFP}$ und $Cx36^{CFP/CFP}$. $Cx36^{+/+}$ -Mäuse dienten als Wildtyp-Kontrollen. Das *Cx36CFP*-Allel resultiert aus Verpaarung von *Cx36flox(CFP)*-Mäusen mit PGK-Cre-transgenen Mäusen, in denen die Cre-Rekombinase unter dem in allen Zellen aktiven Phosphoglyzeratkinase (PGK)-Promotor ausgeprägt wird (Lallemand et al., 1998). Zu einer Deletion der von loxP-Stellen flankierten Cx36-kodierenden Region kommt es bereits in der Zygote, so dass somatische Zellen und Keimzellen der Folgegeneration Cx36-defizient sind und anstelle des Cx36-Proteins das CFP ausprägen. Die Modifikation des Cx36-Locus wird vererbt. Gleiches gilt für das *Cx36flox Δ neo(CFP)*-Allel nach Verpaarung von *Cx36flox(CFP)*-Mäusen mit deleter-Flp-Mäusen. Homozygote $Cx36^{flox\Delta neo(CFP)/flox\Delta neo(CFP)}$ -Tiere standen aufgrund der schlechten Verpaarungseffizienz zum Zeitpunkt der Durchführung der Versuche nicht zur Verfügung.

Zunächst wurden die Cx36-Genorte der verschiedenen Mausgenotypen mithilfe einer Southern Blot-Analyse verifiziert. In anschließenden Experimenten erfolgte die Untersuchung

der verschiedenen Genotypen auf An- bzw. Abwesenheit der Cx36-mRNS und des Cx36-Proteins bzw. der CFP-mRNS sowie des CFP-Proteins. Bei einigen Versuchen zählte dazu auch der Genotyp $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)};Nestin-Cre$ bzw. $Cx36^{lacZ/flox(CFP)};Nestin-Cre$. Dadurch wurden die zelltypspezifische Deletion von Cx36 durch das Nestin-Cre-Transgen (Tronche et al., 1999) bzw. die zelltypspezifische Expression des CFP-Reporters und damit die Konditionalität der $Cx36flox(CFP)$ -Mausmutante unter Beweis gestellt. Das $Cx36lacZ$ -Allel ergibt sich aus der ubiquitären Deletion des $Cx36flox(lacZ)$ -Allels durch die PGK-Cre-Rekombinase.

Die histologischen Analysen wurden größtenteils mit Retinagewebe durchgeführt, da die Ausprägung von Cx36 in den plexiformen Schichten besonders hoch und gut sichtbar ist (Teubner et al., 2000). Die Somata der Cx36-exprimierenden Zellen befinden sich in den nukleären Schichten der klar strukturierten Retina (Degen et al., 2004).

4.1.4.1 Southern Blot-Analysen von genomischer Maus-DNS

Zur Untersuchung der Rekombinationsereignisse im veränderten Cx36-Lokus durch die deleter-Flp- und die PGK-Cre-Rekombinase (Abb. 4.4) wurde genomische Nieren-DNS (Kap. 3.1.1.6) der verschiedenen Mausgenotypen mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Größe der jeweiligen Restriktionsfragmente wurde in einer Southern Blot-Analyse (Kap. 3.1.9; Abb. 4.5) mithilfe von radioaktiv markierten Sonden überprüft. Bei der im 3'-externen Bereich hybridisierenden Sonde handelte es sich um ein 949 bp großes *NdeI-NdeI*-Fragment aus dem Vektor *pmCx36genom.*, als interne Sonde wurde die CFP-kodierende Region aus dem Vektor *pMJ-CFP* verwendet, ein 724 bp großes *NcoI-NotI*-Fragment.

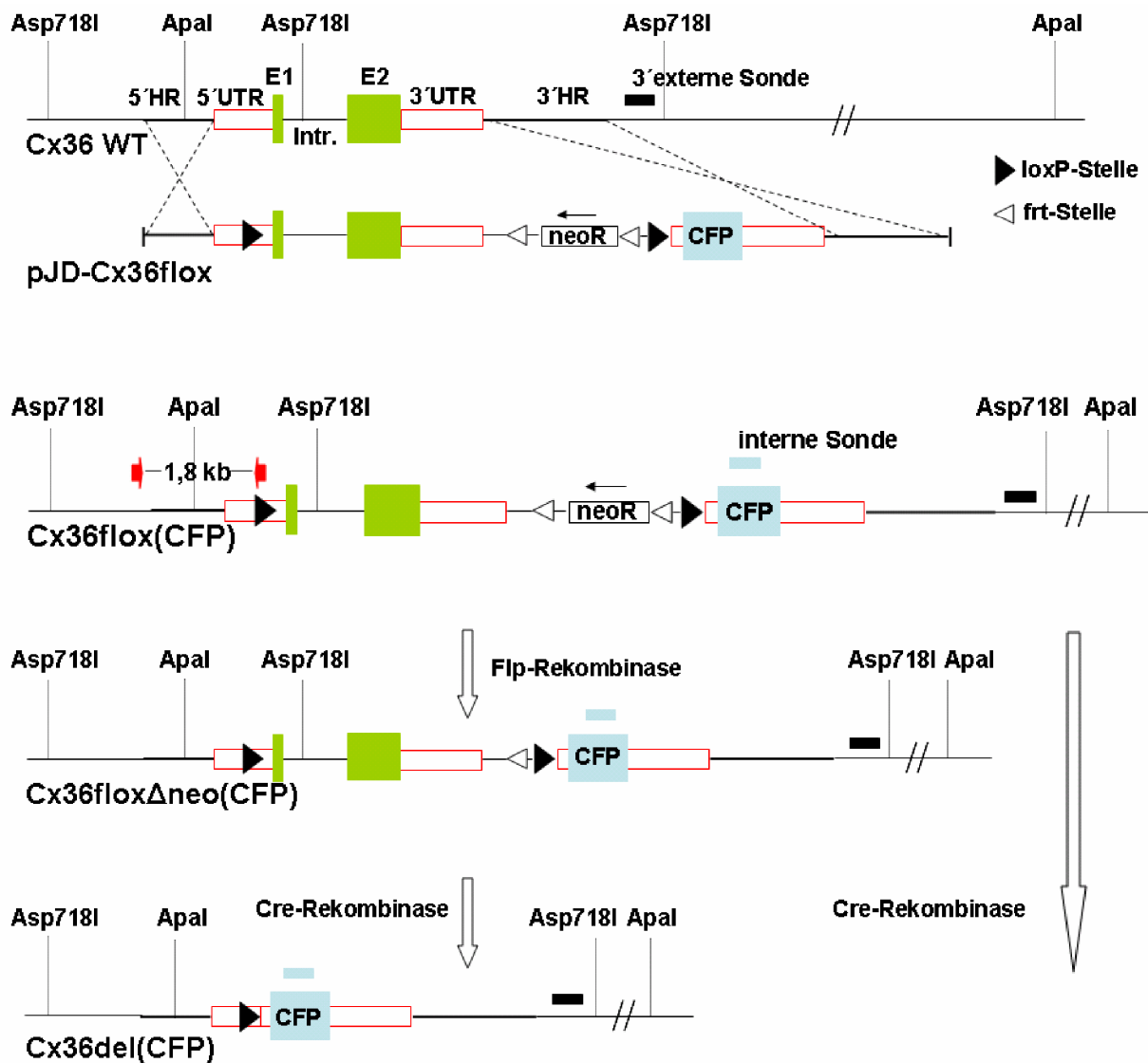


Abb. 4.4: Homologe Rekombination des Austauschvektors *pJD-Cx36floxed* in den *Cx36*-Wildtyploкус sowie Übersicht über die resultierenden Genotypen nach der homologen Rekombination und nach Flp- und Cre-vermittelter Deletion. Angegeben sind die in den Southern Blot-Analysen eingesetzten Restriktionsendonukleasen *Apal* und *Asp718I* sowie die verwendete 3'-externe bzw. interne Sonde. Die Größen der mit den Sonden nachzuweisenden Fragmente sind Abb. 4.5 zu entnehmen. Die Oligonukleotid-Startermoleküle für die ES-Zell-PCR (Kap. 4.1.1.2) sind im *Cx36floxed(CFP)*-Lokus rot markiert. Sie ergeben bei homolog rekombinierten Klonen ein 1,8 kb-Amplikon. 5' und 3'HR: 5'-und 3'-homologe Region; 5' und 3'UTR: 5'-und 3'-untranslatierter Bereich; E1 und E2: *Cx36*-Exon 1 und 2; Intr.: Intron; neoR: Neomycin-Resistenz-Kassette; CFP: kodierende Region für das blau fluoreszierende Protein (CFP).

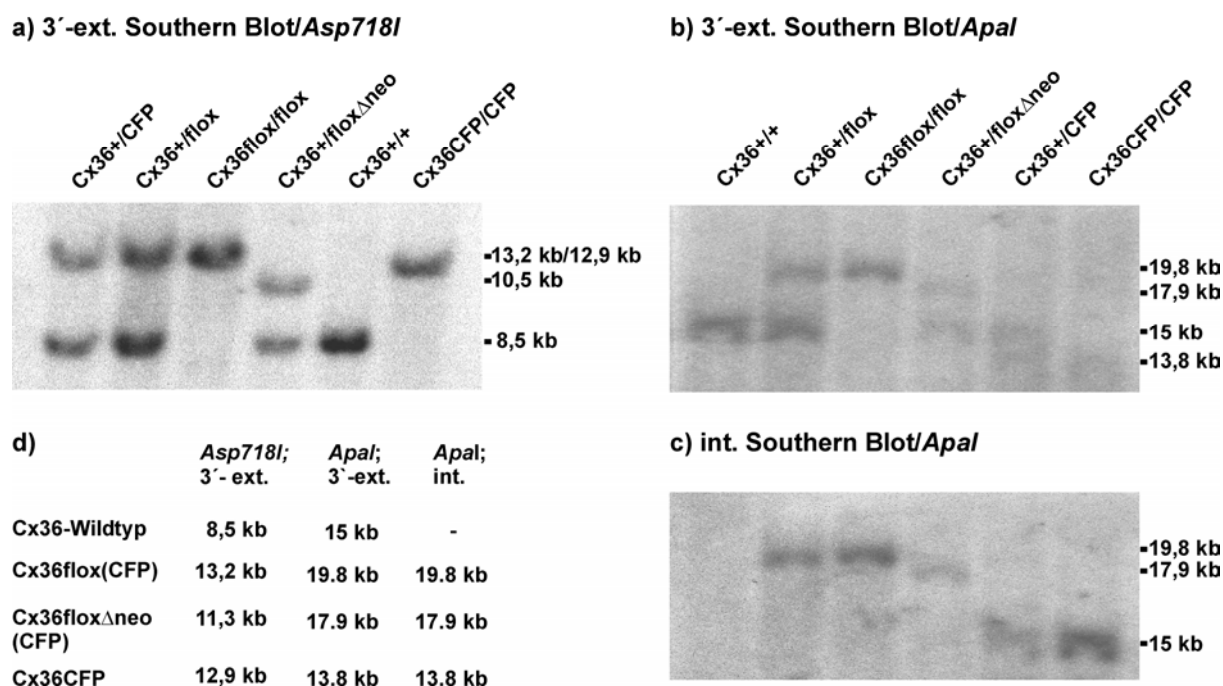


Abb. 4.5: Southern Blot-Analyse zur Überprüfung der verschiedenen Genotypen der *Cx36flox(CFP)*-Maus. Da bei einer Southern Blot-Analyse mit *Asp718I*-gespaltener DNS (a) keine Unterscheidung zwischen dem *flox(CFP)*- und dem *CFP*-Allel möglich war, wurde zusätzlich eine Southern Blot-Analyse mit *ApaI*-gespaltener DNS (b) durchgeführt. Die verwendete 3'-externe Sonde ist in beiden Fällen identisch. c) Southern Blot-Analyse mit *ApaI*-gespaltener DNS und einer internen *CFP*-Sonde. d) Zusammenstellung der theoretisch zu erwartenden Fragmentgrößen. Die Größen der erhaltenen Restriktionsfragmente bestätigen die gewünschten Genotypen. Die Bezeichnungen der Allele *flox(CFP)* und *floxΔneo(CFP)* wurden in dieser Abbildung zu *flox* und *floxΔneo* verkürzt.

Die Größe der Restriktionsfragmente, die die 3'-externe Sonde nach Spaltung der genomischen DNS mit der Restriktionsendonuklease *Asp718I* markiert, stimmt mit den theoretisch ermittelten Werten für die verschiedenen *Cx36*-Genotypen überein (Abb. 4.5a und d). Die Fragmente, die sich für das *Cx36flox(CFP)*- und das *Cx36CFP*-Allel ergeben, lassen sich in ihrer Größe jedoch nicht voneinander unterscheiden. In einem Folgeexperiment wurde die DNS mit *ApaI* gespalten, aufgetrennt und mit der gleichen 3'-externen Sonde hybridisiert. Hierbei konnte zwischen dem *Cx36flox(CFP)*- und dem *Cx36CFP*-Allel unterschieden werden (Abb. 4.5b). Der Einsatz einer internen Sonde, die mit der kodierenden Region des *CFP*-Reportergens hybridisierte, bestätigte ebenfalls die genomische Rekombination durch die deleter-Flp- und die PGK-Cre-Rekombinasen (Abb. 14.5c).

4.1.4.2 *Cx36*-Transkriptionsanalyse von Gehirn-RNS

Zur Untersuchung der *Cx36*-Expression auf Transkriptionsebene wurde Gesamt-RNS aus den Gehirnen von Mäusen mit verschiedenen Genotypen isoliert (Kap. 3.1.3) und einer intronüberspannenden RT-PCR unterzogen (Kap. 3.1.7 und 3.1.8). Die Oligonukleotid-

Startermoleküle für die *RT-Cx36-PCR* hybridisierten dabei mit dem kodierenden Bereich von Cx36-Exon1 und -Exon 2 (Joachim Degen, Dissertation 2003) und führten zu einem

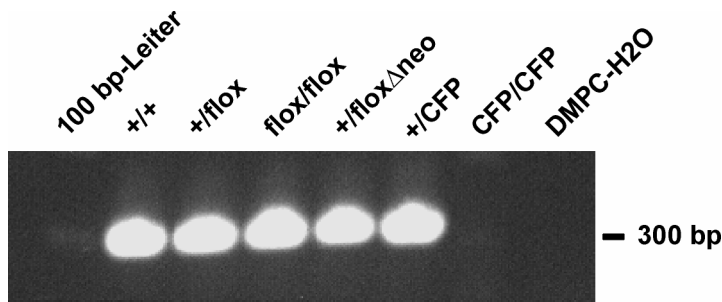


Abb. 4.6: Intronüberspannende RT-PCR zur Überprüfung der Cx36-Transkription. GehirncDNS wurde als Matrize verwendet. Ein Amplikon entsteht in allen Genotypen, in denen mindestens ein Wildtyp- oder ein gefloxtes Cx36-Allel vorliegt, nicht jedoch in homozygoten Cx36-defizienten Mäusen mit dem Genotyp Cx36^{CFP/CFP}. Die Bezeichnungen der Allele *flox(CFP)* und *floxΔneo(CFP)* wurden in dieser Abbildung zu *flox* und *floxΔneo* verkürzt.

Amplikon von 298 bp (Abb. 4.6). In Mäusen der Genotypen Cx36^{+/+}, Cx36^{+/flox(CFP)} und Cx36^{+/floxΔneo(CFP)} mit mindestens einem Wildtyp-Allel liegt Cx36-mRNS vor. Auch in homozygot geflochten Cx36^{flox(CFP)flox(CFP)}-Tieren wird Cx36 transkribiert. In der RT-PCR mit RNS aus homozygot Cx36-defizienten Mäusen des Genotyps Cx36^{CFP/CFP} entsteht erwartungsgemäss kein Amplikon, das auf eine Cx36-Expression hinweist.

4.1.4.3 Cx36-Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten

In der Cx36-Immunfluoreszenzanalyse (Kap. 3.6.2.2) wurde überprüft, ob Cx36 in homozygot geflochten Mäusen als Protein ausgeprägt wird. Die Analyse wurde mit Retina-Gefrierschnitten durchgeführt, da hier die Ausprägung von Cx36 besonders hoch und gut sichtbar ist (Teubner et al., 2000). Als Negativkontrolle dienten homozygote Cx36-Defekt-Mäuse mit dem Genotyp Cx36^{CFP/CFP}. Parallel zu den bisher verwendeten Genotypen wurden Retina-Gefrierschnitte aus Mäusen des Genotyps Cx36^{lacZ/flox}:Nestin-Cre der Cx36-Immunfluoreszenz unterzogen (Abb. 4.7).

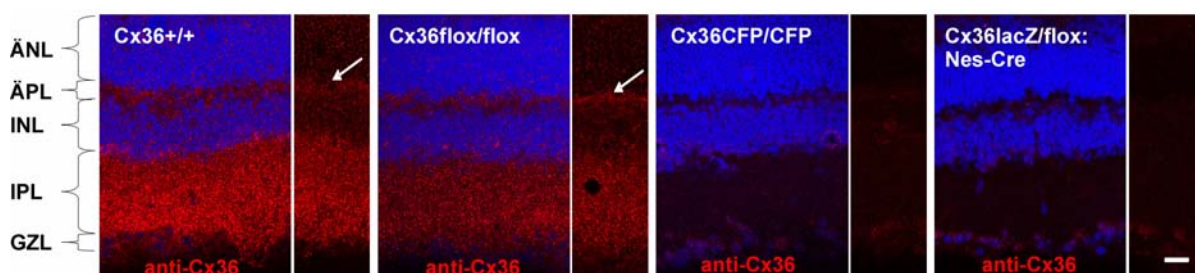


Abb. 4.7: Cx36-Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten verschiedener Genotypen. Gezeigt sind Aufnahmen mit und ohne Propidiumjodid-Kernfärbung (blau). In der Retina von Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}-Mäusen sind wie in der Retina von Cx36^{+/+}-Mäusen Cx36-Immunfluoreszenzsignale (rot) zu erkennen, insbesondere in der IPL. Keine Signale für Cx36 treten in der Retina von Cx36^{CFP/CFP}- und Cx36^{lacZ/flox(CFP)}:Nestin-Cre-Mäusen auf. Die Bezeichnungen des Allels *flox(CFP)* und des Transgens Nestin wurden in dieser Abbildung zu *flox* und *Nes-Cre* verkürzt. Maßstabsbalken: 50 µm.

Cx36 wird in homozygot geflochten Mäusen als Protein gebildet. Die Immunfluoreszenzsignale erscheinen allerdings weniger intensiv und weniger stark verteilt als in Cx36^{+/+}-Wildtypmäusen. In homozygot Cx36-deletierten Tieren des Genotyps Cx36^{CFP/CFP} liegen erwartungsgemäß keine Signale vor, die eine Cx36-Expression anzeigen. Gleiches gilt für Mäuse mit dem Genotyp Cx36^{lacZ/flox(CFP)}:Nestin-Cre.

4.1.4.4 Cx36-Immunpräzitationsanalyse von Retinalysaten

Um die Expressionsstärke von Cx36 von dem geflochtenen Allel mit der des Wildtyp-Allels vergleichen zu können, wurde eine Cx36-Immunpräzitation mit Retinalysaten und anschließender Immunoblot-Analyse durchgeführt (Kap. 3.5.5 und Kap. 3.5.8). Die Immunpräzitation war erforderlich, da der verwendete Cx36-Antikörper sonst zu falsch-positiven Signalen im Immunoblot führen würde (Dr. Stephanie Urschel, persönl. Mitteilung). Zusätzlich wurden Retinalysate von Mäusen der Genotypen Cx36^{+/CFP} bzw. Cx36^{CFP/CFP} sowie Cx36^{lacZ/flox(CFP)}:Nestin-Cre bzw. Cx36^{lacZ/flox(CFP)} untersucht (Abb. 4.8). Die Bandenstärke für Cx36 aus Retinalysaten von Cx36^{+/+}- und Cx36^{+/flox(CFP)}-Mäusen ist nahezu

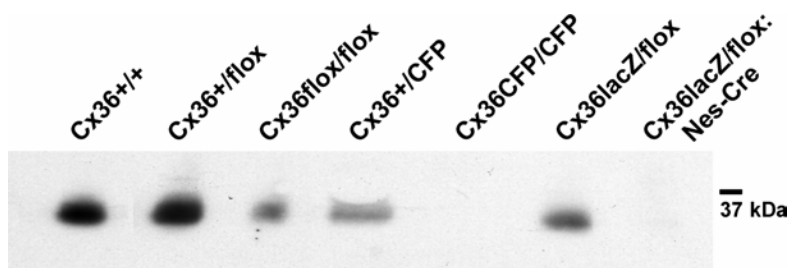


Abb. 4.8: Cx36-Immunpräzitationsanalyse von Retinalysaten verschiedener Genotypen. Das Signal für Cx36 ist am stärksten in den Genotypen Cx36^{+/+} und Cx36^{+/flox(CFP)}. In Retinalysaten der Genotypen Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}, Cx36^{+/CFP} und Cx36^{lacZ/flox(CFP)} ist es um ca. 50 % in seiner Signalstärke reduziert. In Retinalysaten der Genotypen Cx36^{CFP/CFP} und Cx36^{lacZ/flox(CFP)}:Nestin-Cre tritt kein Cx36-Signal auf. Die Bezeichnungen des Allels *flox(CFP)* und des Transgens Nestin-Cre wurden in dieser Abbildung zu *flox* und *Nes-Cre* verkürzt.

identisch. Kein Cx36-Signal ergibt sich für die Genotypen Cx36^{CFP/CFP} und Cx36^{lacZ/flox(CFP)}:Nestin-Cre. Die Signalintensität für Cx36 aus Retinalysaten von Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}-Mäusen ist in etwa halb so stark wie für Cx36^{+/+}-Mäuse und entspricht in etwa der des Genotyps Cx36^{+/CFP}.

4.1.4.5 CFP-Reporter-Gen-Transkriptionsanalyse von Gehirn-RNS

Neben einer qualitativen und quantitativen Expressionsanalyse von Cx36 wurde die Ausprägung des CFP-Reportergens analysiert. Dies geschah analog zu Cx36 zunächst auf Transkriptionsebene, indem mit Gesamt-RNS aus Gehirnen der verschiedenen Genotypen eine RT-PCR durchgeführt wurde (Abb. 4.9). Als PCR-Reaktion diente die *KW-Maus2*-PCR (Kap. 3.1.8) mit den Oligonukleotid-Startermolekülen *Cx36USP-1* und *CFP-DSP-2*, wobei *CFP-DSP-2* ähnlich wie *DSP-CFP-1* in der kodierenden Region des CFPs hybridisiert. *Cx36-USP1* und *CFP-DSP2* amplifizieren einen Bereich von 276 bp. Ein Amplikon ist bei den Genotypen Cx36^{+/CFP} und Cx36^{CFP/CFP} zu erkennen, die mindestens ein CFP-Allel besitzen. Es

weist die Existenz chimärer cDNS nach, bestehend aus dem 5'-UTR von Cx36 und der kodierenden Region von CFP. Dies deutet darauf hin, dass das CFP nach Deletion von Cx36 transkribiert wird. Die durchgeführte RT-PCR ist nicht intronüberspannend. Mithilfe einer Aktin-PCR (Kap. 3.1.8) wurde ausgeschlossen, dass eine Kontamination durch genomische DNS vorlag.

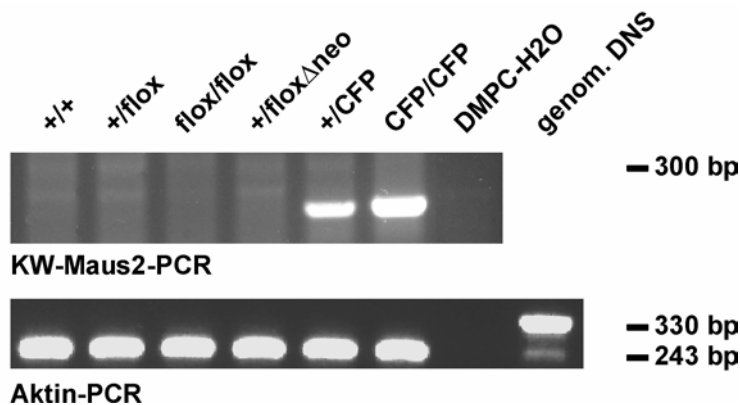


Abb. 4.9: KW-Maus2-PCR mit Gehirn-cDNS. Ein Amplikon des Überganges zwischen Cx36-5'-UTR und CFP tritt in den Genotypen $Cx36^{+/CFP}$ und $Cx36^{CFP/CFP}$ auf. Die Aktin-PCR zeigt, dass ausschließlich cDNS amplifiziert wurde. Die Bezeichnungen der Allele $flox(CFP)$ und $flox\Delta neo(CFP)$ wurden in dieser Abbildung zu $flox$ und $flox\Delta neo$ verkürzt.

4.1.4.6 CFP-Immunoblot-Analyse von Retinalysaten

Die Ausprägung des CFPs auf Proteinebene wurde in Retinalysaten der verschiedenen Genotypen mittels Immunoblot-Analyse untersucht (Kap. 3.5.8; Abb. 4.10). eGFP-

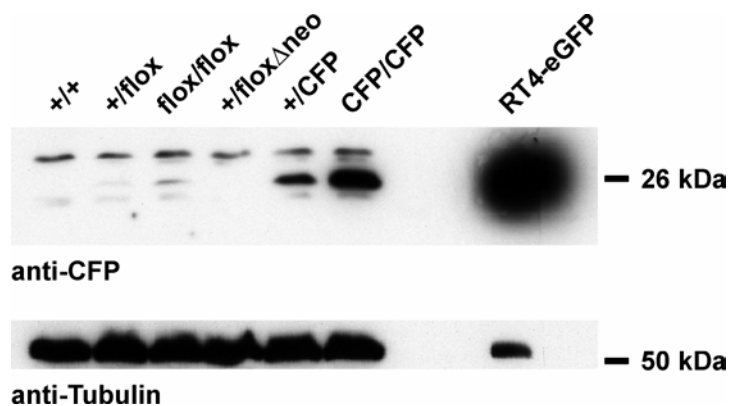


Abb. 4.10: CFP-Immunoblot mit Retinalysaten. Ein CFP-Signal bei 26 kDa tritt in den Lysaten der Genotypen $Cx36^{+/CFP}$ und $Cx36^{CFP/CFP}$ auf. Die Signalintensität korreliert mit der Anzahl der CFP-Allele pro Genotyp. In Lysaten der Genotypen $Cx36^{+/flox(CFP)}$ und $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}$ erscheint ein schwaches CFP-Signal, dessen Intensität von der Anzahl der $Cx36^{flox(CFP)}$ -Allele pro Genotyp abhängt. Im Lysat des Genotyps $Cx36^{+/flox\Delta neo(CFP)}$ ist kein Signal für CFP zu erkennen. Lysat von eGFP-ausprägenden RT4-Zellen dient als Positivkontrolle. Zum Mengenabgleich wurde mit der regenerierten Membran ein Tubulin-Immunoblot durchgeführt. Die Bezeichnungen der Allele $flox(CFP)$ und $flox\Delta neo(CFP)$ wurden in dieser Abbildung zu $flox$ und $flox\Delta neo$ verkürzt.

ausprägende RT4-Zellen dienen als Positivkontrolle für einen Nachweis des CFPs. Die verwendeten GFP-Antikörper erkennen beide Fluoreszenzproteine gleichermaßen, da sich eGFP und CFP nur in einigen wenigen Aminosäuren voneinander unterscheiden. Das Reporterprotein CFP wird in der Retina von Mäusen des Genotyps $Cx36^{+/CFP}$ und $Cx36^{CFP/CFP}$ ausgeprägt. Zwei deletierte Cx36-Allele führen zu einer stärkeren CFP-Expression als nur ein Allel. Zu erkennen ist auch eine schwache Bande für CFP im Retinalysat von Mäusen mit dem Genotyp $Cx36^{+/flox(CFP)}$ und $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}$, wobei

das Signal in homozygot geflochten Tieren stärker ausfällt, jedoch nicht die Intensität des Signals im Retinalysat der Genotypen $Cx36^{+/CFP}$ - und $Cx36^{CFP/CFP}$ aufweist. Kein Hinweis liegt auf eine CFP-Ausprägung in $Cx36^{+/flox\Delta neo(CFP)}$ -Mäusen vor.

4.1.4.7 Analyse der CFP-Fluoreszenz von vitalen Retinadickschnitten mittels konfokaler Laser Scan-Mikroskopie

Nach Cre-Rekombinase-vermittelter Deletion von Cx36 wird das Reportergen CFP unter Kontrolle des Cx36-Promotors ausgeprägt. Mittels konfokaler Laser Scan-Mikroskopie wurde an vitalen Retinadickschnitten (Kap. 3.6.1) untersucht, ob dessen Fluoreszenz durch Anregung mit geeigneter Wellenlänge dargestellt werden kann (Abb. 4.11.).

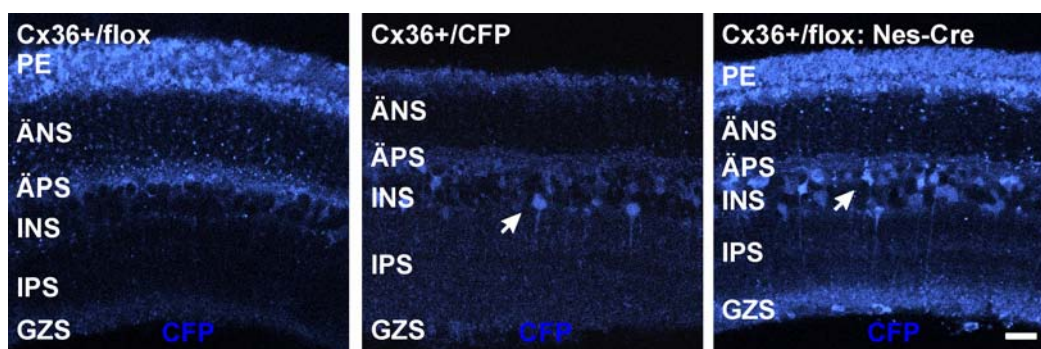


Abb. 4.11: Darstellung der CFP-Fluoreszenz von vitalen Retinadickschnitten. Mittels konfokaler Laser Scan-Mikroskopie sind cyan-fluoreszierende Zellen in der INS der Retina von Mäusen mit den Genotypen $Cx36^{+/CFP}$ und $Cx36^{+/flox(CFP)}:Nestin-Cre$ erkennbar. Als Negativkontrolle dient der Genotyp $Cx36^{+/flox(CFP)}$. Das Pigmentepithel, präparationsbedingt fehlend in $Cx36^{+/CFP}$, hat eine starke Eigenfluoreszenz. Die Bezeichnung des Allels *flox(CFP)* und des Transgens Nestin-Cre wurden in dieser Abbildung zu *flox* und Nes-Cre verkürzt. Maßstabsbalken: 20 μ m.

In der Retina von $Cx36^{+/CFP}$ -Mäusen sind cyan-fluoreszierende Zellen zu erkennen, die in $Cx36^{+/flox(CFP)}$ -Mäusen nicht auftreten. Dabei füllt das CFP jeweils die gesamte Zelle aus, so dass teilweise dadurch die Axone der Nervenzellen verfolgt werden können. Auch durch Nestin-Cre-vermittelte zelltypspezifische Deletion von Cx36 kommt es zu einer Fluoreszenz von Zellen in der Retina. Die fluoreszierenden Zellen liegen sowohl in $Cx36^{+/CFP}$ - als auch in $Cx36^{+/flox(CFP)}:Nestin-Cre$ -Mäusen in der Inneren Nukleären Schicht (INS). Anhand ihrer Lokalisation und Morphologie werden sie als Bipolar- und Amakrinzellen identifiziert (Feigenspan et al., 2001 und 2004). Keine spezifisch cyan-fluoreszierenden Zellen sind in der Äußeren Nukleären Schicht und der Ganglienzellschicht (ÄNS und GZS) zu finden. Das Pigmentepithel weist in allen drei Genotypen eine starke Eigenfluoreszenz auf.

4.1.4.8 CFP-Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten

Um einen sensitiveren Nachweis des Reporterproteins zu ermöglichen, wurde CFP mittels Immunfluoreszenzanalysen in der Retina nachgewiesen (Kap. 3.6.2.1, Abb. 4.12). Das CFP-Expressionsmuster wurde mit der lacZ-Färbung (Kap. 3.6.3) in der Retina von $Cx36^{+/lacZ}$ - und $Cx36^{+/flox(lacZ)}$:Nestin-Cre-Mäusen nach ubiquitärer bzw. zelltypspezifischer Deletion der geflochten Region verglichen.

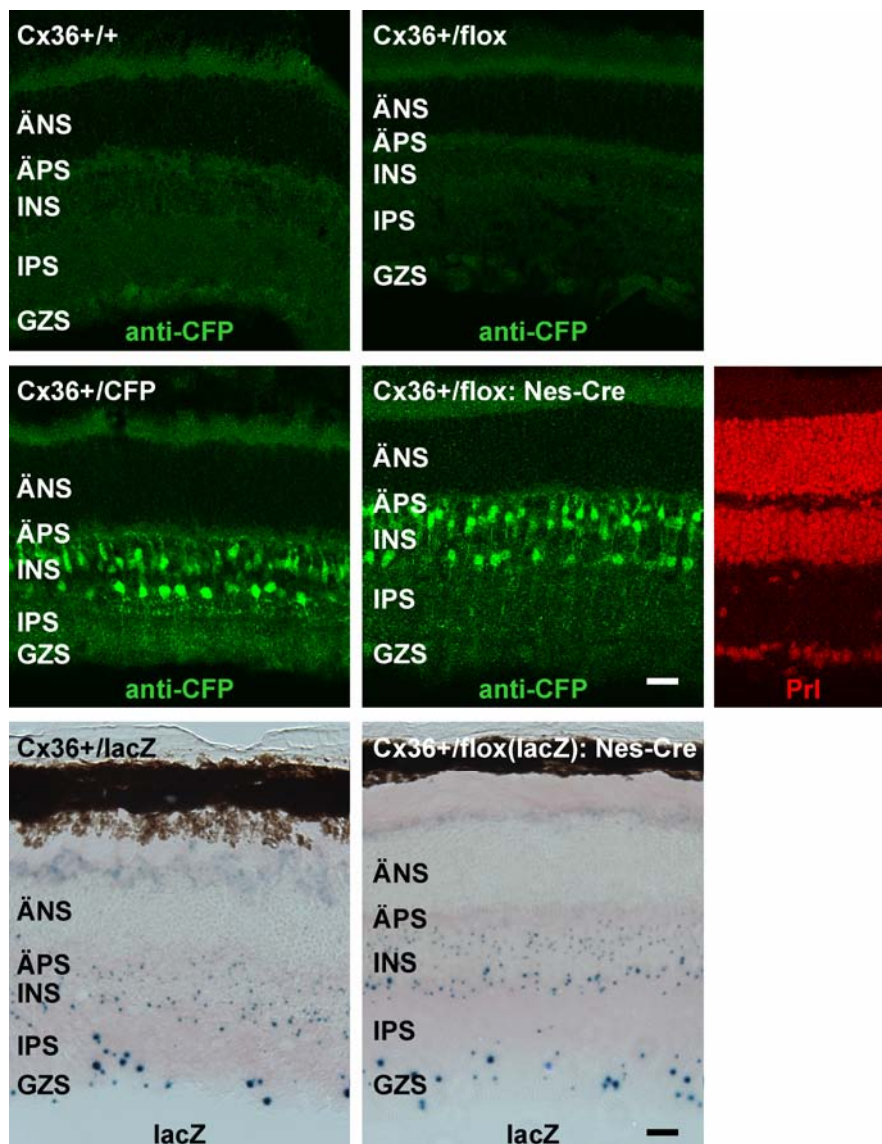


Abb. 4.12: CFP-Immunfluoreszenzanalyse bzw. lacZ-Färbung mit Retina-Gefrierschnitten verschiedener Genotypen. CFP-positive Zellen (grün) befinden sich in der INS der Retina von den Genotypen $Cx36^{+/CFP}$ und $Cx36^{+/flox(CFP)}$:Nestin-Cre. Die Genotypen $Cx36^{+/+}$ und $Cx36^{+/flox(CFP)}$ dienen als Negativkontrolle. Zur besseren Orientierung ist eine Propidiumjodid (PrI)-Färbung (rot) der Zellkerne der Retina beigegefügt. In den lacZ-gefärbten Retina-Gefrierschnitten der Genotypen $Cx36^{+/lacZ}$ und $Cx36^{+/flox(lacZ)}$:Nestin-Cre sind neben den lacZ-Signalen in der INS auch lacZ-positive Zellen am äußeren Rand der ÄNS und in der GZS zu erkennen. Die Bezeichnungen des Allels *flox(CFP)* und des Transgens Nestin-Cre wurden in dieser Abbildung zu *flox* und *Nes-Cre* verkürzt. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Bei der CFP-Immunfluoreszenzanalyse werden CFP-positive Zellen in der Retina von $Cx36^{+/CFP}$ - bzw. $Cx36^{+/flox(CFP)}$:Nestin-Cre-Mäusen deutlich. Wie bei der CFP-Fluoreszenz-Analyse (Abb. 4.11) befinden sich diese Zellen ausschließlich in der INS. Bei den lacZ-gefärbten Retina-Gefrierschnitten treten in den Genotypen $Cx36^{+/lacZ}$ und $Cx36^{+/flox(lacZ)}$:Nestin-Cre zusätzlich lacZ-positive Zellen in der GZS auf. Die lacZ-Färbung der Zapfen erscheint als schwach bläuliches Band am oberen Rand der ÄNS. Ein Propidiumjodid-gefärbter Retina-Gefrierschnitt demonstriert, dass die Ganglienzellschicht in den Schnitten für die CFP-Immunfluoreszenzanalyse erhalten blieb.

4.1.4.9 Funktionelle Analyse der *Cx36flox(CFP)*-Maus: Glyzin-Nachweis in der Retina

Bisher wurde neben dem genomischen Aufbau das Ausprägungsverhalten des *Cx36*-Lokus in den verschiedenen Genotypen der *Cx36flox(CFP)*-Mausmutante untersucht. Eine funktionelle Analyse ergänzte schließlich diese Charakterisierung. Heterologe heterotypische *Cx36/Cx45*-Gap Junction-Kanäle in der Retina sind dafür verantwortlich, dass die Aminosäure Glyzin von den AII-Amakrinzellen in ON-Zapfen-Bipolarzellen übertritt (Maxeiner et al., 2005; Dedek et al., 2006). Es liegt eine Neurotransmitter-Kopplung vor. Ohne diese Kopplung können ON-Zapfen-Bipolarzellen kein Glyzin aufnehmen (Vaney et al., 1998). Glyzin-positive ON-Zapfen-Bipolarzellen sind in der durchgeführten Analyse somit ein Hinweis darauf, dass *Cx36* funktionelle Gap Junction-Kanäle zusammen mit *Cx45* ausbildet. Glyzin-negative ON-Zapfen-Bipolarzellen deuten hingegen auf eine gestörte Neurotransmitter-Kopplung hin. Mittels Immunfluoreszenzanalyse wurde der Glyzin-Gehalt der ON-Zapfen-Bipolarzellen in der Retina der verschiedenen Genotypen der *Cx36flox(CFP)*-Maus überprüft (Kap. 3.2.6.3; Abb. 4.13).

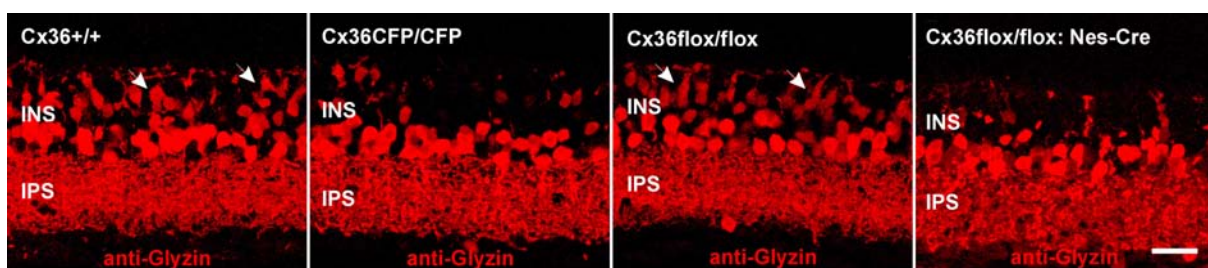


Abb. 4.13: Glyzin-Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten. Die Glyzin-positiven Zellen (rot), die sich in der äußeren Hälfte der INS der Wildtyp-Retina und der Retina des Genotyps $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}$ befinden, sind in $Cx36^{CFP/CFP}$ -Mäusen und nach Nestin-Cre-vermittelter Deletion in $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}$:Nestin-Cre-Mäusen in ihrer Anzahl deutlich reduziert. Maßstabsbalken: 20 μ m. (Bilder zur Verfügung gestellt von Prof. Ulrike Janssen-Bienhold, Oldenburg)

Wie in der Wildtyp-Retina sind die in der äußeren Hälfte der INS lokalisierten ON-Zapfen-Bipolarzellen in der Retina von $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}$ -Mäusen positiv für Glyzin. Die Immunfluoreszenzsignale sind bei Tieren mit geflochtenen *Cx36*-Allelen jedoch weniger

intensiv. Im äußeren Bereich der INS in der Retina von homozygot Cx36-defizienten $Cx36^{CFP/CFP}$ -Mäusen und zelltypspezifisch Cx36-deletierten $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}:Nestin-Cre$ -Mäusen sind nur vereinzelt Glyzin-positive Zellen zu finden. Vermutlich handelt es sich dabei um delokalisierte AII-Amakrinzellen.

4.1.5 CFP-Immunhistochemie-Analyse mit Gewebedickschnitten verschiedener Gehirnaareale von Mäusen mit ubiquitär deletiertem Cx36

Die CFP-Ausprägung von $Cx36^{+/CFP}$ - bzw. $Cx36^{CFP/CFP}$ -Mäusen mit ubiquitär deletiertem Cx36 wurde mittels Immunhistochemie in verschiedenen Gehirnbereichen analysiert (Abb. 4.14), in denen in der Literatur von einer Cx36- bzw. Cx36-Reporter-gen-Expression berichtet wurde (Degen et al., 2004).

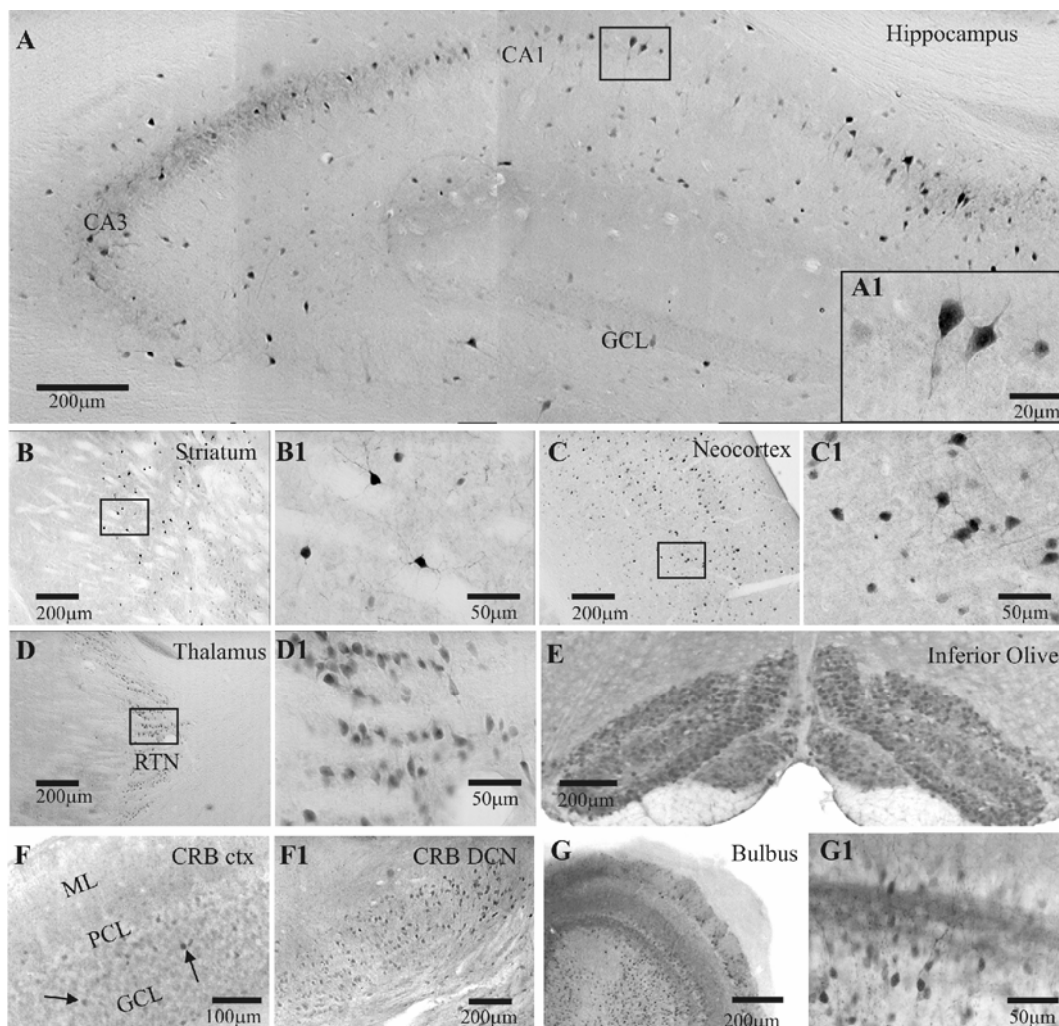


Abb. 4.14: CFP-Immunhistochemie in verschiedenen Regionen des Gehirns. Analysiert wurden Gehirne von Mäusen der Genotypen $Cx36^{+/CFP}$ und $Cx36^{CFP/CFP}$. Gezeigt sind CFP-positive Neurone im A) Hippocampus, B) Striatum, C) Neocortex, D) im retikulären thalamischen Nucleus (RTN), E) in der inferioren Olive sowie F1) in den Kleinhirnkernen (*deep cerebellar nuclei*, DCN). F) CFP-positive Neurone sind in der Purkinjezellschicht (*Purkinje cell layer*, PCL) und in der Körnerzellschicht (*granular cell layer*, GCL) des cerebellaren Cortex lokalisiert, nicht aber in der Molekularschicht

(*molecular layer*, ML). G) und G1) Im *Bulbus olfactorius* befinden sich CFP-positive Neurone ebenfalls in verschiedenen Schichten. (Bilder zur Verfügung gestellt von Prof. James Deuchars, Leeds, UK)

CFP-positive Neurone wurden im *Bulbus olfactorius*, Hippocampus, Neocortex, Striatum, Thalamus, Kleinhirn und in der inferioren Olive gefunden.

Die Charakterisierung der *Cx36flox(CFP)*-Maus zeigt, dass mit dieser Mutante eine Deletion von Cx36 erreicht werden kann, die durch die Ausprägung des Reporterproteins CFP angezeigt wird.

4.2 Konditionale Deletion von Cx36: Verpaarung von *Cx36flox(CFP)*-Mäusen mit spezifischen Cre-transgenen Mäusen

Der Verlust von Cx36 in konventionell Cx36-defizienten Mäusen führt zu einem relativ milden Phänotyp (Güldenagel et al., 2001). Aus dieser Tatsache wurde die Hypothese abgeleitet, dass die Plastizität des Zentralen Nervensystems im sich entwickelnden Tier der Ausprägung eines auffälligeren Phänotyps entgegenwirkt. Eine grundlegende Überlegung, die zu der Erzeugung der konditional Cx36-defizienten Mausmutante führte, bestand demnach in der Annahme, dass eine Deletion von Cx36 in Neuronen des adulten Tieres einen schwerwiegenderen Effekt hat, da mögliche während der Embryonalentwicklung auftretende Kompensationsmechanismen fehlen.

4.2.1 Induktion der Cx36-Deletion in Neuronen: Verpaarung von *Cx36flox(CFP)*-Mäusen mit PrP-CreER^T-transgenen Mäusen

Um eine Deletion von Cx36 in Neuronen von adulten Mäusen zu induzieren, wurden *Cx36flox(CFP)*-Mäuse mit PrP-CreER^T-Mäusen verpaart. PrP-CreER^T-transgene Mäuse exprimieren das induzierbare Fusionsprotein CreER^T (Kap. 1.10.1) unter der Kontrolle des **Prion-Protein-Promotors** in Neuronen verschiedener Bereiche des ZNS (Weber et al., 2001). Es lagen zwei Linien, Linie 28.4 und 28.6, von PrP-CreER^T-Mäusen vor, die durch Vorkerninjektion des gleichen Vektorkonstruktes entstanden sind. Laut Literatur zeigen sie ein leicht voneinander abweichendes CreER^T-Aktivitätsmuster. Nach Verpaarung mit ROSA26-Reportermäusen (Soriano, 1999) und Tamoxifen-vermittelter Induktion adulter Nachkommen führt die Linie 28.4 zu lacZ-positiven Neuronen im *Bulbus olfactorius*, Cortex und in der Retina. Mit der Linie 28.6 sind lacZ-Signale vor allem in Neuronen des Kleinhirns zu verzeichnen. Durch Kreuzung von *Cx36flox(CFP)*-Mäusen mit PrP-CreER^T-Mäusen und Tamoxifen-Applikation sollte die Ausprägung des Cx36-Proteins in adulten Tieren unterbunden werden, sofern die PrP-CreER^T-Rekombinase in denselben Zellen aktiv ist, in denen Cx36 exprimiert wird. In den im Folgenden beschriebenen Experimenten an der Retina führten beide Linien zu ähnlichen Ergebnissen. Es werden daher nur Daten von Mäusen der PrP-CreER^T-Linie 28.4 (verkürzt: PrP-CreER^T) vorgestellt.

4.2.1.1 Reporter-Expressionsanalyse nach Tamoxifen-vermittelter Induktion von $Cx36^{+/flox(lacZ)}$: und $Cx36^{+/flox(CFP)}$:PrP-CreE^{RT}-Mäusen in der Retina

Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit die $Cx36flox(CFP)$ -Mausmutante noch nicht existierte, wurde die Eignung der PrP-CreER^T-Mauslinie untersucht, indem PrP-CreER^T-transgene Mäuse mit Mäusen des Genotyps $Cx36^{flox(lacZ)/flox(lacZ)}$ verpaart wurden. Wird den $Cx36^{+/flox(lacZ)}$:PrP-CreER^T-Nachkommen dieser Verpaarung Tamoxifen appliziert (Kap. 3.7), zeigen die lacZ-Signale an, in welchen Zellen die Aktivität der PrP-CreER^T-Rekombinase mit der Expression von Cx36 zusammenfällt. In diesen Zellen wird die von loxP-Erkennungssequenzen flankierte Region deletiert und das lacZ-Reporter gen unter der Kontrolle des Cx36-Promotors ausgeprägt. Als die $Cx36flox(CFP)$ -Mausmutante charakterisiert war, wurde auch sie mit PrP-CreER^T-Mäusen verpaart und nach Tamoxifen-vermittelter Induktion immunhistochemisch auf eine CFP-Ausprägung untersucht. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Analyse mit Retinae von $Cx36^{+/flox(lacZ)}$:PrP-CreER^T- und $Cx36^{+/flox(CFP)}$:PrP-CreER^T-Mäusen zusammengestellt (Abb. 4.15).

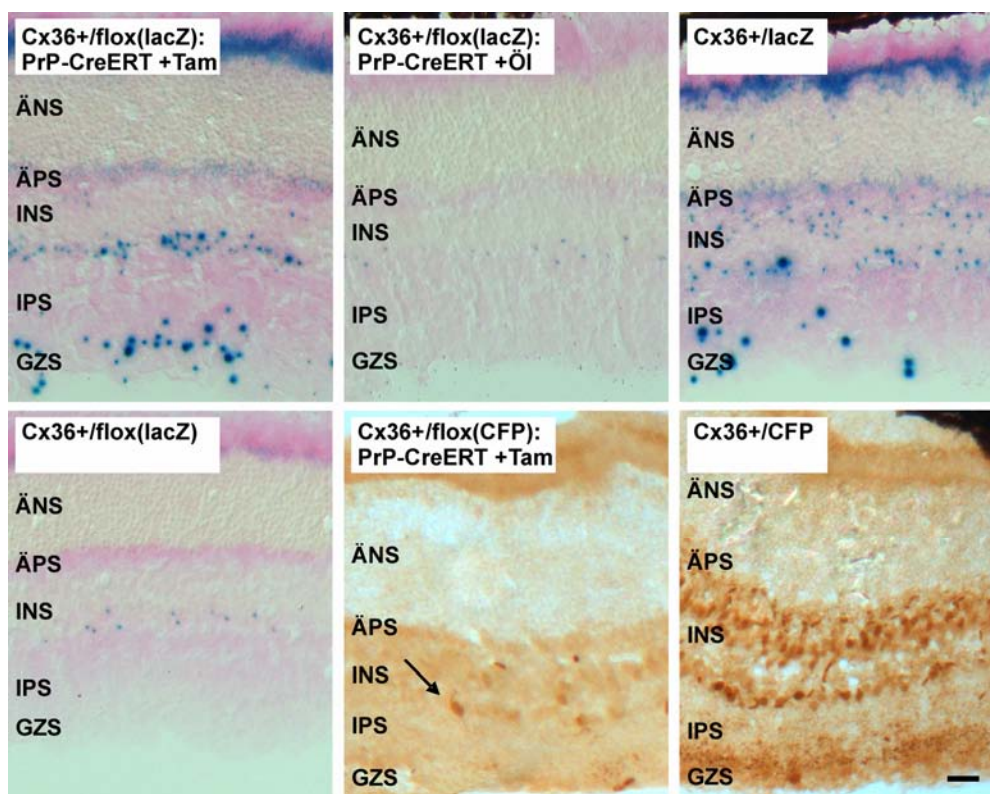


Abb. 4.15: Tamoxifen-induzierte Deletion von Cx36 in der Retina. Die lacZ-Signale zeigen an, dass es durch Induktion mit Tamoxifen in der Retina von $Cx36^{+/flox(lacZ)}$:PrP-CreERT-Mäusen zu einer Deletion in nahezu allen Cx36-exprimierenden Zellen kommt (vgl. $Cx36^{+/lacZ}$). Öl-applizierte $Cx36^{+/flox(lacZ)}$:PrP-CreERT-Mäuse weisen keine lacZ-positiven Zellen über dem Hintergrund auf (vgl. $Cx36^{+/flox(lacZ)}$). In der Retina von induzierten $Cx36^{+/flox(CFP)}$:PrP-CreERT-Mäusen sind kaum CFP-positive Zellen (Pfeil) zu erkennen, die auf eine Deletion von Cx36 hindeuten. Der Nachweis von CFP erfolgte immunhistochemisch (Kap. 3.6.2.4). +Öl: Öl-appliziert, +Tam: induziert mit Tamoxifen. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Eine Aktivierung der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen führt in $Cx36^{+/flox(lacZ)}:PrP-CreER^T$ -Mäusen zu lacZ-positiven Zellen im äußeren Bereich der Äußeren Nukleären Schicht (ÄNS), in der Inneren Nukleären Schicht (INS) und der Ganglienzellschicht (GZS). Dies entspricht nahezu dem lacZ-Expressionsmuster in $Cx36^{+/lacZ}$ -Mäusen nach einer ubiquitären Deletion der geflochtenen Region. Eine Ausnahme bildet die äußere Hälfte der INS, in der in induzierten $Cx36^{+/flox(lacZ)}:PrP-CreER^T$ -Mäusen weniger lacZ-Signale zu finden sind. Somit kommt es zu einer PrP-CreER^T-vermittelten Deletion in nahezu allen Cx36-ausprägenden retinalen Neuronen. Die CreER^T-Rekombinase zeigt keine Hintergrundaktivität, da bis auf einige schwach lacZ-positive Zellen im unteren Teil der INS bei Applikation von Öl (Kap. 3.7) in der Retina von $Cx36^{+/flox(lacZ)}:PrP-CreER^T$ -Mäusen keine lacZ-Färbung auftritt. Diese lacZ-Signale in der INS erscheinen auch in Mäusen des Genotyps $Cx36^{+/flox(lacZ)}$ ohne Cre-Transgen und sind charakteristisch für den lacZ-Hintergrund des $Cx36flox(lacZ)$ -Allels in der Retina (vgl. Joachim Degen, Dissertation 2003). Die Retina Tamoxifen-induzierter $Cx36^{+/flox(CFP)}:PrP-CreER^T$ -Mäuse weist nach immunhistochemischer Analyse sehr vereinzelt CFP-positive Zellen in der INS auf. Als Vergleich dient die Retina einer $Cx36^{+/CFP}$ -Maus, in der nach ubiquitärer Deletion der Cx36-kodierenden Region zahlreiche CFP-positive Zellen in der INS zu finden sind.

4.2.1.2 PCR-Analyse mit Retina-DNS nach Tamoxifen-vermittelter Induktion von $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}:PrP-CreERT$ -Mäusen

Um zu untersuchen, ob die PrP-CreER^T-Rekombinase in $Cx36^{+/flox(CFP)}:PrP-CreER^T$ -Mäusen aktiv ist, wurde DNS aus den Retinae induzierter $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}:PrP-CreER^T$ -Mäuse isoliert und in einer *KW-Maus*-PCR (Kap. 3.1.7) auf das Auftreten einer Bande für das *CFP*-Allel analysiert (Abb. 4.16; Methode nach Feil et al., 1996).

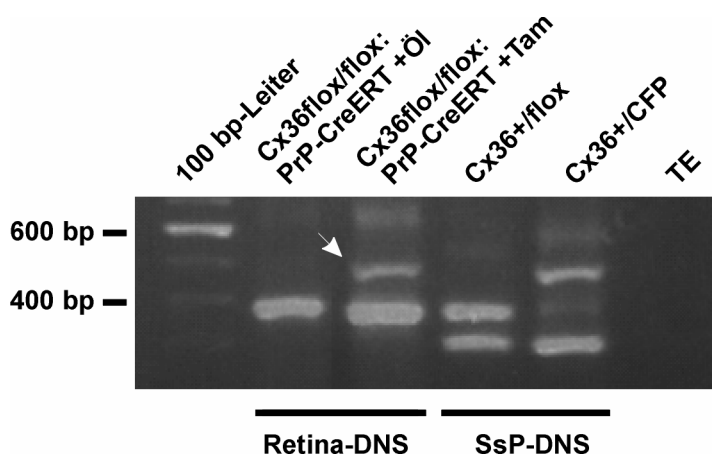


Abb. 4.16: *KW-Maus*-PCR mit Retina-DNS. Nach Tamoxifen-vermittelter Induktion erscheint in der Spur des Genotyps $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}:PrP-CreERT$ eine Bande für das *CFP*-Allel bei knapp 500 bp (Pfeil). Als PCR-Positivkontrolle dient DNS aus Schwanzspitzenbiopsien von Mäusen mit dem Genotyp $Cx36^{+/flox(CFP)}$ und $Cx36^{+/CFP}$. Die Banden bei knapp 300 und 400 bp ergeben sich aus dem *Cx36*-Wildtyp- bzw. dem *Cx36flox(CFP)*-Allel. Die Bezeichnung *flox(CFP)* wurde in dieser Abbildung zu *flox* verkürzt. +Öl: Öl-appliziert, +Tam: induziert mit Tamoxifen.

In der Retina von Tamoxifen-induzierten, nicht aber von Öl-applizierten Mäusen des Genotyps $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)};PrP-CreER^T$ kommt es zu einer Deletion von Cx36.

4.2.1.3 Cx36-Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten nach Tamoxifen-vermittelter Induktion von $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)};PrP-CreER^T$ -Mäusen

Ob die mittels PCR nachgewiesene Deletion von Cx36 in der Retina zu einer Reduktion der Cx36-Expression führt, wurde anhand von Cx36-Immunfluoreszenzanalysen von Retina-Gefrierschnitten Tamoxifen-induzierter $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)};PrP-CreER^T$ -Mäuse ermittelt (Kap. 3.6.2.2; Abb. 4.17).

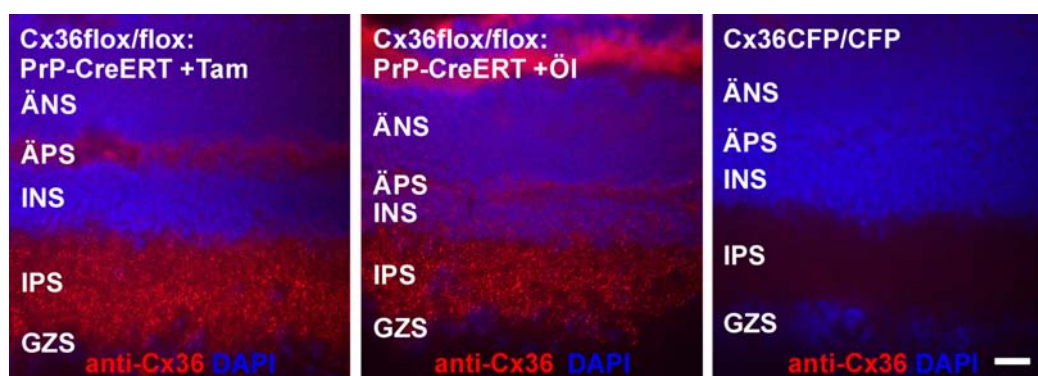


Abb. 4.17: Cx36-Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten. Nach Tamoxifen-vermittelter Induktion (+Tam) wird Cx36-Protein (rot) in der Retina von Mäusen des Genotyps $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)};PrP-CreER^T$ nachgewiesen. Es besteht kein Unterschied zu nicht-induzierten (+Öl) $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)};PrP-CreER^T$ -Mäusen. Der Genotyp $Cx36^{CFP/CFP}$ dient als Negativkontrolle der Cx36-Immunfluoreszenzanalyse. Die Bezeichnung *flox(CFP)* wurde in dieser Abbildung zu *flox* verkürzt. Die Dokumentation der Bilder erfolgte am Axiophot. DAPI-Zellkernfärbung: blau. Maßstabsbalken: 20 μ m.

In der Retina von Tamoxifen-induzierten $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)};PrP-CreER^T$ -Mäusen sind noch Cx36-Immunfluoreszenzsignale sichtbar. Bei einem Vergleich mit der Retina von Öl-applizierten $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)};PrP-CreER^T$ -Mäusen ist kein Unterschied in der Cx36-Expression zu erkennen. Somit erzeugt das $PrP-CreER^T$ -Transgen in Tamoxifen-induzierten $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}$ -Mäusen keine signifikante Reduktion der Cx36-Expression.

4.2.2 Zelltypspezifische Cx36-Deletion: Verpaarung von $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}$ -Mäusen mit Parvalbumin-Cre-transgenen Mäusen

Durch Verpaarung von $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}$ -Mäusen mit Parvalbumin (Parv)-Cre-transgenen Mäusen sollte eine Deletion von Cx36 ausschließlich in Parvalbumin-positiven Neuronen erzielt werden (Prof. Hannah Monyer, persönl. Mitteilung). Der Promotor des kalziumbindenden Proteins Parvalbumin ist im ZNS beispielsweise in Subpopulationen GABAerger Interneurone aktiv (de Lecea et al., 1995). Analog zu dem Vorgehen mit $PrP-CreER^T$ -

transgenen Mäusen wurden $Cx36^{+/flox(CFP)}$:Parv-Cre-Tiere in der Retina untersucht. Eine gezielte Deletion von Cx36 ausschließlich in Parvalbumin-positiven Neuronen der Retina würde es ermöglichen, die Bedeutung der elektrischen Kopplung in diesem neuronalen Subtyp für die Physiologie der Retina zu analysieren. Zunächst wurde auch hier die zelltypspezifische Deletion durch das Parv-Cre-Transgen in der Retina von $Cx36flox(lacZ)$ -Reportertermäusen untersucht und dann den Ergebnissen der $Cx36^{+/flox(CFP)}$:Parv-Cre-Mäuse gegenübergestellt (Abb. 4.18).

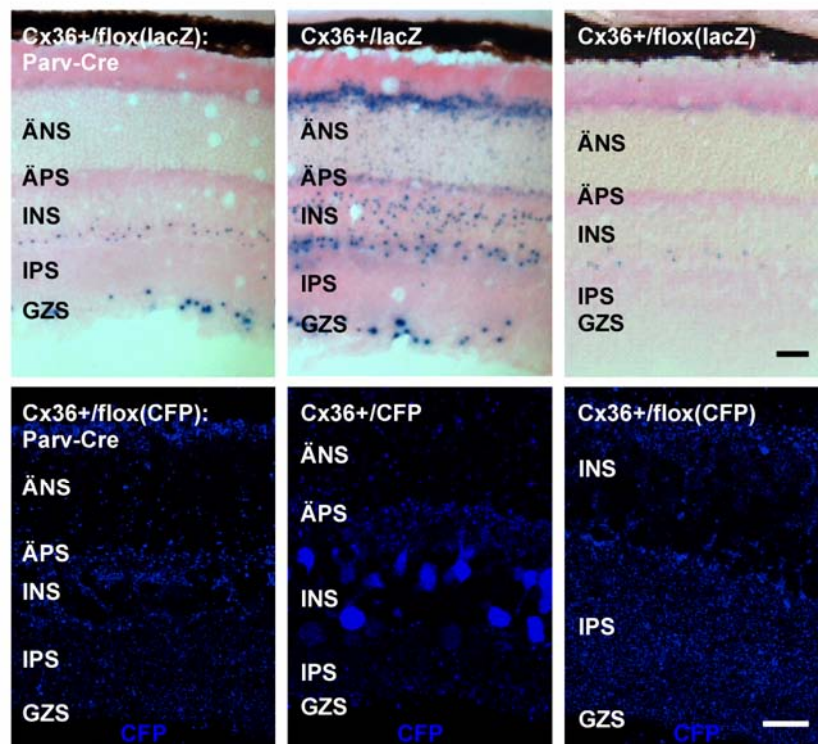


Abb. 4.18: lacZ-Färbung von Retina-Gefrierschnitten und CFP-Fluoreszenz von vitalen Retinadickschnitten. Die Parvalbumin-Cre-Rekombinase führt in der Retina von $Cx36flox(lacZ)$ -Mäusen zu lacZ-positiven Zellen ausschließlich in der Ganglienzellschicht, während bei einer ubiquitären Deletion des geflochtenen Bereiches lacZ-positive Zellen auch in anderen retinalen Zellschichten auftreten (vgl. $Cx36^{+/lacZ}$). Die lacZ-Signale in der INS und am äußeren Rand der ÄNS resultieren aus der Hintergrundexpression des $Cx36flox(lacZ)$ -Allels (vgl. $Cx36^{+/flox(lacZ)}$) und nicht aus der Aktivität der Parv-Cre-Rekombinase. CFP-positive Zellen in der Retina von $Cx36^{+/flox(CFP)}$:Parv-Cre-Mäusen treten nicht auf. Eine mögliche Deletion von Cx36 durch die Parv-Cre-Rekombinase wird in der Ganglienzellschicht nicht angezeigt (vgl. $Cx36^{+/flox(CFP)}$ in Abb. 4.11 und 4.12). Maßstab: 20 μm .

In der Retina von Mäusen mit dem Genotyp $Cx36^{+/flox(lacZ)}$:Parv-Cre treten lacZ-positive Zellen ausschließlich in der Ganglienzellschicht auf. Die Parv-Cre-Rekombinase deletiert Cx36 in nur einem Cx36-ausprägenden Zelltyp der Retina, den alpha-Ganglienzellen

(Schubert et al., 2005). Eine Analyse der CFP-Expression in der Ganglienzellschicht von $Cx36^{+/flox(CFP)}$:Parv-Cre-Mäusen war nicht möglich, da auch in $Cx36^{CFP/CFP}$ -Mäusen nach ubiquitärer Deletion von Cx36 in dieser Schicht niemals CFP nachgewiesen werden konnte (Kap. 4.1.4.7 und 4.1.4.8). Eine PCR-Analyse mit genomischer DNS aus Retina von $Cx36^{+/flox(CFP)}$:Parv-Cre-Mäusen zum Nachweis des CFP-Allels wurde durchgeführt (nicht gezeigt), war aber möglicherweise nicht sensitiv genug, die Deletion in dem verhältnismäßig geringen Anteil der alpha-Ganglienzellen an der Gesamtpopulation der Retina anzuzeigen. Gleiches gilt für die RT-PCR, mit der kein CFP-Transkript aus der Gesamt-RNS der Retina von $Cx36^{+/flox(CFP)}$:Parv-Cre-Mäusen amplifiziert wurde (nicht gezeigt). Eine Kopplung zwischen alpha-Ganglienzellen bzw. zwischen alpha-Ganglienzellen und Amakrinzellen fehlt in Cx36-defizienten Mäusen (Schubert et al., 2005). In Kooperation mit Dr. Timm Schubert (AG Prof. Reto Weiler, Oldenburg) wurde daher die mögliche Kopplungsdefizienz der alpha-Ganglienzellen in Mäusen des Genotyps $Cx36^{lacZ/flox(CFP)}$:Parv-Cre funktionell analysiert. Es wurden Farbstoffkopplungsanalysen durchgeführt und parallel dazu die Parvalbumin-Ausprägung in der Retina untersucht (Abb. 4.19).

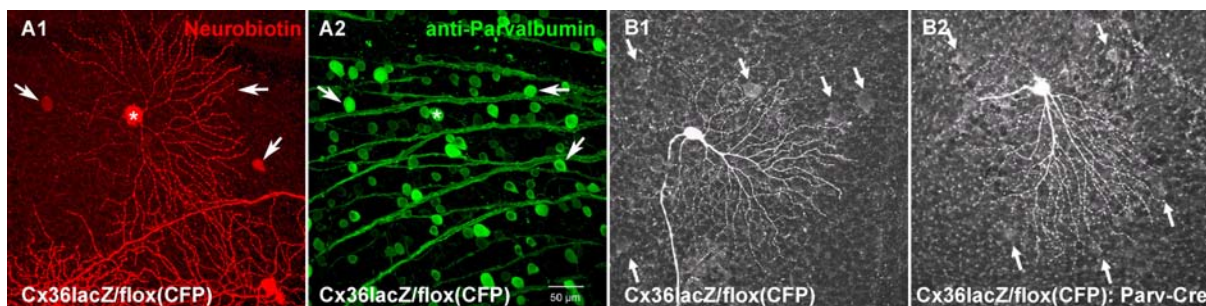


Abb. 4.19: Farbstoffkopplungsanalyse und Parvalbumin-Immunfluoreszenzanalyse in der Retina. A1: alpha-Ganglienzellen in der Retina von $Cx36^{lacZ/flox(CFP)}$ -Mäusen wurden mit Neurobiotin injiziert (Stern). Sie koppeln zu Amakrinzellen und anderen alpha-Ganglienzellen (Pfeile). A2: Die injizierten und koppelnden Zellen sind positiv für Parvalbumin (Stern und Pfeile). B1 und B2: Die Injektion von Neurobiotin in alpha-Ganglienzellen in der Retina von Mäusen mit dem Genotyp $Cx36^{lacZ/flox(CFP)}$:Parv-Cre zeigt, dass sie noch zu anderen Zellen gekoppelt sind (Pfeile in B2). Sie verhalten sich damit wie alpha-Ganglienzellen in $Cx36^{lacZ/flox(CFP)}$ -Mäusen (Pfeile in B1). Maßstabsbalken: 50 μ m. (Bilder zur Verfügung gestellt von Dr. Timm Schubert, Oldenburg)

Durch die Parvalbumin-Immunfluoreszenzanalyse von Retinae aus Mäusen mit dem Genotyp $Cx36^{lacZ/flox(CFP)}$ wird deutlich, dass die Zellen, die mit den Neurobiotin-injizierten alpha-Ganglienzellen koppeln, wie die injizierten Zellen selbst Parvalbumin ausdragen. Sie sind daher sowohl positiv für Neurobiotin wie für Parvalbumin. Der Parvalbumin-Promotor ist somit in diesen Zellen aktiv und sollte dort auch die Cre-Rekombinase exprimieren. In der Retina von $Cx36^{lacZ/flox(CFP)}$:Parv-Cre-Mäusen sind die alpha-Ganglienzellen weiterhin mit ihren Nachbarn gekoppelt. Es besteht kein Unterschied zu dem Kopplungsverhalten von alpha-Ganglienzellen in der Retina von Mäusen mit dem Genotyp $Cx36^{lacZ/flox(CFP)}$, die die

Cre-Rekombinase unter dem Parvalbumin-Promotor nicht ausprägen. Das Parv-Cre-Transgen ist nicht geeignet, eine zelltypspezifische Deletion von Cx36 in der Retina von *Cx36flox(CFP)*-Mäusen zu erzeugen, um auf diese Weise gezielt alpha-Ganglienzellen zu entkoppeln.

4.2.3 Zelltypspezifische Cx36-Deletion: Verpaarung von *Cx36flox(CFP)*-Mäusen mit weiteren Cre-transgenen Mäusen

Um eine Cre-Rekombinase zu finden, mit der eine zelltypspezifische Deletion von Cx36 in der Retina erreicht werden kann, wurden *Cx36flox(CFP)*-Mäuse mit weiteren zur Verfügung stehenden Cre-transgenen Mäusen verpaart. Als Vergleich wurden auch *Cx36flox(lacZ)*-Mäuse mit den jeweiligen Cre-transgenen Mäusen gekreuzt. Zu den verwendeten Cre-transgenen Linien zählten *CamKII α -Cre*-Mäuse (Casanova et al., 2001) und *Emx1-Cre*-Mäuse (Guo et al., 2000). Die *CamKII α -Cre*-Rekombinase ist in Neuronen des Cortex, Hippocampus, *Bulbus olfactorius* und des Thalamus aktiv. Eine Deletion gefloxter Gene durch die *Emx1-Cre*-Rekombinase erfolgt in Neuronen des Cortex und Hippocampus. Beide Cre-transgenen Mauslinien wurden bisher nicht auf ihre Aktivität in der Retina untersucht.

4.2.3.1 Reporterprotein-Expressionsanalysen von *Cx36flox(CFP)*- und *Cx36flox(lacZ)*-Mäusen in der Retina nach Verpaarung mit *CamKII α -* und *Emx1-Cre*-transgenen Mäusen

Die Untersuchungen von Mäusen mit dem Genotyp *Cx36^{+flox(lacZ)}:CamKII α -Cre*, *Cx36^{+flox(CFP)}:CamKII α -Cre*, *Cx36^{+flox(lacZ)}:Emx1-Cre* und *Cx36^{+flox(CFP)}:Emx1-Cre* erfolgten anhand des Nachweises des jeweiligen Reporterproteins β -Galaktosidase bzw. CFP. Dazu wurden Retina-Gefrierschnitte lacZ-gefärbt (Kap. 3.6.3) bzw. einer CFP-Immunfluoreszenzanalyse (Kap. 3.6.2.3) unterzogen und mit ebenso behandelten Retina-Gefrierschnitten von Mäusen mit einer ubiquitären Cx36-Deletion (Genotyp *Cx36^{+lacZ}* und *Cx36^{+CFP)}* verglichen (Abb. 4.20). In der Retina von Mäusen mit dem Genotyp *Cx36^{+flox(lacZ)}:CamKII α -Cre* sind lacZ-positive Zellen in der INS und in der GZS zu finden. Die ÄNS weist nach *CamKII α -Cre*-vermittelter Deletion keine lacZ-Signale auf, wie es bei einer ubiquitären Deletion von Cx36 der Fall ist. In der Retina von Mäusen mit dem Genotyp *Cx36^{+flox(CFP)}:CamKII α -Cre* sind keine CFP-positiven Zellen zu erkennen. Die *Emx1-Cre*-Rekombinase führt in der Retina sowohl von *Cx36flox(lacZ)*- als auch von *Cx36flox(CFP)*-Mäusen zu lacZ- bzw. CFP-positiven Zellen. Ein Unterschied in der Reporterprotein-Expression zwischen Retinae von Mäusen mit einer ubiquitären und einer *Emx1-Cre*-vermittelten Deletion besteht nicht.

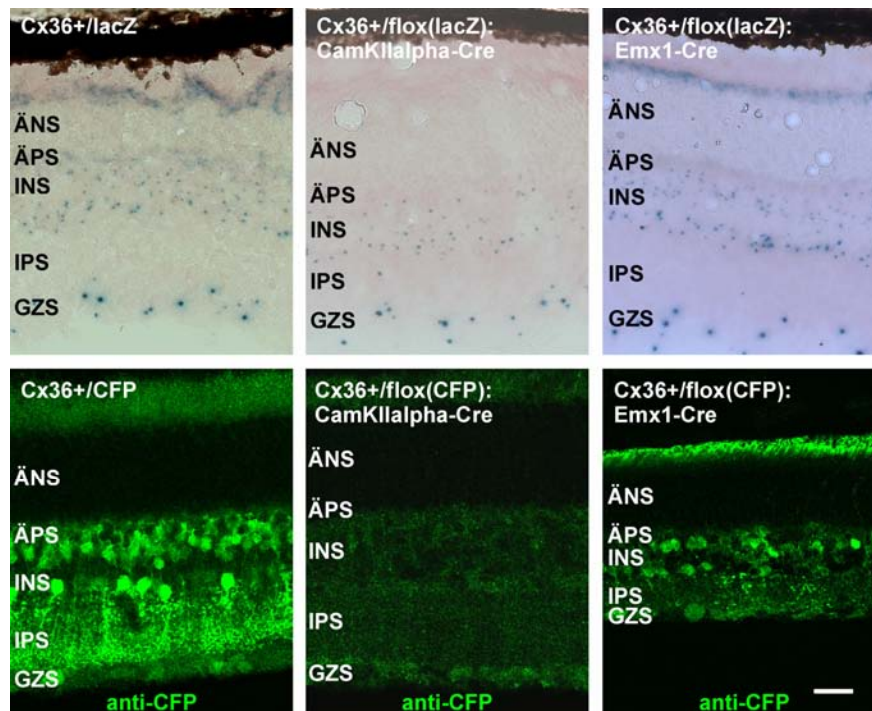


Abb. 4.20: Reporterprotein-Ausprägung nach CamKII α -Cre- und Emx1-Cre-vermittelter Deletion in der Retina. Durch CamKII α -Cre-vermittelte Deletion kommt es in der Retina von Cx36^{+flox(lacZ)}:CamKII α -Cre-Mäusen zu lacZ-Signalen in allen Cx36-ausprägenden Schichten, nicht jedoch im äußeren Bereich der ÄNS. Eine Deletion des Cx36flox(lacZ)-Allels durch die Emx1-Cre-Rekombinase scheint in allen Cx36-ausprägenden Zellen in der Retina zu erfolgen (vgl. Cx36^{+lacZ}). Die CFP-Immunfluoreszenzanalyse von Retina der Mäuse mit dem Genotyp Cx36^{+flox(CFP)}:CamKII α -Cre und Cx36^{+flox(CFP)}:Emx1-Cre zeigt an, dass es zu einer Deletion des Cx36flox(CFP)-Allels durch das Emx1-Cre-, nicht aber durch das CamKII α -Cre-Transgen kommt. CFP-Immunfluoreszenzsignale: grün. Maßstabballen 20 μ m.

4.3 Projekt II: Charakterisierung gegen Cx57 gerichteter Antikörper

Wie Dr. Sonja Hombach anhand der *Cx57KO*-Maus gezeigt hat, wird Cx57 nahezu ausschließlich in Horizontalzellen der Retina ausgeprägt. Es handelte sich dabei jedoch um einen indirekten bzw. funktionellen Expressionsnachweis von Cx57. Die β -Galaktosidase-Reaktion wies lediglich auf eine Aktivität des Cx57-Promotors in Horizontalzellen hin. Eine homozygote Deletion von Cx57 führte zu einer Reduktion der Kopplung zwischen Horizontalzellen auf unter 1 % (Hombach et al., 2004). Um jedoch Aussagen über die Expression und Lokalisation des Cx57-Proteins in Horizontalzellen treffen zu können, bedarf es der Herstellung von Antikörpern, die Cx57 spezifisch erkennen. Bisher schlugen Versuche, Cx57-antikörperhaltiges Serum zu erhalten, fehl (Sonja Hombach, Dissertation 2004). Da sich die Spezifität von Antikörpern eindeutig nur mithilfe von entsprechenden Defekt-Mäusen belegen lässt, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von James Nagy, Winnipeg, Manitoba/Kanada die von ihm hergestellten polyklonalen Antikörper *Cx57-Mid* und *Cx57-CT* an den *Cx57KO*-Mäusen getestet. Beide Antikörper richten sich gegen den C-Terminus von Cx57 (Abb. 4.21). Das Epitop von *Cx57-Mid* liegt weiter proximal zur Plasmamembran (AS 248 bis 263), während das Epitop von *Cx57-CT* distal am C-Terminus lokalisiert ist (AS 434 bis 446).

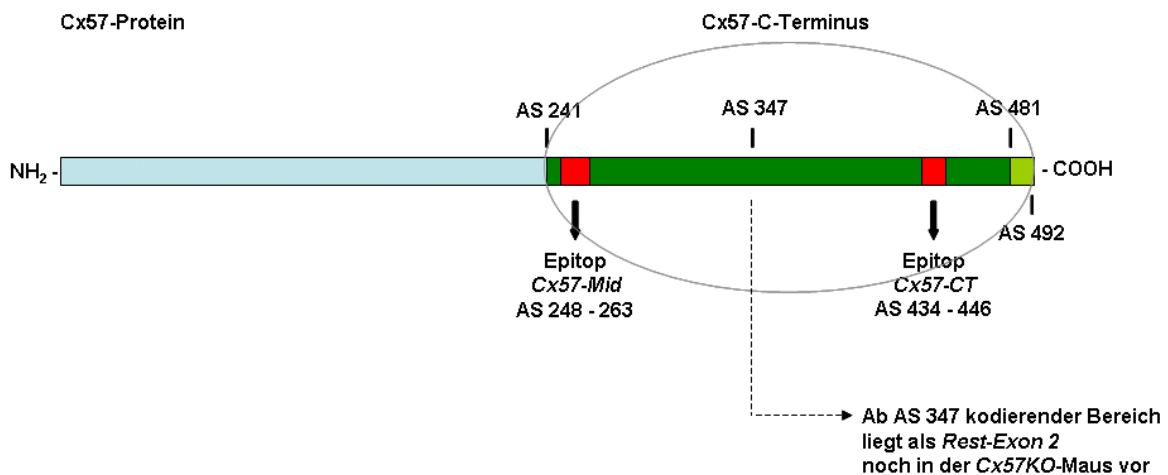


Abb. 4.21: Schematische Darstellung des Cx57-Proteins mit den Epitopen der Antikörper *Cx57-Mid* und *Cx57-CT*. Der C-Terminus (AS 241- 492) ist hell- bzw. dunkelgrün hervorgehoben. Die Epitope, gegen die sich die Antikörper richten, sind rot markiert. Der größte Teil der kodierenden Region von Cx57 liegt auf Exon 2; AS 481 - 492 (hellgrüner Bereich) werden von Exon 3 kodiert. Der ab AS 347 kodierende Bereich von Exon 2 sowie Exon 3 wurden bei der Erzeugung der *Cx57KO*-Maus nicht deletiert. In diesem *Rest-Exon 2* befindet sich der kodierende Bereich für das Epitop des Antikörpers *Cx57-CT*, nicht jedoch der kodierende Bereich für das Epitop von *Cx57-Mid*.

4.3.1 Funktionelle Untersuchung der Antikörper *Cx57-Mid* und *Cx57-CT* mithilfe rekombinanter *Cx57*-Fusionsproteine in der Immunoblot-Analyse

Bevor die Möglichkeit bestand, die *Cx57*-Antikörper am Zellkulturmodell zu testen, wurde ihre Aktivität anhand von rekombinanten *Cx57*-Fusionsproteinen (Kap. 3.5.1) in der Immunoblot-Analyse überprüft (Abb. 4.22). Diese Fusionsproteine bestehen aus einer N-terminalen Glutathion-S-Transferase, dem darauffolgenden C-Terminus (CT) (AS 241 - 492) oder der zytoplasmatischen Schleife (CL) (AS 95 - 150) des *Cx57*-Proteins als Kontrolle sowie einer Hexahistidin-Sequenz als C-terminale Modifikation. Entsprechend ihrer Zusammensetzung wurden die Fusionsproteine *GST-Cx57CT-6xHis* und *GST-Cx57CL-6xHis* genannt.

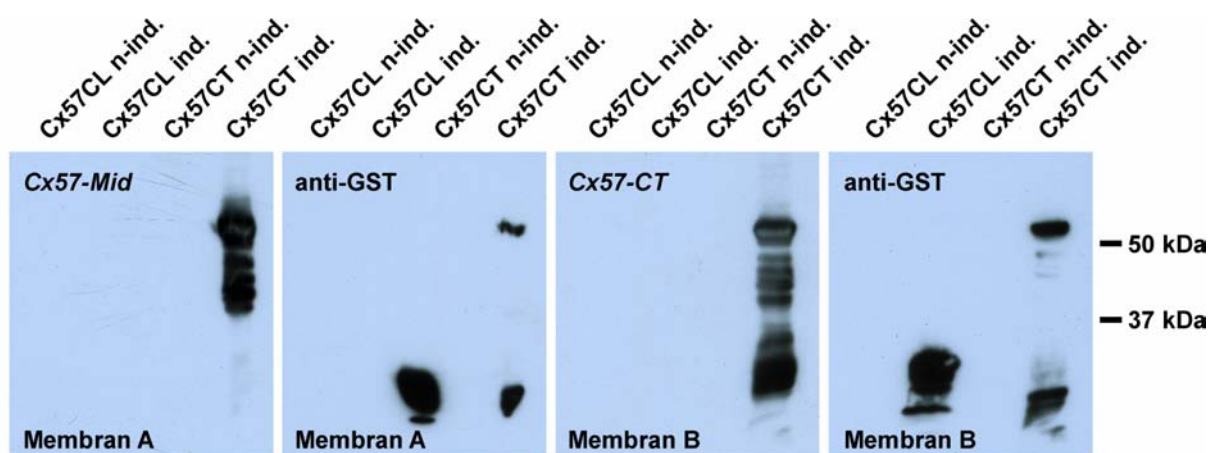


Abb. 4.22: Aktivitätsnachweis der gegen *Cx57* gerichteten Antikörper *Cx57-Mid* und *Cx57-CT* anhand von rekombinanten *Cx57*-Fusionsproteinen mittels Immunoblot-Analyse. *Cx57CT* n-ind. bzw. ind.: *GST-Cx57CT-6xHis*-exprimierende Bakterienkultur, nicht-induziert bzw. 4 h nach IPTG-Induktion. *Cx57CL* n-ind. bzw. ind.: *GST-Cx57CL-6xHis*-exprimierende Bakterienkultur, nicht-induziert bzw. 4 h nach IPTG-Induktion. Die *GST-Cx57CL-6xHis*-exprimierende, IPTG-induzierte Bakterienkultur diente wie die nicht-induzierten Kulturen als Negativkontrolle. Die molekulare Masse der Fusionsproteine entspricht 55 kDa für *GST-Cx57CT-6xHis* und 33 kDa für *GST-Cx57CL-6xHis*. Um die Expression der GST-Fusionsproteine zu verifizieren, wurden die mit den *Cx57*-Antikörpern inkubierten Membranen regeneriert und mit einem GST-Antikörper inkubiert.

Sowohl die *Cx57-Mid*-Antikörper als auch die *Cx57-CT*-Antikörper erkennen das *GST-Cx57CT-6xHis*-Fusionsprotein (55 kDa) in der Spur der IPTG-induzierten Bakterien. Nicht nachgewiesen wird das *GST-Cx57CL-6xHis*-Fusionsprotein (33 kDa) nach Induktion. Zur Verifizierung der Fusionsproteine wurde auf derselben Membran der Nachweis von GST durchgeführt.

4.3.2 Analyse der Antikörper *Cx57-Mid* und *Cx57-CT* im HeLa-Zellkultursystem

Zellkultursysteme wie z.B. Connexin-transfizierte HeLa-Zellen (Elfgang et al., 1995) werden nicht nur eingesetzt, um eine erste Charakterisierung eines neu klonierten Gens vorzunehmen, sondern auch um die Spezifität von Antikörpern zu überprüfen, die gegen das von diesem Gen kodierte Protein gerichtet sind.

Bis zu diesem Zeitpunkt gab es trotz zahlreicher Transfektionen keine HeLa-Zelllinie, die *Cx57* mit dem korrekten C-Terminus (Hombach et al., 2004) bzw. das chimäre Protein *Cx57eGFP*, bestehend aus *Cx57* und einem C-terminal fusionierten eGFP, stabil exprimiert (Steffen Latt, Diplomarbeit 2004). Um dennoch die *Cx57*-Antikörper *Cx57-Mid* und *Cx57-CT* an eukaryotischen Zellen testen zu können, wurden transiente Transfektionen von HeLa-Zellen vorgenommen (Kap. 3.3.5) und diese in der Immunfluoreszenzanalyse (Kap. 3.6.2.1) verwendet (Abb. 4.23). Als Vektor diente das bereits für die stabile Transfektion von HeLa-Zellen eingesetzte Plasmid *pMJ-Cx57Go*, in welchem das *Cx57* als *Cx57eGFP*-Fusionsprotein kodiert wird (Steffen Latt, Diplomarbeit 2004).

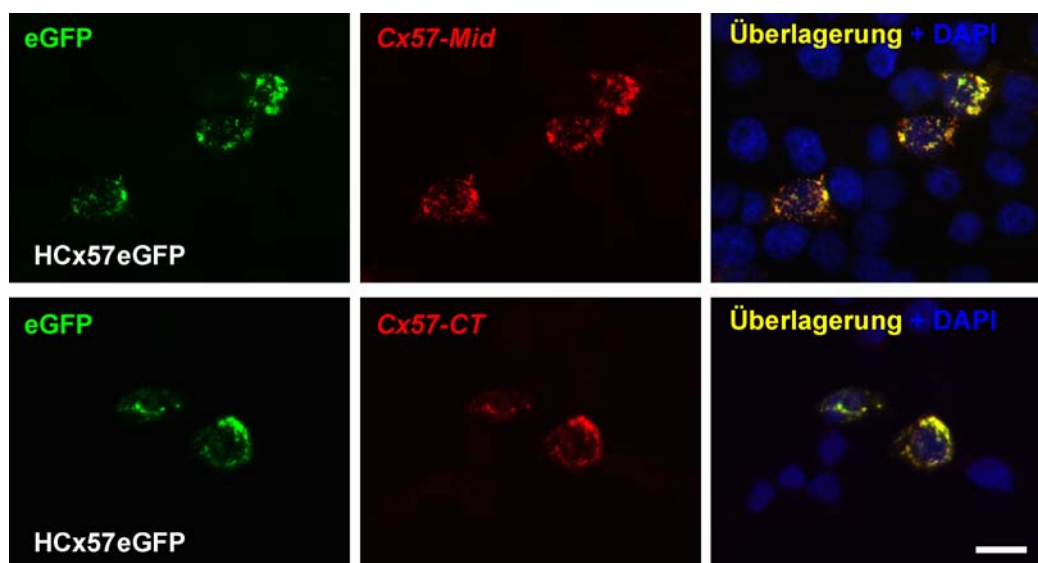


Abb. 4.23: Immunfluoreszenzanalyse mit den gegen *Cx57* gerichteten Antikörpern *Cx57-Mid* und *Cx57-CT* im Zellkultursystem. Die transient transfizierten HeLa-Zellen exprimieren das fluoreszierende Fusionsprotein *Cx57eGFP* (grün), das in der Zellkernperipherie lokalisiert ist. Dieses Protein wird sowohl von den *Cx57-Mid*- als auch von den *Cx57-CT*-Antikörpern erkannt (rot), wie in der Überlagerung der Signale (gelb) deutlich wird. Nicht-transfizierte Zellen weisen keine Signale auf. Zellkerne DAPI-gefärbt (blau); Dokumentation am Axiophot. Maßstabsbalken: 20 μm .

Die mit dem Vektor *pMJ-Cx57Go* transfizierten HeLa-Zellen prägen 48 h nach der Transfektion das *Cx57eGFP*-Fusionsprotein deutlich aus. Dabei sind die Fluoreszenzsignale des eGFPs vor allem in der Zellkernperipherie zu erkennen. Sie sind sowohl mit den *Cx57-Mid*-Antikörpern als auch mit den *Cx57-CT*-Antikörpern kolokalisiert, die zu keinen Signalen

in untransfizierten Zellen führen. Connexintypische Fluoreszenzsignale in der Plasmamembran kontaktierender Zellen treten nicht auf.

Immunoblot-Analysen mit Lysaten von mit den Vektoren *pMJ-Cx57Go* und *pMJ-Cx57Stop* (kodiert das nicht-fusionierte Cx57-Protein) transient transfizierten HeLa-Zellen bestätigten die Spezifität der *Cx57-Mid*- und *Cx57-CT*-Antikörper (Abb. 4.24).

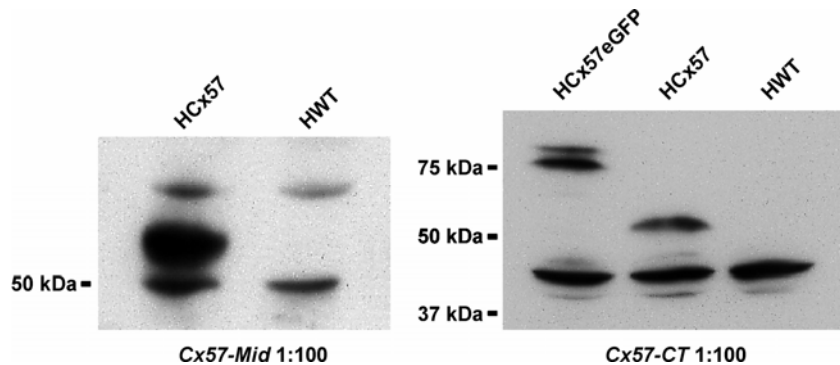


Abb. 4.24: Immunoblot mit Zelllysaten transient transfizierter HeLa-Zellen und den Antikörpern *Cx57-Mid* und *Cx57-CT*. Beide Antikörper erkennen spezifisch das Cx57-Protein (56 kDa). Mit *Cx57-CT* wurde zusätzlich noch das Fusionsprotein *Cx57eGFP* (82 kDa) getestet. HCx57: HeLa-Zellen, die nach Transfektion mit dem Vektor *pMJ-Cx57Stop* das Cx57-Protein ausdrücken; HCx57eGFP: HeLa-Zellen, die nach Transfektion mit dem Vektor *pMJ-Cx57Go* das Fusionsprotein *Cx57eGFP* ausdrücken; HWT: HeLa-Wildtypzellen, nicht transfiziert; Verdünnung der Cx57-Antikörper jeweils 1:100.

4.3.3 Analyse der Antikörper *Cx57-Mid* und *Cx57-CT* mit Wildtyp- und *Cx57KO*-Retina-Gefrierschnitten

Um beide Cx57-Antikörper auf ihre Spezifität im Gewebe zu untersuchen, wurden sie in der Immunfluoreszenzanalyse mit Retinae von WT- und *Cx57KO*-Mäusen eingesetzt (Kap. 3.6.2.4; Abb. 4.25). Die Antikörper *Cx57-Mid* führen zu perlschnurartigen Signalen an der Grenze zwischen Äußerer Plexiformer Schicht (ÄPS) und Innerer Nukleärer Schicht (INS) bzw. bis in die ÄPS der Retina von Wildtyp-Mäusen hinein. Dort liegen die Horizontalzellen. Diese Signale fehlen am ÄPS/INS-Übergang von *Cx57*-defizienten Retinae und können daher als spezifisch betrachtet werden. Im Fall von *Cx57-CT* treten in Wildtyp- und in *Cx57KO*-defizienten Retinae deutliche perlschnurartige Signale auf. Die Signale sind somit als unspezifisch zu bezeichnen.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass beide gegen Cx57 gerichteten Antikörper rekombinantes Cx57CT-Peptid erkennen und in transfizierten HeLa-Zellen Cx57 bzw. Cx57eGFP spezifisch nachweisen. In der Retina haben sich jedoch nur die *Cx57-Mid*-Antikörper bewährt. Die gegen die Aminosäuren 434 bis 446 von Cx57 gerichteten Antikörper *Cx57-CT* führen auch in *Cx57*-defizienten Mäusen zu Signalen am ÄPS/INS-

Übergang. Der Austauschvektor zur Herstellung der *Cx57KO*-Maus wurde so konstruiert, dass ein Teil von Exon 2, *Rest-Exon 2*, nach der homologen Rekombination im *Cx57*-Lokus bestehen bleibt (Abb. 4.21). Er kodiert ab Aminosäure 347 des *Cx57*-Proteins. Es wurde daher vermutet, dass *Rest-Exon 2* weiterhin exprimiert und von den *Cx57-CT*-Antikörpern erkannt wird.

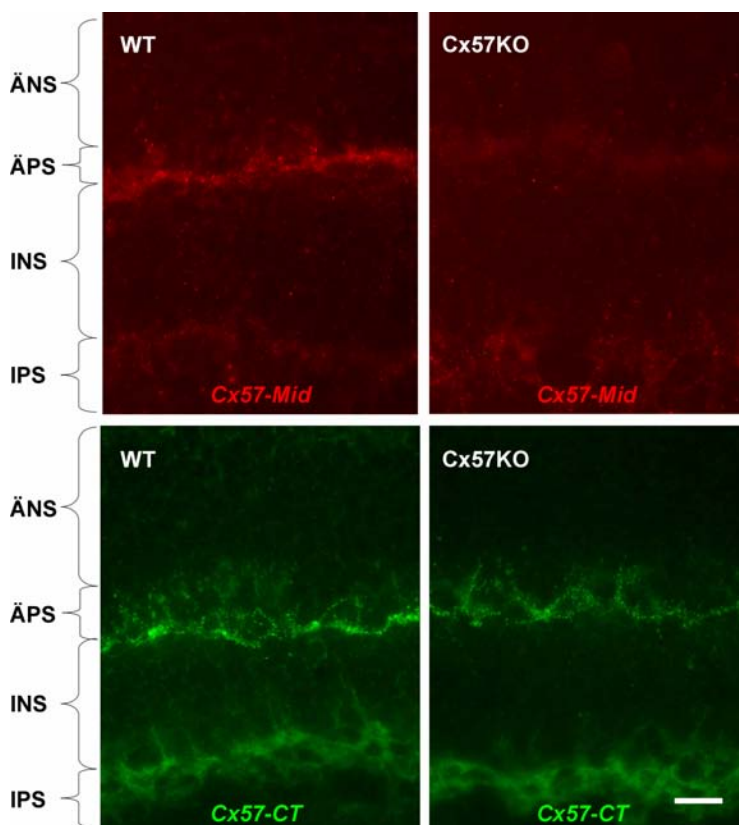


Abb. 4.25: Immunfluoreszenzanalyse mit den Antikörpern *Cx57-Mid* und *Cx57-CT* und Retina-Gefrierschnitten von Wildtyp (WT)- und *Cx57KO*-Mäusen. Die Antikörper *Cx57-Mid* (1:100) führen in der Retina der Wildtypmaus zu spezifischen Signalen an der Grenze zwischen Äußerer Plexiformer Schicht (ÄPS) und Innerer Nukleärer Schicht (INS) bzw. bis in die ÄPS hinein. Auch *Cx57-CT* (1:75) liefert an dieser Stelle im Wildtyp Signale, die jedoch in *Cx57KO*-Mäusen ebenfalls sehr deutlich zu sehen sind. ÄNS: Äußere Nukleäre Schicht; IPS: Innere Plexiforme Schicht. Bilddokumentation am Axiophot. Maßstabsbalken: 10 μ m.

4.3.4 Northern Blot-Analyse der Expression von *Rest-Exon 2* in *Cx57KO*-Mäusen

Aus den Retinae mehrerer *Cx57*-defizienter Mäuse wurde Gesamt-RNS präpariert und eventuell vorliegende Transkripte von *Rest-Exon 2* durch eine Northern Blot-Analyse mit einer entsprechenden Sonde (401 bp großes *EcoRI-ClaI*-Fragment aus dem Vektor *Cx57_retDNA-Subklon*) nachgewiesen (nicht gezeigt). Als Positivkontrolle diente Gesamt-RNS aus den Retinae mehrerer Wildtyp-Mäuse. Hier wurde wie zu erwarten eine deutliche Bande bei 4,5 kB für die *Cx57*-mRNS nachgewiesen. In der Gesamt-RNS aus *Cx57KO*-Retinae war lediglich ein Banden“schatten“ bei ca. 12 kb zu erkennen, der keine genaue Aussage erlaubte.

4.3.5 Immunpräzipitation mit Cx57-CT aus Retinalysaten

Immunoblot-Analysen mit beiden gegen Cx57 gerichteten Antikörpern und Retinalysaten blieben erfolglos, vermutlich da die Konzentration des Cx57-Proteins in den Lysaten zu gering ist. Um das Protein, das durch Cx57-CT in der Cx57KO-Retina erkannt wird, im Immunoblot zu charakterisieren, wurde daher eine Immunpräzipitation vorgeschaltet (Abb. 4.26). Da bei Immunpräzipitationen die präzipitierenden Antikörper stets mit auf das SDS-Gel aufgetragen werden, ergibt sich später auf der Membran eine Bande bei 50 kDa, die aus den schweren Ketten der Antikörper resultiert. Diese Bande überdeckt damit eine mögliche Bande für Cx57. Es war daher erforderlich, die präzipitierenden Antikörper vor der Immunpräzipitation zu immobilisieren (Kap. 3.5.5).

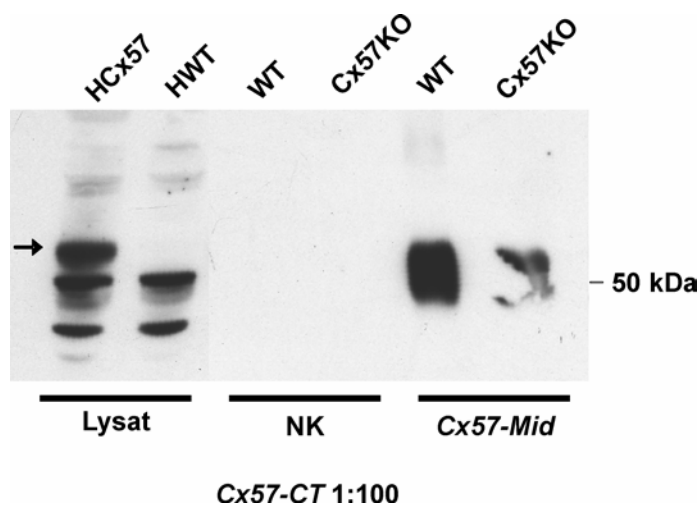


Abb. 4.26: Immunpräzipitation mit Retinalysaten aus Wildtyp- (WT-) und Cx57KO-Mäusen und den Cx57-CT-Antikörpern. In den ersten beiden Spuren wurde Proteinlysate von Cx57 exprimierenden HeLa-Zellen (HCx57) bzw. HeLa-Wildtypzellen (HWWT) aufgetragen. NK: Negativkontrolle, Präzipitationsansatz ohne Antikörper (nur ProteinG-Sepharose). Antikörper zum Nachweis auf der Membran: Cx57-CT, 1:100 verdünnt. Bei der Präzipitation mit Cx57-CT tritt eine Bande bei ca. 50 kDa auf, die sich auf gleicher Höhe wie Cx57 im HeLa-Lysat befindet. Diese fehlt bei der Negativkontrolle. Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Tanja Auth.

Die Immunpräzipitation aus Retinalysat und der anschließende Nachweis von Cx57 im Immunoblot mit Cx57-CT-Antikörpern führten zu Signalen im erwarteten Bereich molekularer Masse von ca. 56 kDa. Dies war sowohl für das Wildtyp- als auch für das Cx57KO-Retinalysat der Fall. In massenspektrometrischen MudPIT-Analysen (Kap 3.5.6), durchgeführt von Dr. Dirk Wolters, Bochum, wurde die Identifikation dieser Präzipitate angestrengt. Auswertbare Ergebnisse lagen vor Abschluss der vorliegenden Arbeit nicht vor.

4.4 Projekt III: Vorbereitungen zur Erzeugung einer induzierbaren horizontalzellablatierenden Mausmutante

Über die Physiologie von Horizontalzellen sowie ihre Rolle während der Entwicklung der Retina ist noch wenig bekannt. Ansätze zur Klärung dieser Fragen können eine horizontalzellspezifische Deletion eines Gens mittels des Cre/loxP-Systems (Kap. 1.10.1) oder eine funktionelle Ablation der Horizontalzellen mithilfe des DTR/DT-Systems (Kap. 1.10.2) darstellen.

Frühere Untersuchungen von Hombach et al. (2004) ergaben, dass Cx57 eine stark zelltypspezifische Ausprägung in Horizontalzellen aufweist. Es bietet sich daher an, den Cx57-Promotor zu nutzen und mittels homologer Rekombination die oben genannten „genetischen Werkzeuge“ in den Cx57-Lokus einzubringen, um die Horizontalzellen gezielt zu manipulieren. Zu diesem Zweck wurde der Austauschvektor *pKW-DTRfrtCre* entwickelt.

4.4.1 Der Austauschvektor *pKW-DTRfrtCre*

Eingerahmt von 5'- und 3'- homologen Bereichen aus dem Cx57-Lokus enthält der Austauschvektor *pKW-DTRfrtCre* (Abb. 4.27) das *DTRfrtCre*-Konstrukt, das einerseits aus der kodierenden Region des Diphtherietoxinrezeptors (DTR) aus Primaten besteht, der C-terminal an die kodierende Region des eGFPs (verstärkt grün-fluoreszierendes Protein, *enhanced green fluorescent protein*) fusioniert ist (Jung et al., 2002). Diese DTReGFP-Kassette ist von frt-Erkennungsstellen flankiert. Stromabwärts davon befindet sich die kodierende Region der Cre-Rekombinase. Die resultierende *DTRfrtCre*-Mausmutante ermöglicht mehrere Ansätze (siehe auch Abb. 4.32): Die Ausprägung des DTRs unter Kontrolle des Cx57-Promotors bewirkt eine Sensibilisierung der Horizontalzellen gegenüber dem Diphtherietoxin. Bei Applikation des Toxins werden die Horizontalzellen durch Inhibition ihrer Proteinbiosynthese ablatiert. In Abhängigkeit von der Stärke des Cx57-Promotors ist es außerdem möglich, die Horizontalzellen anhand der Fluoreszenz des DTReGFP-Fusionsproteins zu visualisieren. Darüber hinaus kann mithilfe des Flp/frt-Systems eine Deletion der geflirteten DTReGFP-Kassette erreicht und damit die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Cx57-Promotors ausgeprägt werden. Dies führt zu einer horizontalzell-spezifischen Deletion gefloxter Gene.

Als Grundlage für die Klonierung des Austauschvektors *pKW-DTRfrtCre* diente der ES-Zellvektor *Cx57 KO* (Sonja Hombach, Diplomarbeit 2000). Dieser Vektor enthält bereits die für eine homologe Rekombination in den Cx57-Lokus von ES-Zellen erforderlichen 5'- und 3'-Homologiebereiche. Die Strategie zur Herstellung von *pKW-DTRfrtCre* wurde so gewählt, dass zunächst das *DTRfrtCre*-Konstrukt in dem Vektor *pBSK* kloniert und schließlich anstelle des lacZ-Gens in den *Cx57 KO*-Austauschvektor eingefügt wurde.

4.4.1.1 Klonierung des Austauschvektors *pKW-DTRfritCre*

Die Klonierung (Kap. 3.2) des Austauschvektors *pKW-DTRfritCre* erfolgte in insgesamt sieben Schritten. Eine graphische Darstellung der Schritte 1 bis 7 befindet sich im Anhang.

Schritt 1 (Klonierung des Vektors *pBSK_frt-DTReGFP-frit*): Aus dem von Dr. Thorsten Buch zur Verfügung gestellten Vektor *pBSK_DTReGFP* wurde die *DTReGFP*-Kassette durch eine *EcoRI*-Restriktion ausgeschnitten und in den geöffneten Zielvektor *pBSK_frt-neo-frit* über jeweils geglättete Enden ligiert. Zuvor wurde aus diesem Zielvektor die *neoR*-Kassette zwischen den *frit*-Erkennungssequenzen mithilfe der Restriktionsendonukleasen *StyI* und *BamHI* entfernt. Dabei blieb das SV40-polyA-Signal (kurz: polyA-Signal) der *neoR*-Kassette im Vektor zurück und fungierte nun als polyA-Signal der *DTReGFP*-Kassette. Des Weiteren blieben zwischen der ersten *frit*-Erkennungssequenz und dem Beginn der kodierenden Region des DTR 20 Basenpaare des der *neoR*-Kassette vorgeschalteten PGK-Promotors bestehen.

Schritt 2 (Klonierung des Vektors *pBSKneuXhoI_frt-DTReGFP-frit*): Um benötigte Restriktionsstellen zu erhalten, wurde die geflirtete *DTReGFP*-Kassette aus dem aus Schritt 1 resultierenden Vektor in den Zielvektor *pBSK* kloniert. Dazu wurde das *frit-DTReGFP-frit*-Konstrukt über eine *SalI*-Restriktion aus dem Vektor *pBSK_frt-DTReGFP-frit* ausgeschnitten, die Enden geglättet und anschließend in den mit *XhoI* linearisierten und an den Enden geglätteten Vektor *pBSK* eingebracht.

Schritt 3 (Klonierung des Vektors *pBSKneuXhoI_frt-DTReGFP-nls-Cre-polyA SmaI*): Zur Komplettierung des *DTRfritCre*-Konstruktes in dem *pBSK*-Vektor wurde die kodierende Region der Cre-Rekombinase mit vorgeschaltetem Kernlokalisierungssignal (*nls*, *nuclear localisation signal*) und eigenem SV40-polyA-Signal aus dem Vektor *pPGK-Cre bpA* über eine *XhoI*-Spaltung ausgeschnitten, die Enden geglättet und hinter die geflirtete *DTReGFP*-Kassette in den über *SmaI* geöffneten Vektor *pBSKneuXhoI_frt-DTReGFP-frit* ligiert.

Schritt 4 (Klonierung des Vektors *pBSKneuXhoI_frt-DTReGFP-nls-Cre-polyA SmaI del AccI*): Es folgte eine Deletion des sich vor der Cre-Rekombinase-Kassette befindlichen *AccI*-Fragments, das eine Mehrfachklonierungsstelle (MCS, *multiple cloning site*) umfasst. Somit wurde eine für die weitere Klonierung störende *EcoRI*-Schnittstelle entfernt. Der *AccI*-gespaltene Vektor wurde anschließend religiert.

Schritt 5 (Klonierung des Vektors *pBSK_DTRfritCre del pgk-Prom.*): Um auszuschließen, dass der Rest des ursprünglichen PGK-Promotors vor der *DTReGFP*-Kassette (vgl. Schritt 1) die Aktivität des Cx57-Promotors und damit die Expression des *DTRfritCre*-Konstruktes beeinflusst, wurde er deletiert. Dazu wurde das ihn beinhaltende *ApaI-EcoRI*-Fragment aus dem Vektor *pBSKneuXhoI_frt-DTReGFP-frit-nls-Cre-polyA SmaI del AccI* entfernt und durch

ein mittels Hybridisierung der Oligonukleotide *Syn sense* und *Syn antisense* (Kap. 3.2.6) synthetisch angefertigtes DNS-Zwischenstück von 50 bp ersetzt. In diesem Zwischenstück wurde die Sequenz zwischen der *ApaI*- und der *EcoRI*-Schnittstelle optimiert: Unmittelbar hinter die *ApaI*-Erkennungssequenz wurde eine *PmlI*-Schnittstelle für die spätere Klonierung eingebracht. Auf die *PmlI*-Schnittstelle folgt direkt die 5'-*frt*-Erkennungssequenz, welche nun aufgrund der fehlenden 20 bp des PGK-Promotors unmittelbar vor der *EcoRI*-Schnittstelle endet und damit in die Nähe des DTR-Startcodons rückt. Die Enden des DNA-Zwischenstücks wurden so gewählt, dass sie „klebrig“ in den mit *ApaI* bzw. *EcoRI* geöffneten Vektor *pBSKneuXhoI_frt-DTReGFP-frt-nls-Cre-polyA SmaI del AccI* ligiert werden konnten. Die Restriktionserkennungssequenzen blieben somit für die weiteren Klonierungsschritte erhalten.

Schritt 6 (Klonierung des Vektors *pBSK_DTRfrtCre Cx57 PmlI-XhoI 5'up*): Über die eingebrachte *PmlI*-Schnittstelle (vgl. Schritt 5) wurde ein mit *PmlI* und *XhoI* gespaltenes und an dem *XhoI*-Ende geglättetes PCR-Fragment, das aus dem Austauschvektor *Cx57 KO* mit den Oligonukleotid-Startermolekülen *Cx57-Prom sense* und *Cx57-Prom antisense* amplifiziert wurde, in den Zielvektor *pBSK_DTRfrtCre del pgk-Prom.* eingebracht. Damit befand sich in dem neu entstandenen Vektor vor der 5'-*frt*-Erkennungssequenz der *DTReGFP*-Kassette bereits ein Teil der 5'-homologen Region von *Cx57*.

Schritt 7 (Klonierung des Vektors *pKW-DTRfrtCre*): Im letzten Schritt wurde das *DTRfrtCre*-Konstrukt zusammen mit dem vorgeschalteten Abschnitt der 5'-homologen Region von *Cx57* über die Restriktionsendonukleasen *PmlI* und *NotI* aus dem Vektor *pBSK_DTRfrtCre Cx57 PmlI-XhoI 5'up* ausgeschnitten und anstelle des *lacZ*-Gens in den Austauschvektor *Cx57 KO* ligiert. Das Entfernen des *lacZ*-Gens erfolgte über eine Spaltung des Austauschvektors mit *PmlI* und *BamHI*. Vor der Ligation wurden der *NotI*- und der *BamHI*-Überhang geglättet. Somit entstand der finale Austauschvektor *pKW-DTRfrtCre* (Abb. 4.27).

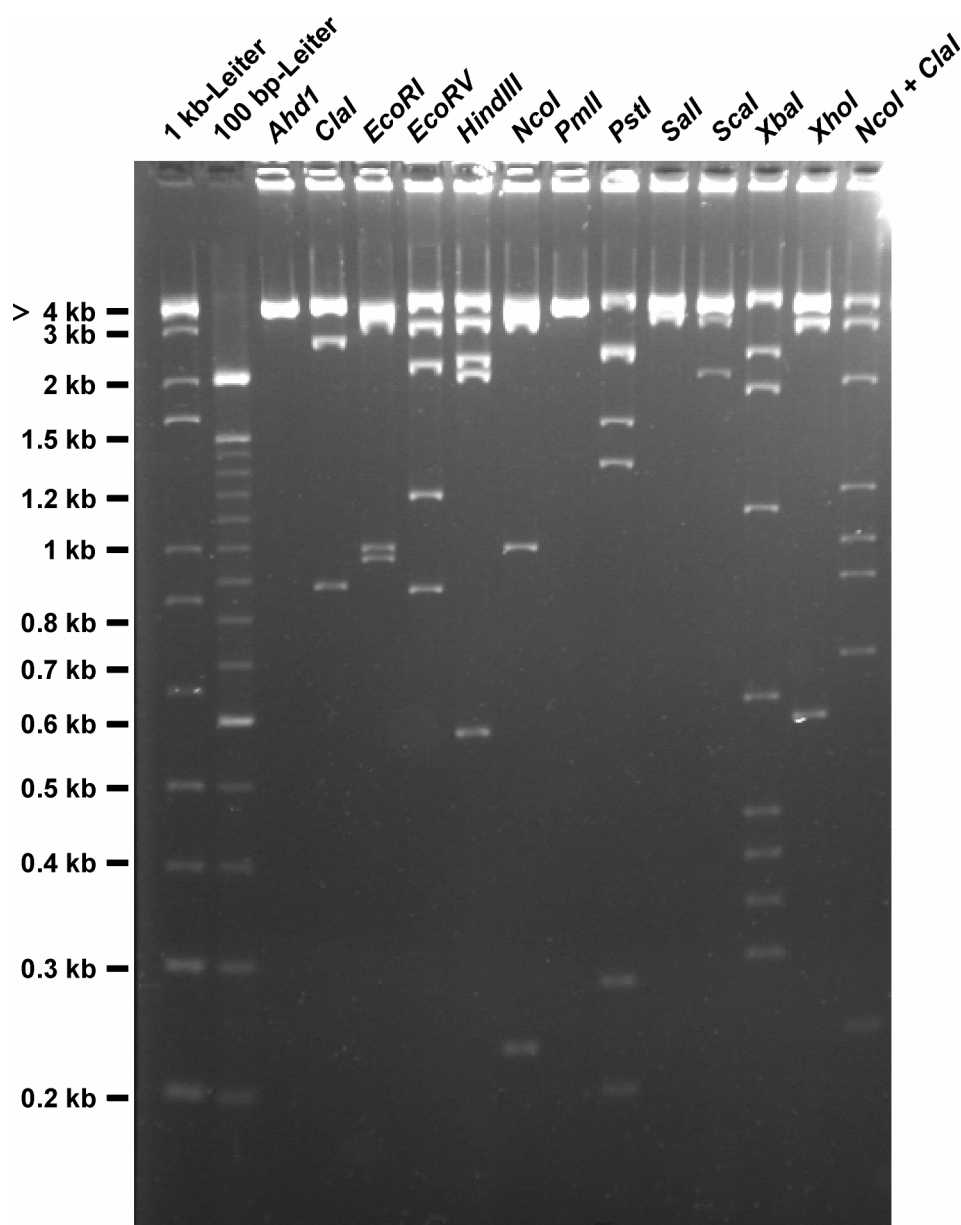


Abb. 4.28: Gel-elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente nach enzymatischen Spaltungen des Austauschvektors *pKW-DTRfritCre*. Die Spaltungen erfolgten mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen. Anhand des Bandenmusters wurde das Vorliegen des Austauschvektors *pKW-DTRfritCre* bestätigt. Die Auftrennung der Fragmente bis zu einer Größe von 3 kb ist gut zu erkennen.

Enzym	<i>pKW-DTRfritCre</i> [bp]	Enzym	<i>pKW-DTRfritCre</i> [bp]
<i>AhdI</i>	linearisiert	<i>PstI</i>	54, 57, 197, 281, 1390, 1604, 2400, 2461, 4969
<i>ClaI</i>	888, 2685, 9840	<i>SaII</i>	3881, 9532
<i>EcoRI</i>	982, 999, 3417, 3924, 4091	<i>ScaI</i>	2051, 3453, 7909
<i>EcoRV</i>	878, 1198, 2260, 3099, 5978,	<i>XbaI</i>	298, 348, 398, 448, 620, 1121, 1949, 2422, 5809
<i>HindIII</i>	575, 2091, 2364, 3323, 5060	<i>XhoI</i>	587, 3368, 9458
<i>NcoI</i>	230, 1002, 3758, 4109, 4314	<i>NcoI/ClaI</i>	230, 710, 888, 1002, 1246, 1975, 3048, 4314
<i>PmlI</i>	linearisiert		

Tab. 4.2: Fragmentgrößen der Restriktionsspaltungen von *pKW-DTRfritCre*. Dargestellt sind die Fragmentgrößen, die aus den Testspaltungen des Austauschvektors *pKW-DTRfritCre* mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen resultieren.

4.4.1.2 Überprüfen der *frt*-Erkennungssequenzen: Transformation des Vektors *pKW-DTRfrtCre* in 294 *Flp-E.coli*-Bakterien

Um die Funktionalität der *frt*-Erkennungssequenzen in dem Austauschvektor *pKW-DTRfrtCre* zu überprüfen, wurde der Vektor in *E.coli*-Bakterien transformiert, die genetisch so verändert worden waren, dass sie die Flp-Rekombinase ausdrücken (Buchholz et al., 1996). In diesen 294-*Flp-E.coli* (kurz: *Flp-E.coli*)-Bakterien wurde *pKW-DTRfrtCre* zu dem Vektor *pKW-Cre* rekombiniert. Kontrollrestriktionen (Abb. 4.29 und Tab. 4.2) der aus den transformierten *Flp-E.coli*-Bakterien präparierten Plasmide bestätigten diesen Vorgang. Das Vorliegen des Vektors *pKW-Cre* ist ein Hinweis darauf, dass die *frt*-Sequenzen in *pKW-DTRfrtCre* von der Flp-Rekombinase erkannt werden und zu einer Deletion der *DTR_{ReGFP}*-Kassette führen.

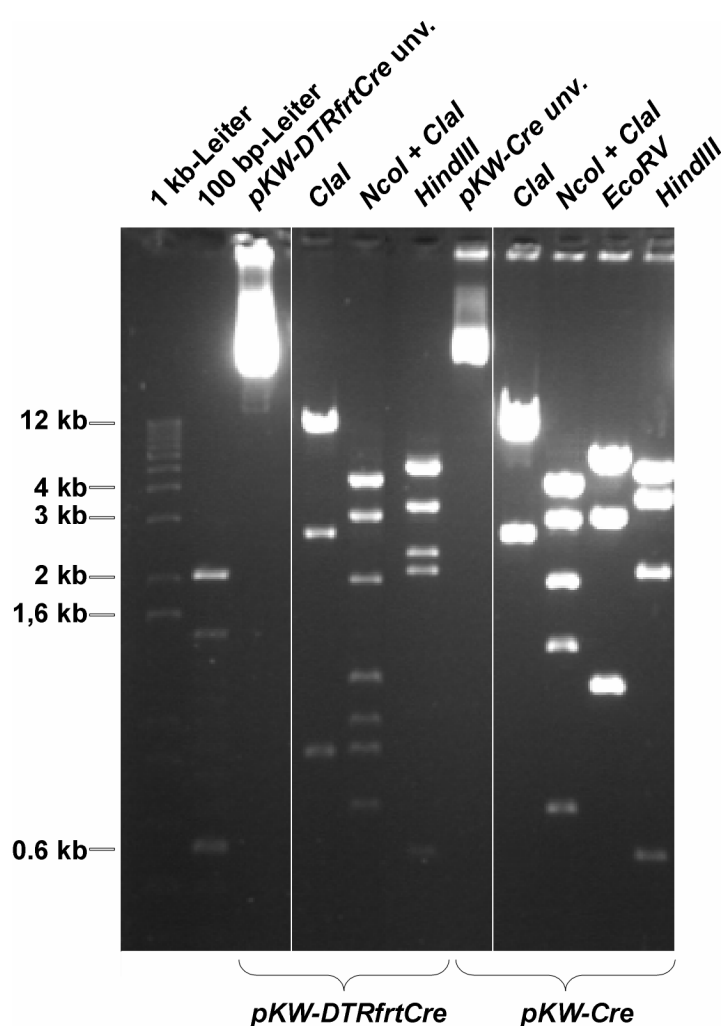


Abb. 4.29: Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente nach enzymatischen Spaltungen der Vektoren *pKW-DTRfrtCre* und *pKW-Cre*. Die Spaltungen erfolgten mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen. Die Deletion der geflirteten *DTR_{ReGFP}*-Kassette in dem Vektor *pKW-Cre* wird durch das veränderte Bandenmuster im Vergleich zu *pKW-DTRfrtCre* deutlich.

Enzym	<i>pKW-DTRfrtCre</i> [bp]	<i>pKW-Cre</i> [bp]
<i>NcoI</i>	230, 1002, 3748, 4106, 4314	3389, 3748, 4314
<i>ClaI</i>	888, 2672, 9840	2672, 8779
<i>NcoI</i> + <i>ClaI</i>	230, 700, 888, 1002, 1246, 1972, 3048, 4314	700, 1417, 1972, 3048, 4314
<i>EcoRV</i>	nicht gezeigt	1189, 1198, 3099, 5965
<i>HindIII</i>	575, 2091, 2364, 3310, 5060	575, 2091, 3725, 5060

4.4.1.3 Klonierung des PCR-Testvektors *pKW-DTRfrtCre PCR-Test*

Ein erstes Durchmusterung Neomycin-selektionierter ES-Zellklone auf die homologe Rekombination des Austauschvektors *pKW-DTRfrtCre* in den Cx57-Lokus soll mithilfe einer PCR-Reaktion erfolgen. Vor der Transfektion der ES-Zellen muss daher die *ES-DTRfrtCre*-PCR mit den Oligonukleotid-Startermolekülen *up-ES-DTRfrtCre* und *down-ES-DTRfrtCre* etabliert werden (Kap. 3.1.8). Um die Situation im Cx57-Lokus homolog rekombinierter ES-Zellklone zu simulieren und damit die Etablierung der *ES-DTRfrtCre*-PCR zu ermöglichen, wurde der PCR-Testvektor *pKW-DTRfrtCre PCR-Test* (Abb. 4.30) hergestellt. Dabei wurde in die *PmlI*-Schnittstelle des Vektors *pKW-DTRfrtCre* ein 3 kb-Fragment kloniert, welches den 5'-Bereich des Cx57-Lokus über die homologe Region hinaus stromaufwärts verlängert. Das 3 kb-Fragment wurde über eine *PmlI-NcoI*-Spaltung des *Clal-Subklon*-Vektors (Sonja Hombach, Diplomarbeit 2004) gewonnen. Zur Ligation in den Vektor *pKW-DTRfrtCre* wurde der *NcoI*-Überhang geglättet.

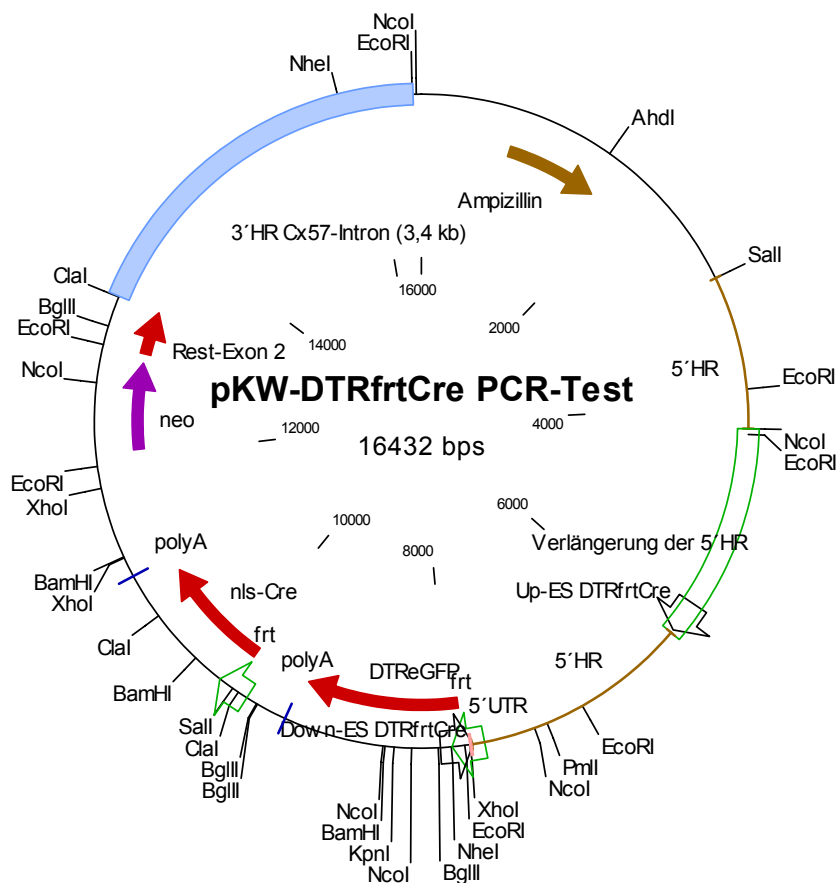


Abb. 4.30: Der PCR-Test-Vektor *pKW-DTRfrtCre PCR-Test*. Zusätzlich eingezeichnet sind die Hybridisierungsstellen der Oligonukleotid-Startermoleküle *Up-ES-DTRfrtCre* und *Down-ES-DTRfrtCre* in den über die 5'-homologe Region hinaus stromaufwärts verlängerten Bereich des Cx57-Lokus und in die kodierende Region des DTR.

4.4.1.4 Etablierung der *ES-DTRfritCre*-PCR

Mit dem PCR-Testvektor *pKW-DTRfritCre PCR-Test* als Matrize wurde die *ES-DTRfritCre*-PCR etabliert (Abb. 4.31). Sie führt zu einem 2,1 kb großen Amplikon. Die Etablierung erfolgte in Anwesenheit von genomischer DNS aus Wildtyp-HM1-Zellen in den PCR-Ansätzen.

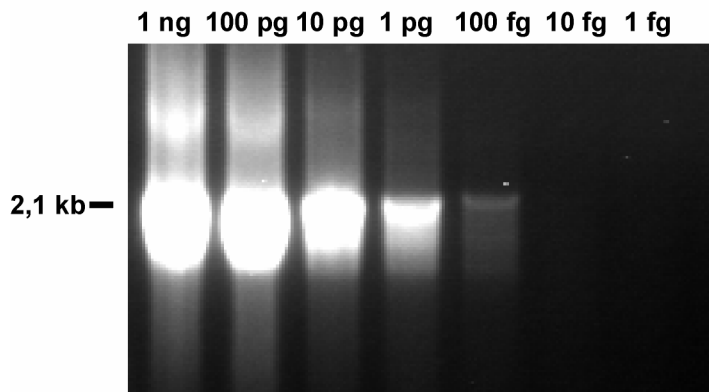


Abb. 4.31: Etablierung der ES-Zell-PCR *ES-DTRfritCre*. Der zu amplifizierende Bereich hat eine Größe von 2,1 kb. Der PCR-Testvektor lässt sich bis zu einer Menge von 100 fg im PCR-Ansatz in Anwesenheit von genomischer HM1-DNS nachweisen.

Mithilfe der *ES-DTRfritCre*-PCR wird das 2,1 kb große Amplikon bis zu einer Vektormenge von 100 fg im PCR-Ansatz nachgewiesen.

4.4.1.5 Strategie für die Southern Blot-Analyse PCR-positiver ES-Zellklone

Die ES-Zellklone, die anhand der *ES-DTRfritCre*-PCR als positiv für eine homologe Rekombination identifiziert werden, müssen analog zu dem Vorgehen in Kap. 4.1.1.3 mithilfe einer Southern Blot-Hybridisierung weiter charakterisiert werden. Abb. 4.32 zeigt den Cx57-Lokus nach der homologen Rekombination mit dem Austauschvektor *pKW-DTRfritCre* im Vergleich zum Cx57-Wildtyp-Lokus. Dargestellt sind die Hybridisierungsstellen der Oligonukleotid-Startermoleküle *Up-ES-DTRfritCre* und *Down-ES-DTRfritCre* der *ES-DTRfritCre*-PCR und die Southern Blot-Strategie. Die PCR überprüft das korrekte Einbringen von *pKW-DTRfritCre* in den 5'-Bereich des Cx57-Lokus. Anhand der Southern Blot-Hybridisierung kann die homologe Rekombination in den Cx57-3'-Bereich analysiert werden. Durch eine Spaltung der genomischen DNS mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI und der Verwendung einer 3'-externen Sonde wird für das veränderte Cx57-Allel homolog rekombinierter Klone, das *Cx57 DTRfritCre*-Allel, ein 14,2 kb großes Fragment nachgewiesen. Das Cx57 Wildtyp-Allel liefert hingegen ein 20,8 kb großes Fragment. Die 3'-externe Sonde muß mithilfe einer PCR mit entsprechend abgeleiteten Oligonukleotid-Startermolekülen aus genomischer Wildtyp-Maus-DNS amplifiziert werden, da der Bereich stromabwärts der 3'-homologen Region nicht kloniert vorliegt. Mit einer internen Sonde, z.B. einem ca. 400 bp großen *Pst*I-*Nco*I-Fragment aus der neoR-Kassette, wird überprüft, ob der Austauschvektor *pKW-DTRfritCre* zusätzlich an anderen Stellen in das ES-Zellgenom inserierte.

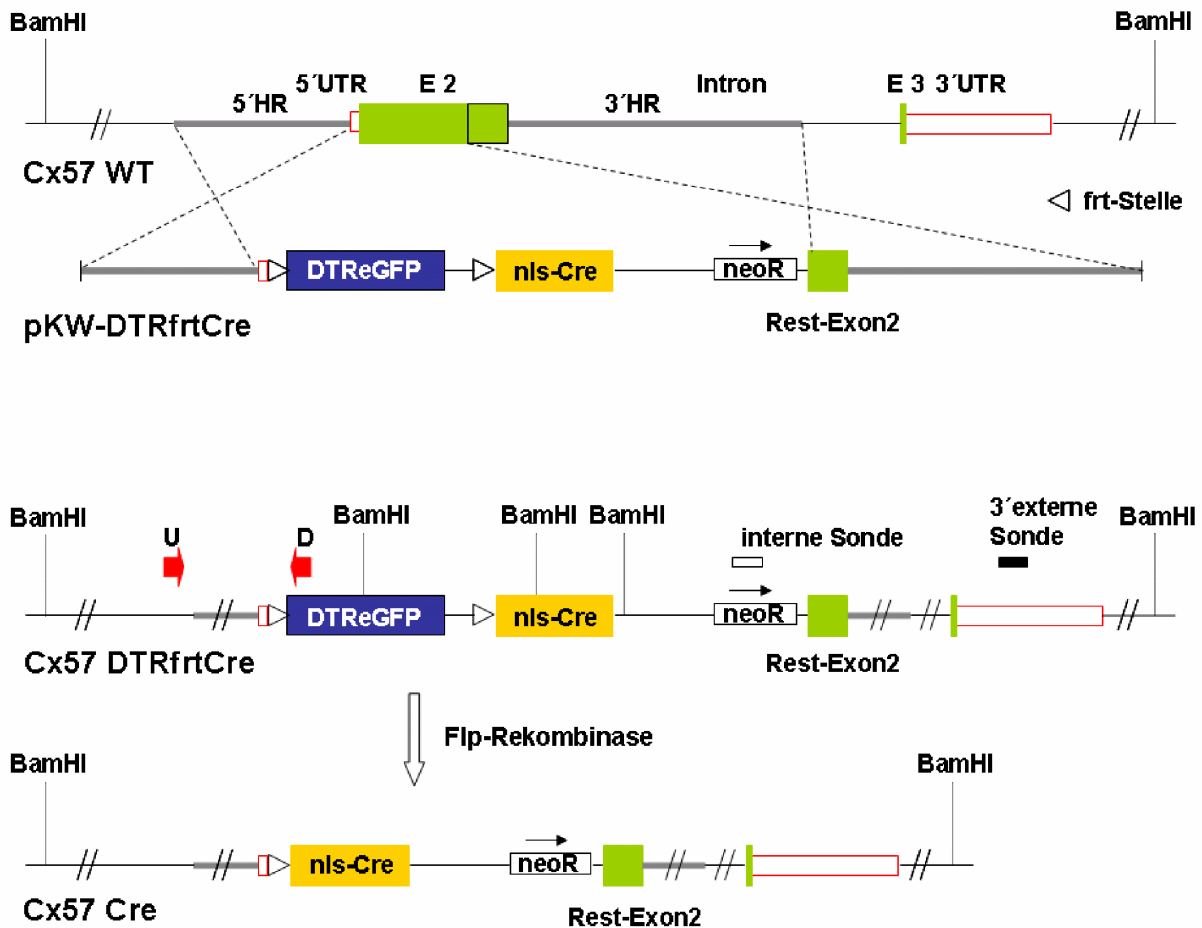


Abb. 4.32: Homologe Rekombination des Austauschvektors *pKW-DTRfrtCre* in den *Cx57*-Wildtyploкус (*Cx57 WT*). Dargestellt ist auch der resultierende Genotyp *Cx57 DTRfrtCre*, der durch Flp-vermittelte Deletion zu dem Genotyp *Cx57 Cre* wird. Für die Analyse PCR-positiver ES-Zell-Klone ist die Betrachtung des *Cx57*-Lokus vor und nach der homologen Rekombination von Interesse (*Cx57 WT* und *Cx57 DTRfrtCre*). Die Hybridisierungsstellen der Oligonukleotid-Startermoleküle *Up-ES-DTR* (U) und *Down-ES-DTR* (D) der *ES-DTRfrtCre*-PCR sind eingezeichnet. Anhand einer Southern-Blot-Analyse der *Bam*HI-gespaltenen genomischen DNS mit einer 3'externen Sonde lässt sich die homologe Rekombination im 3'-Bereich analysieren. Die Verwendung einer internen Sonde gibt Auskunft über die Häufigkeit der Insertion von *pKW-DTRfrtCre*.

4.4.2 Simulation der Situation in der Maus: Überprüfung der Funktionalität des *DTRfrtCre*-Konstruktes im Zellkulturmodell

Vor der Transfektion von ES-Zellen mit dem Austauschvektor *pKW-DTRfrtCre* zur Herstellung einer induzierbaren horizontalzellablatierenden Mausmutante wurde das *DTRfrtCre*-Konstrukt im Zellkulturmodell auf seine Funktionalität hin analysiert. Dazu wurden die beiden Testvektoren *pMJ-DTRfrtCre* und *pMJ-Cre* hergestellt. Mithilfe dieser Testvektoren wurde nach transients Transfektion von N2A- bzw. HM1-ES-Zellen die Expression und Funktionalität des DTReGFP-Fusionsproteins sowie die Expression und Aktivität der Cre-Rekombinase überprüft.

4.4.2.1 Herstellung der Testvektoren *pMJ-DTRfritCre* und *pMJ-Cre*

Herstellung des Testvektors *pMJ-DTRfritCre*: Das Rückgrat für den Testvektor *pMJ-DTRfritCre* stellte der eukaryotische Expressionsvektor *pMJ-Green* (Joachim Degen, Dissertation 2003) dar. In diesem Vektor befindet sich das Reportergen eGFP stromabwärts des in eukaryotischen Zellen prinzipiell stark aktiven *Cytomegalovirus* (CMV)-Promotors. Über eine *ApaI-NotI*-Spaltung wurde das eGFP-Gen aus *pMJ-Green* entfernt. Ebenfalls mithilfe dieser Enzyme wurde das *DTRfritCre*-Konstrukt aus dem Zwischenvektor *pBSKneuXhoI_frit-DTReGFP-nls-Cre-polyA SmaI* ausgeschnitten und über kohäsive Enden in den geöffneten Expressionsvektor *pMJ-Green* ligiert. Somit sollte nach Transfektion einer eukaryotischen Zelllinie mit dem resultierenden Vektor *pMJ-DTRfritCre* (Vektorkarte s. Anhang) das Fusionsprotein DTReGFP unter Kontrolle des CMV-Promotors ausgeprägt werden.

Herstellung des Testvektors *pMJ-Cre*: Um die Cre-Rekombinase des *DTRfritCre*-Konstruktes nach Deletion der geflirteten *DTReGFP*-Kassette im Zellkulturmodell auszuprägen, wurde der Testvektor *pMJ-DTRfritCre* in *Flp-E.coli*-Bakterien (Kap. 4.4.1.2) transformiert. Dort wurde er zu dem Testvektor *pMJ-Cre* rekombiniert (Vektorkarte s. Anhang). Beide Testvektoren *pMJ-DTRfritCre* und *pMJ-Cre* wurden vor dem Einsatz in der Zellkultur mittels Restriktionsspaltungen kontrolliert (nicht gezeigt).

4.4.2.2 Transiente Transfektion von N2A-Zellen mit dem Testvektor *pMJ-DTRfritCre*

Die Funktionalität der DTReGFP-Kassette des Konstruktes *DTRfritCre* in dem Vektor *pMJ-DTRfritCre* wurde in N2A-Zellen untersucht. Die Transfektion von N2A-Zellen durch Lipofektion mit dem Reagenz Lipofectamine 2000™ ist hocheffizient. Darüber hinaus weist der in dem Vektor *pMJ* vorliegende CMV-Promotor in dieser Neuroblastomzelllinie eine starke Aktivität auf. In allen Versuchen wurden die Zellen jeweils nur transient transfiziert, d.h. die Experimente fanden in einem Zeitraum von fünf Tagen nach der Transfektion statt, ohne dass die transfizierten Zellen zuvor einer Selektion ausgesetzt waren. Die transiente Transfektion ermöglicht eine äußerst rasche Analyse der Expression transfizierter Konstrukte. In dem durchgeführten Versuchsansatz wurden mehrere N2A-Kulturen mit dem Vektor *pMJ-DTRfritCre* mittels Lipofektion transfiziert (Kap. 3.3.5). Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst auf eine erfolgreiche Aufnahme des *pMJ-DTRfritCre*-Vektors hin analysiert. Erfolgreich transfizierte Zellen zeigten Fluoreszenzsignale durch die Ausprägung des DTReGFP-Fusionsproteins (Abb. 4.33). Am zweiten Tag nach der Transfektion wurde zu einem Teil der transfizierten Zellen das Diphtherietoxin (DT) in einer Konzentration von 10 µg/ml zum Kulturmedium gegeben. Anschließend wurden die eGFP-Fluoreszenz, das Wachstumsverhalten und die Morphologie dieser Zellen über weitere drei Tage beobachtet (Abb. 4.33 und 4.34). Parallel zu den transfizierten, in Gegenwart von DT kultivierten Zellen wurden Kontrollen mitgeführt: (1) transfizierte Zellen, denen kein DT appliziert wurde, um die

eGFP-Fluoreszenz zu protokollieren, (2) nicht-transfizierte N2A-Zellen, die DT erhielten, um das Wachstumsverhalten von Wildtyp-N2A-Zellen in Anwesenheit von DT zu analysieren.

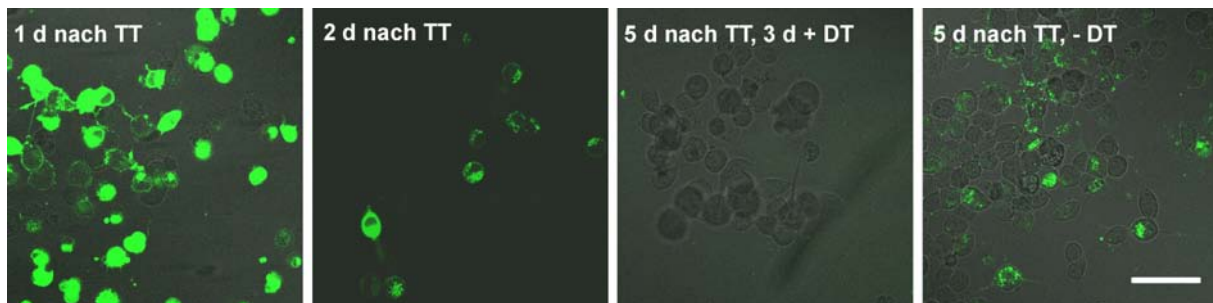


Abb. 4.33: Transiente Transfektion (TT) von N2A-Zellen mit dem Testvektor *pMJ-DTRfrtCre* und Applikation von DT. Einen Tag nach der transienten Transfektion betrug die Transfektionseffizienz 50 – 75 %. Anschließendes Passagieren der Zellen und Kultivieren auf einem größeren Schalenboden führte zu einer geringeren Konfluenz der Zellen. Alle angewachsenen Zellen zeigten jedoch mehr oder weniger stark ausgeprägte eGFP-Fluoreszenzsignale. Nach drei Tagen Kultivierung in DT-haltigem Medium waren im Gegensatz zu nicht mit DT-behandelten transfizierten Zellen keine Fluoreszenzsignale mehr zu sehen; die Konfluenz war deutlich geringer. Maßstabsbalken: 50 μ m

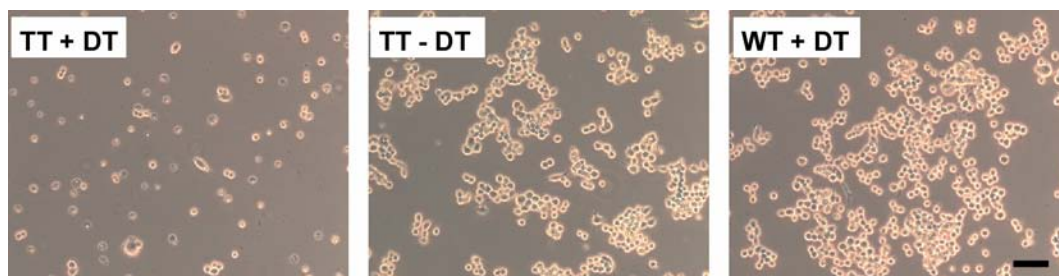


Abb. 4.34: Transiente Transfektion von N2A-Zellen mit dem Testvektor *pMJ-DTRfrtCre* und Applikation von DT. Die Auswertung der Konfluenz und Zellmorphologie erfolgte 30 h nach Applikation von DT zum Medium am Durchlichtmikroskop. 30 h Kultivierung in DT-haltigem Medium führte zu einer drastischen Abnahme der Konfluenz der transfizierten Zellen im Gegensatz zu nicht mit DT behandelten Transfektanten bzw. mit DT behandelten Wildtyp-N2A-Zellen. Auch die Zellmorphologie wies deutliche Unterschiede zwischen den in Anwesenheit von DT kultivierten transfizierten Zellen und ihren Kontrollen auf. TT: mit dem Testvektor *pMJ-DTRfrtCre* transient transfizierte Zellen; WT: untransfizierte N2A-Wildtyp-Zellen; + DT: 30h nach Zugabe von Diphtherie-Toxin (10 μ g/ml) zum Medium; - DT: ohne Zugabe von Diphtherie-Toxin zum Medium. Maßstabsbalken: 40 μ m.

Die Transfektion der N2A-Zellen mit dem Vektor *pMJ-DTRfrtCre* war erfolgreich. Einen Tag nach der Transfektion wiesen 50 – 75 % der transfizierten Zellen eGFP-Fluoreszenzsignale unterschiedlich starker Intensität auf. Häufig fanden sich stark fluoreszierende Signale in der Zellkernperipherie. Weniger starke Fluoreszenzsignale waren unterhalb oder in der Plasmamembran lokalisiert. Nach dem Umsetzen auf größere Kulturschalen schienen die am stärksten fluoreszierenden Zellen vom Vortag abgestorben bzw. nicht angewachsen zu sein.

Alle adhärenz wachsenden Zellen zeigten nun jedoch eGFP-Signale in mehr oder weniger starker Intensität. Drei Tage nach der Transfektion bzw. 30 h nach der Applikation des Diphtherietoxins war ein deutlicher Unterschied in der Konfluenz und Zellmorphologie der transient transfizierten, in Gegenwart des DT kultivierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen zu erkennen (Abb. 4.33): Alle drei Schalen der transient transfizierten, in DT-haltigem Medium kultivierten N2A-Zellen besaßen eine Konfluenz von 5 – 10 %. Die noch lebenden Zellen waren rund und wiesen apoptotische Vesikel auf. Im Gegensatz dazu wuchsen die Zellen auf den Kontrollschalen mit einer Konfluenz von 30 % bzw. 40 – 50 % und sahen vital aus. Fünf Tage nach Transfektion und drei Tage in Anwesenheit von DT bedeckten die transient transfizierten N2A-Zellen nur noch 5 % des Schalenbodens. Sie sahen „kränklich“ aus. Keine der noch lebenden Zellen wies eGFP-Fluoreszenzsignale auf (Abb. 4.33). Im Gegensatz dazu zeigten die transient transfizierten, in Abwesenheit von DT kultivierten Zellen eine 50 - 60 %ige Konfluenz und wirkten vital. Bis zu 75 % dieser Zellen besaßen noch Fluoreszenzsignale, wenn auch nicht mehr so stark ausgeprägt wie etwa zwei Tage nach der Transfektion. Die nicht-transfizierten und in Gegenwart von DT kultivierten Zellen zeigten eine Konfluenz von 60 – 70 % und sahen ebenfalls vital aus. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse gibt Tab. 4.3.

h nach trans. Transfekt.	h in DT-Med.	TT + DT (3 Schalen)	TT – DT (3 Schalen)	WT + DT (1 Schale)
Transfektion mit <i>pMJ-DTRfrtCre</i>	-	50 – 70 % Konfluenz		
29 h	-	≥ 90 % Konfluenz; Transfektionseffizienz 50 – 75 %; anschl. Hochsetzen der Zellen von 6 cm- auf 10 cm-Schalen		≥ 90 % Konfluenz; anschl. Hochsetzen d. Zellen von 6 cm- auf 10 cm-Schale
46 h	Applikation v. DT (10 µg/ml)	20 – 30 % Konfluenz; stark fluoreszierende Zellen vom Vortag scheinen abgestorben oder nicht angewachsen zu sein; alle angewachsenen Zellen zeigen eGFP-Signale		40 – 50 % Konfluenz
76 h	30 h	5 – 10 % Konfluenz; viele tote Zellen; angewachsene Zellen sind rund und zeigen apoptotische Vesikel	30 % Konfluenz; kaum tote Zellen; Zellen sehen vital aus	40 – 50 % Konfluenz; kaum tote Zellen; Zellen sehen vital aus
120 h	70 h	5 % Konfluenz; Zellen zeigen apoptotische Vesikel; keine der noch lebenden Zellen weist eGFP-Fluoreszenz-Signale auf	50 – 70 % Konfluenz; Zellen sehen vital aus; ca. 75 % der Zellen weisen eGFP-Fluoreszenz-Signale auf	60 – 70 % Konfluenz

Tab. 4.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Diphtherietoxin-Applikation. N2A-Zellen wurden mit dem Vektor *pMJ-DTRfrtCre* transient transfiziert. h nach trans. Transfekt.: Anzahl der Stunden nach der transienten Transfektion; h in DT-Medium: Anzahl der Stunden, die die Zellen in Diphtherietoxin (DT)-haltigem (10 µg/ml) Medium kultiviert wurden; TT + DT: Konfluenz und Morphologie der transient transfizierten, in Anwesenheit von DT kultivierten N2A-Zellen; TT – DT: Konfluenz und Morphologie der transient transfizierten, in Abwesenheit von DT kultivierten N2A-Zellen; WT + DT: Konfluenz und Morphologie der in Anwesenheit von DT kultivierten Wildtyp-N2A-Zellen.

4.4.2.3 Transiente Transfektion der HM1-Zelllinie *Cx45flox(eGFP)* mit dem Testvektor *pMJ-Cre*

Um die Cre-Rekombinase des Konstruktes *DTRfritCre* hinsichtlich ihrer Ausprägung und Funktionalität zu überprüfen, wurde die embryonale Stammzelllinie *Cx45flox(eGFP)* (Stephan Maxeiner, Dissertation 2005) mit dem Testvektor *pMJ-Cre* transient transfiziert (Kap. 3.3.5). *Cx45flox(eGFP)*-HM1-Zellen besitzen einen veränderten Cx45-Lokus: Auf das geflochte Exon 3 von Cx45 folgt ein eGFP-Reportergen. Wird dieses Exon 3 und damit die kodierende Region von Cx45 durch die Cre-Rekombinase deletiert, gelangt das eGFP-Reportergen unter die Kontrolle des Cx45-Promotors, der in HM1-Zellen aktiv ist. Somit prägen *Cx45flox(eGFP)*-Zellen, bei denen Cx45-Exon 3 deletiert wurde, das eGFP aus und fluoreszieren. Daher eignet sich die ES-Zelllinie *Cx45flox(eGFP)*, um die Ausprägung und Aktivität der Cre-Rekombinase anzuzeigen.

Da nicht bekannt war, ob HM1-Zellen mittels Lipofektion transfiziert werden können und ob der CMV-Promotor des Testvektors *pMJ-Cre* in diesen Zellen aktiv ist, wurde parallel eine Transfektion mit dem *pMJ-CFP*-Vektor durchgeführt. In *pMJ-CFP* liegt das CFP-Gen stromabwärts des CMV-Promotors. Bei ausreichend starker Aktivierung dieses Promotors fluoreszieren transfizierte Zellen durch Ausprägung des CFPs. Als weitere Kontrolle wurden *Cx45flox(eGFP)*-HM1-Zellen mit dem Vektor *pCre-Pac* transfiziert. *pCre-Pac* exprimiert die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des in HM1-Zellen aktiven PGK-Promotors (Taniguchi et al., 1998) und wurde bereits erfolgreich zur Deletion gefloxter Gene in der ES-Zellkultur eingesetzt (Joachim Degen, Dissertation 2003). Drei Tage nach der Transfektion mit den Vektoren *pMJ-Cre*, *pMJ-CFP* bzw. *pCre-Pac* wurden die *Cx45flox(eGFP)*-Zellen auf Fluoreszenzsignale hin analysiert (Abb. 4.35).

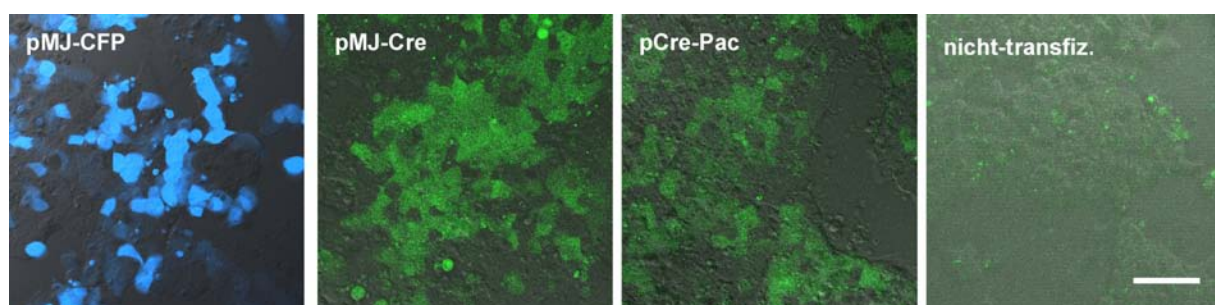


Abb. 4.35: Transiente Transfektion von HM1-Zellen der Linie *Cx45flox(eGFP)* mit dem Vektor *pMJ-Cre* und Kontrollvektoren. Die eGFP-Fluoreszenz der *pMJ-Cre*-transfizierten ES-Zellen zeigt, dass die Cre-Rekombinase im *DTRfritCre*-Konstrukt nach Deletion der geflochtenen DTReGFP-Kassette exprimiert wird und funktionell aktiv ist. Nicht-transfizierte (nicht-transfiz.) Zellen dienen als Negativ-, *pCre-Pac*-transfizierte Zellen als Positivkontrolle. Eine Aufnahme des Vektors *pMJ-CFP* in etwa 75% der ES-Zellen demonstriert die Effizienz der Transfektionsmethode und die Stärke des CMV-Promotors. Maßstabsbalken: 50 μm .

HM1-Zellen wurden erfolgreich mittels Lipofektion transfiziert. Die Aktivität des CMV-Promotors in dem Vektor *pMJ-CFP* führt zu einer deutlichen Ausprägung des CFP, wobei die Expressionsstärke in den Zellen schwankt. Die Transfektionseffizienz beträgt bis zu 75 %.

Wie bei dem Vektor *pCre-Pac* bewirkt die Aufnahme des *pMJ-Cre*-Vektors durch die *Cx45flox(eGFP)*-Zellen, dass sie eGFP ausprägen. Das gefloxe Exon 3 von Cx45 wurde durch die Cre-Rekombinase des ursprünglichen *DTR^{ftr}Cre*-Konstruktes deletiert. Nicht-transfizierte *Cx45flox(eGFP)*-Zellen zeigen keine Fluoreszenz.

5 DISKUSSION

5.1 Projekt I: Eigenschaften der konditional Cx36-defizienten *Cx36flox(CFP)*-Mausmutante

Mit den vorliegenden Daten zur Charakterisierung der *Cx36flox(CFP)*-Maus lassen sich die gewünschten Eigenschaften einer konditional Cx36-defizienten Mutante eindeutig belegen: Die Southern Blot-Analyse mit 3' externer und interner Sonde zeigte, dass die durch die Flp- und die Cre-Rekombinase vermittelten genomischen Rekombinationen im *Cx36flox(CFP)*-Lokus stattfinden (Abb. 4.5). Die *frt*- und *loxP*-Erkennungsstellen werden durch die jeweilige Rekombinase erkannt und führen zur Deletion der flankierten Region. Dies wird zusätzlich durch die PCRs *KW-Maus* und *KW-neo* bestätigt, bei denen es nach der Deletion zu einem entsprechenden Amplikon kommt (Abb. 4.3). Auf der Ebene der Genexpression sollte überprüft werden, ob Cx36 in Anwesenheit der *loxP*-Erkennungssequenzen ausgeprägt wird. Dies war bei der ersten konditional Cx36-defizienten Mausmutante *Cx36flox(lacZ)* nicht der Fall (Joachim Degen, Dissertation 2003). Dort kam es nicht zu einer Transkription des von *loxP*-Erkennungssequenzen flankierten Cx36-Gens und dementsprechend nicht zu einer Ausprägung des Cx36-Proteins. Die 5'-*loxP*-Stelle befand sich dabei im Intron zwischen den beiden kodierenden Exons des Cx36-Gens. Möglicherweise wurde dadurch eine noch unbekannt regulatorische Sequenz zerstört, die entscheidend für die Expression von Cx36 ist. Daher wurde die 5'-*loxP*-Erkennungssequenz bei der Konstruktion des Austauschvektors für die neue konditional Cx36-defiziente Maus *Cx36flox(CFP)* in den 5'-UTR-Bereich positioniert. Bei der RT-PCR-Analyse mit Gehirn-RNS der verschiedenen aus der *Cx36flox(CFP)*-Maus resultierenden Genotypen wurde deutlich, dass eine Transkription von Cx36 im Gehirn von *Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}*-Mäusen vorliegt, d.h. Cx36 wird von den geflochten Cx36-Allelen exprimiert (Abb. 4.6). Erwartungsgemäß unterbleibt die Transkription nach ubiquitärer homozygoter Deletion von Cx36 durch die PGK-Cre-Rekombinase (Lallemand et al., 1998) in Mäusen des Genotyps *Cx36^{CFP/CFP}*. Die Cx36-Immunfluoreszenzanalyse von Retinageschnitten der verschiedenen Genotypen bestätigt diese Befunde auf Proteinebene (Abb. 4.7). Hier wurde darüber hinaus gezeigt, dass Cx36 auch zelltypspezifisch durch die in neuronalen Vorläuferzellen aktive Nestin-Cre-Rekombinase (Tronche et al., 1999) deletiert wird. Mittels Cx36-Immunpräzipitationen von Retinalysaten wurde die Stärke der Ausprägung des Cx36-Proteins in den verschiedenen Genotypen miteinander verglichen (Abb. 4.8). Die Expression von Cx36 im geflochten Zustand ist um ca. 50 % reduziert. Eine Reduktion der Expressionsstärke in Anwesenheit von *loxP*-Erkennungssequenzen wurde bereits für Cx43 gezeigt (Theis et al., 2001). In dem Genotyp *Cx36^{lacZ/flox(CFP)}:Nestin-Cre* erscheint in der Immunpräzipitation eine sehr schwache Bande nach einer längeren Exposition des Röntgenfilms (nicht gezeigt). Wahrscheinlich geht dies auf die Expression von Cx36 durch retinale Mikrogliazellen zurück (Dobrenis et al., 2005). Retinale Mikrogliazellen

entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen (Chen et al., 2002). Die Nestin-Cre-Rekombinase sollte daher in diesem Zelltyp nicht ausgeprägt sein. Dies untermauert die zelltypspezifische Deletion von Cx36 in neuronalen Zellen durch das Nestin-Cre-Transgen.

Die Deletion von Cx36 hat auch eine funktionelle Bedeutung: So ist die Glyzin-Kopplung zwischen AII-Amakrin- und ON-Zapfen-Bipolarzellen in der Retina von Cx36^{CFP/CFP}-Mäusen und von Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}:Nestin-Cre-Mäusen gestört, wohingegen sie in homozygot geflochten Tieren noch aufrechterhalten ist (Abb. 4.13). Die Glyzin-Färbung ist hier etwas weniger stark als in Wildtyp-Mäusen, was sich vermutlich auf die Reduktion der Cx36-Expression in Anwesenheit der loxP-Stellen zurückführen lässt.

Analysen der Expression des Reportergens CFP auf Transkript- und Proteinebene ergaben, dass CFP sowohl nach PGK-Cre- als auch nach Nestin-Cre-vermittelter Deletion von Cx36 ausgeprägt wird. In vitalen Retinadickschnitten wurde die CFP-Fluoreszenz in Bipolar- und Amakrinzellen der Inneren Nukleären Schicht (INS) deutlich (Abb. 4.11). Auch in Immunfluoreszenzanalysen von Retina-Gefrierschnitten waren diese Zellen positiv für CFP (Abb. 4.12). Bei der Darstellung des CFPs mithilfe von Antikörpern besteht ein günstigeres Signal-/Hintergrund-Verhältnis als bei der Visualisierung des CFPs durch seine eigene Fluoreszenz, wodurch der Nachweis sensitiver wird. In Cx36flox(lacZ)-Reporter-mäusen mit den Genotypen Cx36^{+lacZ} bzw. Cx36^{+flox(lacZ)}:Nestin-Cre wurde die Deletion von Cx36 auch in Zellen der Ganglienschicht, den alpha-Ganglienzellen (Schubert et al., 2005), durch lacZ-Signale angezeigt (Abb. 4.12). Trotz unterschiedlicher Fixierungs- und Blockierungsbedingungen wurde das CFP in Cx36flox(CFP)-Mäusen nach Cre-vermittelter Deletion nie mittels Antikörpern in diesen Zellen nachgewiesen. Auch die CFP-Fluoreszenz selbst konnte nicht dargestellt werden (Dr. Timm Schubert, persönl. Mitteilung). Ähnliche Probleme traten vereinzelt auch in Cx45flox(eGFP)-Mäusen auf, wo das eGFP teilweise nur schwierig in den bistratifizierenden Ganglienzellen erkannt werden konnte (Dr. Stephan Maxeiner, persönl. Mitteilung). Die Ursache dafür ist unbekannt. Die fehlende Nachweisbarkeit von CFP-positiven Zellen in den Stäbchen der Äußeren Nukleären Schicht (ÄNS) ist wahrscheinlich auf die geringe Expressionsstärke des Cx36-Promotors in diesem Zelltyp zurückzuführen. Auch die lacZ-Signale sind an dieser Stelle in Mäusen mit dem Genotyp Cx36^{+lacZ} bzw. Cx36^{+flox(lacZ)}:Nestin-Cre nur schwach ausgeprägt.

Der CFP-Immunoblot mit Retinalysaten deutet darauf hin, dass das CFP zu einem geringen Anteil bereits in Anwesenheit des von loxP-Erkennungsstellen flankierten Bereiches exprimiert wird (Abb. 4.10). Es wurden jedoch nie CFP-positive Zellen in der Retina von Cx36^{+flox(CFP)}- oder Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}-Mäusen entdeckt. Wahrscheinlich ist die CFP-Expression des geflochten Allels pro Zelle so gering, dass sie erst im Retinalysat-Immunoblot aufsummiert in einer schwachen Bande nachgewiesen werden kann.

Zum Zeitpunkt der Versuche existierten nur wenige Mäuse, in denen die von frt-Erkennungsstellen flankierte neo-Kassette deletiert war. Es wurde jedoch ermittelt, dass das Cx36-Protein auch nach Deletion des Selektionsmarkers in Anwesenheit der loxP-Erkennungssequenzen von dem Cx36floxAneo(CFP)-Allel ausgeprägt wird (nicht gezeigt). In Mäusen mit dem

Genotyp $Cx36^{+/flox\Delta neo(CFP)}$ gibt es keinen Hinweis auf eine CFP-Expression. Anscheinend begünstigt die Anwesenheit der neoR-Kassette die ektopische Ausprägung des CFPs. Ob der starke PGK-Promotor von neoR dafür verantwortlich ist, kann nicht mit Sicherheit entschieden werden. Er ist in entgegengesetzter Richtung zu dem CFP-Gen orientiert. Es sind Mausmutanten bekannt, bei denen es in Abwesenheit der neoR-Kassette zu einer unerwünschten Expression des Reportergens kommt (Joachim Degen, Dissertation 2003; Maria Kreuzberg, persönl. Mitteilung). In diesem Fall wird die neo-Kassette in der Mausmutante nicht deletiert, damit die Reporterausprägung ein zuverlässiger Indikator für die Deletion des entsprechenden Gens bleibt.

Um die Verlässlichkeit des CFP-Reporters zu analysieren, wurde die CFP-Expression auch in Gehirnen von $Cx36flox(CFP)$ -Mäusen nach ubiquitärer PGK-Cre-vermittelter Deletion des Cx36-Gens untersucht. Das CFP ließ sich im Gehirn nicht anhand seiner eigenen Fluoreszenz darstellen, da sie durch die Eigenfluoreszenz des Gewebes, vermutlich hauptsächlich verursacht durch das Pigment Lipofuscin, überdeckt wurde. Mit zunehmendem Alter akkumuliert Lipofuscin im Zytoplasma vieler Zellen, einschließlich der Neurone (Goyal, 1982). Lipofuscin hat ein Exzitations- und Emissionsspektrum (Mochizuki et al., 1995), das mit den Spektren der meisten Fluorophore überlappen kann. Somit beeinträchtigt Lipofuscin die Fluoreszenzmikroskopie im ZNS erheblich. Daher wurden insbesondere immunhistochemische Analysen unternommen, durchgeführt von Prof. James Deuchars, Leeds, England. Der Nachweis des CFPs im Gehirn ist auf diese Weise sehr sensitiv. Die CFP-Expression wurde in allen Gehirnregionen dokumentiert, in denen eine Ausprägung des Cx36 beschrieben wurde (Abb. 4.14). Da sich das CFP im gesamten Zytoplasma einer Zelle befindet, wird bei einem Nachweis dieses Reporterproteins der gesamte Zellkörper, teilweise sogar das Axon, markiert. Anders als bei einer lacZ-Färbung, bei der sich ein blauer Niederschlag nur im oder am Zellkern ergibt, kann auf diese Weise die einzelne CFP-positive Zelle besser identifiziert und morphologisch charakterisiert werden.

Die $Cx36flox(CFP)$ -Mausmutante erfüllt alle Anforderungen, um eine konditionale Deletion von Cx36 zu erzielen. Daher wurde sie für weitere Analysen mit zelltypspezifischen bzw. zelltypspezifisch-induzierbaren Cre-transgenen Mäusen verpaart.

5.2 Deletion gefloxter Gene durch zelltypspezifische Cre-Rekombinasen

Bei der Verwendung von Cre-transgenen Mäusen muss sorgfältig überprüft werden, in welchem Zelltyp die Cre-Rekombinase ausgeprägt wird und aktiv ist. Wird die Expression der Cre-Rekombinase von einem Promotor X kontrolliert, lässt sich nicht unbedingt anhand des Expressionsmusters des Gens, das endogen von X kontrolliert wird, vorhersagen, in welchen Zelltypen es durch die Cre-Rekombinase zu einer genomischen Rekombination der von loxP-Stellen flankierten Bereiche kommt und in welchen nicht. Aus Zeitgründen werden die meisten Cre-transgenen Mäuse durch Vorkerninjektion erzeugt (s. Kap. 1.10.1). In die zu

injizierenden Vektorkonstrukte kann nur ein Teil des eigentlichen Promotors vor die kodierende Region der Cre-Rekombinase kloniert werden, wodurch seine zelltypspezifische Aktivität unter Umständen modifiziert wird. Selbst bei BAC-Konstrukten, die große Promotorbereiche aufnehmen können, kann die genomische Umgebung, in die der Vektor zufällig inseriert, die Zelltypspezifität und Stärke des Promotors und damit die Expression und Aktivität der Cre-Rekombinase beeinflussen. Darüber hinaus kann die genomische Insertion vieler Kopien eines Konstruktes als Konkatemere die Ausprägung des Transgens vermindern (Garrick et al., 1998; Henikoff, 1998). Die genannten Probleme werden durch die Erzeugung von Cre-transgenen Mäusen mithilfe der homologen Rekombination umgangen. Indem der Promotor *in situ* genutzt wird, ist die Wahrscheinlichkeit einer verlässlichen Zelltypspezifität und Stärke der Cre-Rekombinase-Ausprägung höher. Der Nachteil dabei ist, dass der Verlust des Gens, das durch das Cre-Transgen ersetzt wird, selbst einen Phänotyp verursachen und damit weitere Analysen verfälschen kann.

Nur dort, wo die Aktivität der Cre-Rekombinase mit einer Expression des entsprechenden geflochten Gens zusammenfällt, wird die Ausprägung des kodierten Proteins durch eine Deletion des Gens irreversibel gestoppt, und seine Funktion geht verloren. Für eine Cre-vermittelte Deletion bewährt sich daher in jedem Fall ein Reporter gen, welches wie in der *Cx36^{flox}(CFP)*-Mausmutante die Inaktivierung des jeweiligen Gens anzeigt. Damit ist nicht nur die Frage beantwortet, in welchen Zellen eine bestimmte Cre-Rekombinase aktiv ist, sondern auch in welchen Zellen sie die Ausprägung eines bis dahin aktiven Gens unterbindet.

5.2.1 Induzierte Deletion von Cx36 in adulten Mäusen durch das PrP-CreER^T-Transgen

Durch das Vorliegen einer konditional Cx36-defizienten Mausmutante wurde eine Untersuchung der ursprünglich gestellten Frage möglich, welcher Phänotyp durch eine entwicklungsunabhängige Deletion von Cx36 in adulten Mäusen hervorgerufen wird. Beispielsweise könnten die Oszillationen in der inferioren Olive, die auch in Cx36-Defekt-Mäusen trotz fehlender elektrotonischer Kopplung auftreten, auf Kompensationsmechanismen während der Ontogenese zurückgeführt werden (De Zeeuw et al., 2003). Mit Beginn der Geschlechtsreife sechs Wochen nach der Geburt wird eine Maus als adult bezeichnet.

Durch Verpaarung von *Cx36^{flox}(lacZ)*-Reporter-mäusen mit PrP-CreER^T-transgenen Mäusen und anschließender Tamoxifen-vermittelter Induktion der adulten Nachkommen wurde deutlich, dass die induzierte Cre-Rekombinase unter dem in Neuronen aktiven Prionprotein-Promotor zu einer Ausprägung des lacZ in der Retina führt, nahezu wie es auch in ubiquitär Cx36-deletierten Mäusen mit dem Genotyp *Cx36^{+lacZ}* der Fall ist (Abb. 4.15). Dieser Befund wies darauf hin, dass das PrP-CreER^T-Transgen wie gewünscht zu einer induzierten Deletion des geflochten Cx36 in Cx36-ausprägenden Zellen führt. Bei Tamoxifen-induzierten Mäusen mit dem Genotyp *Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}:PrPCreERT* war auf genomischer Ebene eine Deletion von Cx36 zu beobachten (Abb. 4.16). Es waren jedoch weder CFP-positive Zellen (Abb.

4.15) noch eine signifikante Herabregulation der Cx36-Ausprägung (Abb. 4.17) nachweisbar, so dass das PrP-CreER^T-Transgen Cx36 deletiert, jedoch nicht in Zellen, die Cx36 ausdrücken. Die Effizienz der Rekombination durch das Cre-ER^T-Transgen ist abhängig von der Dosis des Induktors und von der Länge der Inkubationszeit (Vooijs et al., 2001; Schwenk et al., 1998). Doch auch die Applikation der doppelten Menge Tamoxifen pro Maus und Tag sowie längere Inkubationszeiten nach der letzten Tamoxifen-Injektion bis zu über vier Wochen hatten keinen oder lediglich einen sehr geringen Effekt (nicht gezeigt). Über die Ursache lässt sich nur spekulieren (s. Kap. 5.2.5). Mithilfe von Cx36^{+/-flox(lacZ)}:PrP-CreERT-Mäusen wurde auch im Gehirn die Induzierbarkeit einer Deletion von Cx36 untersucht (nicht gezeigt). Hier traten nur sehr vereinzelt β -Galaktosidase-positive Zellen auf. Entweder gibt es im Gehirn weniger Cx36-ausprägende Zellen als in der Retina, in denen PrP-CreER^T aktiv ist, oder es ist für den Induktor Tamoxifen schwieriger die Blut-Hirn-Schranke des Gehirns (Ballabh et al., 2004) als die der Retina zu überwinden.

Von einer Verwendung des PrP-CreER^T-Transgens zusammen mit der *Cx36flox(CFP)*-Mausmutante zur Induktion einer Deletion von Cx36 in adulten Mäusen ist für physiologische Fragestellungen abzuraten. Seit der Erstveröffentlichung im Jahr 2001 sind keine weiteren Publikationen erschienen, in denen durch Verwendung der PrP-CreER^T-transgenen Maus von einer induzierten Deletion gefloxter Gene in Neuronen berichtet wurde, wohl jedoch im Hoden (Linie 28.8; Weber et al., 2003).

Um eine Induktion der Deletion von Cx36 in adulten Mäusen zu erreichen, kann alternativ zu der PrP-CreER^T-Maus eine CreER^T-transgene Maus verwendet werden, die die CreER^T-Rekombinase ubiquitär exprimiert, beispielsweise unter Kontrolle des *Cytomegalovirus*-Promotors (Feil et al., 1996) oder des ROSA26-Promotors (Vooijs et al., 2001). Voraussetzung ist, dass das Cre-ER^T-Transgen ausreichend stark in Nervenzellen ausgeprägt wird und aktiv ist. Eine Deletion von Cx36 in anderen Zelltypen des ZNS der Maus hat keine Konsequenzen, da Cx36 im Wesentlichen nur in Neuronen exprimiert wird (Condorelli et al., 1998).

Eine Alternative zum *Cx36flox(CFP)/Cre-CreER^T*-System zur Entkopplung von Neuronen in adulten Mäusen stellt die lokale Applikation von Gap Junction-Kanal-Blockern dar. Durch Injektion von Carbenoxolon in die inferiore Olive von Ratten wurden die Gap Junction-Kanäle zwischen den Olivenneuronen inhibiert (Blenkinsop und Lang, 2006). Gap-Junction-Blocker entkoppeln Zellen jedoch nie vollständig und nicht ausschließlich spezifisch. Sie wirken nicht gezielt auf eine Connexin-Isoform und führen aufgrund ihrer Unspezifität zu Nebeneffekten (Rozental et al., 2001). Placantonakis et al. (2006) erzielten eine Herabregulation der Cx36-vermittelten Kopplung in der inferioren Olive adulter Ratten mittels rekombinanter Lentiviren, die für ein Cx36-Protein mit einer dominant-negativen Mutation kodierten. Dadurch wurde gezeigt, dass Cx36-Gap Junction-Kanäle für die Entstehung von Oszillationen in der inferioren Olive adulter Tiere notwendig sind. Dieser Befund ist ein indirekter Hinweis darauf, dass es, wie von De Zeeuw et al. (2003) vermutet, in

Cx36-Defekt-Mäusen tatsächlich während der Entwicklung zu kompensatorischen Effekten kommt, die einem Verlust dieser Oszillationen entgegenwirken.

In dieser Arbeit konnten keine Erkenntnisse zur Plastizität von elektrischen Synapsen gewonnen werden. Die Kompensation des Verlusts von Cx36 durch eine andere neuronal ausgeprägte Connexin-Isoform, eine *funktionelle Redundanz*, wurde bei einer konventionellen Cx36-Defekt-Mausmutante nicht beobachtet (Deans et al., 2001; Landisman et al., 2002; Long et al., 2002; De Zeeuw et al., 2003).

Eine Untersuchung des Zusammenwirkens von elektrischen und chemischen Synapsen liefert die Arbeit von Urschel et al. (2006). Sie zeigt, dass die Aktivität chemischer Synapsen in der Retina von Mäusen die Aktivität von Cx36-Gap Junction-Kanälen moduliert. Im Zuge der Lichtadaptation hat die Freisetzung des Neurotransmitters Dopamin eine PKA-vermittelte Phosphorylierung von Cx36 zur Folge, wodurch die elektrische Kopplung der AII-Amakrinzellen herabreguliert wird. Im Hypothalamus von Ratten wurde beobachtet, dass die Abnahme der elektrischen Kopplung während der Entwicklung mit einer Aktivierung von NMDA-Glutamat-Rezeptoren zusammenhängt. Aktivierte NMDA-Rezeptoren führen zu einer CREB (*cAMP-response element binding protein*)-vermittelten Herabregulation der Cx36-Expression (Arumugam et al., 2005). Beide Arbeiten demonstrieren somit, dass chemische Synapsen die elektrische Kopplung regulieren können. Eine Einflussnahme *vice versa*, von elektrischen Synapsen oder ihren Bestandteilen, den Connexinen, auf chemische Synapsen, wurde bisher nicht beschrieben.

5.2.2 Deletion von Cx36 durch die CamKII α - und die Emx1-Cre-Rekombinase

Die Reporterprotein-Expressionsanalysen von CamKII α -Cre-transgenen Mäusen ergaben, dass die CamKII α -Cre-Rekombinase in der Retina von *Cx36flox(lacZ)*-Tieren zu einem charakteristischen Deletionsmuster von Cx36 führt, das die Zapfen ausschließt. In der Retina von *Cx36flox(CFP)*-Mäusen erfolgte durch die CamKII α -Cre-Rekombinase keine Cx36-Deletion (Abb. 4.20). Dies wurde mittels PCR-Analyse von Retina-DNS dieser Mäuse bestätigt (nicht gezeigt). Eine Deletion von Cx36 durch die Emx1-Cre-Rekombinase in der Retina von *Cx36flox(CFP)*-Mäusen war erfolgreich (Abb. 4.20). Die Reporterprotein-Expressionsanalyse von Mäusen mit dem Genotyp *Cx36^{+flox(lacZ)}:Emx1-Cre* lässt jedoch vermuten, dass die Cre-Rekombinase unter dem Emx1-Promotor nicht in einem bestimmten neuronalen Subtyp, sondern in nahezu allen Cx36-exprimierenden Zellen der Retina aktiv ist (s. auch Kap. 5.2.5). Außerdem scheint das Emx1-Cre-Transgen sehr unzuverlässig aktiv zu sein: Eine Deletion der geflochtenen Region in der Retina wurde sowohl bei Reporterproteinanalysen als auch bei PCR-Analysen (nicht gezeigt) nur in zwei von drei Mäusen angezeigt. Dies war unabhängig von der verwendeten Mausmutante *Cx36flox(lacZ)* oder *Cx36flox(CFP)*.

Die CamKII α -Cre-Rekombinase erzielt keine Deletion von Cx36 in *Cx36flox(CFP)*-Mäusen. Die Emx1-Cre-Rekombinase deletiert Cx36 in der Retina offensichtlich in allen Cx36-

exprimierenden Zellen. Beide Cre-Rekombinasen sind somit für eine zelltypspezifische Deletion von Cx36 in der Retina nicht geeignet.

5.2.3 Deletion von Cx36 durch die Parvalbumin-Cre-Rekombinase

Anhand der *Cx36flox(lacZ)*-Mausmutante wurde eine Deletion von Cx36 durch die Parvalbumin (Parv)-Cre-Rekombinase in der Retina in alpha-Ganglienzellen (Schubert et al., 2005) gefunden (Abb. 4.18). Farbstoffkopplungsexperimente zeigten, dass Cx36 in alpha-Ganglienzellen der konditional Cx36-defizienten Mausmutante *Cx36flox(CFP)* durch das Parv-Cre-Transgen nicht deletiert werden konnte (Abb. 4.19). Die Farbstoffkopplung in der Retina von $Cx36^{lacZ/flox(CFP)}$ -Mäusen, der Positivkontrolle für diesen Versuch, ist ein weiterer Beleg dafür, dass das von dem geflochten Allel ausgeprägte Cx36 funktionelle Kanäle bildet. Auch in anderen Zelltypen der Retina kam es nicht zu einer Deletion von Cx36 durch Parv-Cre, wie mittels PCR, RT-PCR, CFP-Fluoreszenz und -Immunfluoreszenzanalysen untersucht wurde (Abb. 4.18 und nicht gezeigt). Bei Mäusen mit dem Genotyp $Cx36^{+/flox(lacZ)};Parv-Cre$ wurden β -Galaktosidase-positive Zellen auch im Gehirn gefunden, insbesondere im Kleinhirn und der inferioren Olive (nicht gezeigt). In Kooperation mit Chris De Zeeuw, Rotterdam, Niederlande und James Deuchars, Leeds, England wurde daher die Parv-Cre-vermittelte Deletion von Cx36 im olivocerebellären System analysiert.

Cx36-Defekt-Mäuse zeigen bei Verhaltenstests, der klassischen Augenblink-Konditionierung (*eyeblink conditioning*) eine gestörte lernabhängige zeitliche Bewegungskontrolle (*learning-dependent timing*). Bei diesem Test werden die Tiere auf einen Ton konditioniert (konditionierter Stimulus), dem nach 350 ms ein Luftstoß auf das Auge folgt (unkonditionierter Stimulus), so dass die Maus das Auge kurzfristig schließt (*eye blinking*). Für die Verarbeitung des unkonditionierten Stimulus sind die zu den Purkinjezellen des Kleinhirns projizierenden Kletterfasern aus der inferioren Olive verantwortlich. Wildtypiere lernen nach mehreren Durchgängen, das Auge relativ genau 350 ms nach dem konditionierten Stimulus zu schließen, ohne dass ein Luftstoß erforderlich ist. Cx36-Defekt-Mäuse blinken ebenfalls auf den Ton hin, können den exakten Zeitpunkt jedoch nicht erlernen. Das Auge wird zu einem wahllosen Zeitpunkt nach Applikation des Tones geschlossen. Einer Hypothese zufolge ist für diesen Phänotyp von Cx36-Defekt-Mäusen die fehlende Kopplung in der inferioren Olive über Cx36-Gap Junction-Kanäle verantwortlich. Es wurde gezeigt, dass eine fehlende Kopplung unregelmäßige Entladungen (*spike activities*) der Olivenneurone mit reduzierter Synchronisation und veränderter Assoziation mit unterschwelligen Oszillationen (*subthreshold oscillations*) zufolge hat. Die zeitliche Kodierung dieser voneinander entkoppelten Zellen ist verändert. Sie feuern anders, was eine modifizierte Innervierung der Purkinjezellen, eine veränderte zeitliche Koordinierung ihres Feuerungsverhaltens, der *complex spike activities*, und damit eine gestörte Bewegungskontrolle durch das Kleinhirn zur Folge hat (van der Giessen et al., zur Publikation eingereicht).

Bei Verpaarung von *Cx36^{flox}(CFP)*-Mäusen mit Parv-Cre-transgenen Mäusen kommt es zu einer Deletion von Cx36 in den Neuronen der Kleinhirnerkerne, die damit CFP-positiv sind, nicht aber in den Neuronen der inferioren Olive (Abb. 5.1).

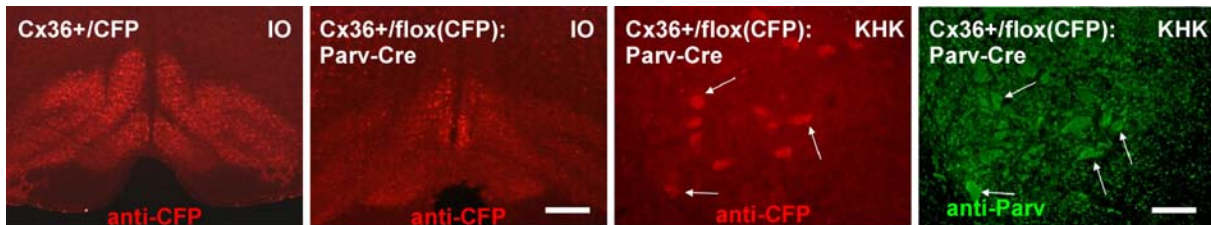


Abb. 5.1: Immunfluoreszenzanalyse in der inferioren Olive und den Kleinhirnerkernen. Im Vergleich zu der ubiquitären Deletion von Cx36 in Mäusen mit dem Genotyp *Cx36^{+/CFP}* kommt es bei der Parvalbumin (Parv)-Cre-vermittelten Cx36-Deletion in Mäusen mit dem Genotyp *Cx36^{flox}(CFP):Parv-Cre* nur zu einigen wenigen CFP-positiven Zellen (rot) in der inferioren Olive (IO). Parv-Cre deletiert Cx36 jedoch in den Kleinhirnerkernen (KHK), in denen Parvalbumin ausgeprägt wird (grün). Maßstabsbalken: 50 μ m (aus van der Giessen et al., zur Publikation eingereicht).

Tatsächlich zeigen Mäuse des Genotyps *Cx36^{lacZ/flox}(CFP):Parv-Cre* bei der Augenblink-Konditionierung kein gestörtes Lernverhalten, sondern verhalten sich wie Wildtypmäuse. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Cx36-vermittelte Kopplung in der inferioren Olive für eine zeitliche Bewegungskontrolle erforderlich ist, nicht aber die Kopplung über Cx36-Gap Junction-Kanäle in den Kleinhirnerkernen. Die *Cx36^{flox}(CFP)*-Mausmutante trug durch die selektive Deletion von Cx36 dazu bei, die Neuronen zu identifizieren, deren Kopplung über Cx36-Gap Junction-Kanäle für ein differenziertes Verhalten wichtig ist. Dies ist ein Beispiel für Fragestellungen, für die eine konditional Cx36-defiziente Mausmutante von Bedeutung sein kann. Darüber hinaus beschreibt die Arbeit von van der Giessen et al. zum ersten Mal einen klaren Verhaltens-Phänotyp für Cx36-defiziente Mäuse. Sie demonstriert, dass aufwändige Tests erforderlich sind, um bei Deletionen von Genen in Neuronen des ZNS einen Phänotyp, zumindest unter Laborbedingungen, nachzuweisen. Wahrscheinlich ist dieser Umstand in den zahlreichen Kompensationsmechanismen begründet, zu denen das ZNS fähig ist.

Ein weiteres Beispiel für eine Cx36-basierte Synchronisation liefern die Mitralzellen im *Bulbus olfactorius*. Axone von Riechneuronen, die den gleichen Geruchsrezeptor ausprägen, laufen in einem einzigen Glomeruli des *Bulbus olfactorius* zusammen und projizieren dort unter anderem auf Mitralzellen, die Prinzipalneurone des Riechkolbens. Mitralzellen eines Glomerulus sind über Cx36-Gap Junction-Kanäle elektrisch miteinander gekoppelt (Christie et al., 2005) und feuern dadurch hochsynchron (Schoppa und Westbrook, 2001). Cx36 wird im olfaktorischen System nicht nur in Mitralzellen ausgeprägt, sondern auch in sensorischen Neuronen des Riechepithels sowie im akzessorischen olfaktorischen System und weiteren Bereichen im Gehirn (Zhang and Restrepo, 2003; Degen et al., 2004). Welche Rolle die elektrische Kopplung und Synchronizität der Mitralzellen für die olfaktorische Kodierung

spielt, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Durch Einbeziehung einer konditionalen Cx36-defizienten Mausmutante wie der *Cx36flox(CFP)*-Maus kann eine gezielte Deletion von Cx36 in diesen Prinzipalneuronen erreicht werden, wie auch von Zufall (2005) vorgeschlagen. Voraussetzung dafür ist eine transgene Maus, in der die Cre-Rekombinase mitralzellspezifisch exprimiert wird, und die in der Lage ist, Cx36 zu deletieren (siehe auch Kap. 5.2.5). Geeignet erscheint hierfür die *Pcdh21-Cre*-Maus (Nagai et al., 2005), in der die Cre-Rekombinase unter dem Mitralzell-/Tuftedzell-spezifischen Promotor des Protocadherins 21 ausgeprägt wird. Mit Verpaarungen der *Cx36flox(CFP)*-Maus mit der *Pcdh21-Cre*-Maus wurde kürzlich im Labor von Prof. Mineto Yokoi, Kyoto, Japan begonnen.

5.2.4 Die Verwendung von Mäusen mit dem Genotyp $Cx36^{lacZ/flox(CFP)}:Cre$

In den Versuchen zur induzierten bzw. zelltypspezifischen Deletion von Cx36 wurden häufig Mäuse mit dem Genotyp $Cx36^{lacZ/flox(CFP)}:Cre$ verwendet, die neben dem geflochtenen Cx36 das Cx36-Minus-Allel lacZ trugen. Der Vorteil dieser Mäuse bestand darin, dass sie schneller zu züchten waren, da während der Herstellung und Charakterisierung der *Cx36flox(CFP)*-Mausmutante die entsprechenden Cre-transgenen Tiere bereits mit Mäusen des Genotyps $Cx36^{lacZ/lacZ}$ verpaart werden konnten. Außerdem ist in Mäusen mit dem Genotyp $Cx36^{lacZ/flox(CFP)}$ die Deletion nur eines geflochtenen Gens durch die Cre-Rekombinase erforderlich, um einen homozygoten induzierten oder zelltypspezifischen Verlust von Cx36 zu erreichen. CFP-positive Zellen von Mäusen mit dem Genotyp $Cx36^{lacZ/flox(CFP)}:Cre$ sind eindeutig Cx36-negativ.

In Mäusen mit dem Genotyp $Cx36^{flox(CFP)/flox(CFP)}:Cre$ wird es möglicherweise zunächst zu intrachromosomalen Umlagerungen im Cx36-Lokus kommen, je nachdem, welche beiden loxP-Stellen von insgesamt vier die Cre-Rekombinase zuerst erkennt. Diese Rekombinationen haben jedoch keine funktionellen Konsequenzen, da sie den Cx36-Lokus nicht verändern. Die Cre-Rekombinase wird solange aktiv sein, bis auf jedem Chromosom nur noch eine loxP-Stelle existiert und Cx36 deletiert ist.

Im Genom von Mäusen des Genotyps $Cx36^{lacZ/flox(CFP)}:Cre$ gibt es drei loxP-Stellen. Bei intrachromosomalen Umlagerungen werden Cx36-Allele mit neuem Aufbau rekombiniert. Da jedoch auch hier die Cre-Rekombinase solange tätig ist, bis sich zwei loxP-Stellen nicht mehr in relativer Nähe zueinander befinden, ist auf jeden Fall die Cx36-Ausprägung irreversibel unterbrochen. Diese Vorgänge auf genomischer Ebene ließen sich mit einer Southern Blot-Analyse untersuchen.

5.2.5 Das Problem der zelltypspezifischen und/oder induzierten Deletion von Cx36 in der *Cx36flox(CFP)*-Mutante - eine Hypothese

Die vorliegende Arbeit weist darauf hin, dass die Deletion von Cx36 mit einer bestimmten Cre-Rekombinase in der *Cx36flox(lacZ)*-Mausmutante und der *Cx36flox(CFP)*-Mausmutante

unterschiedlich effizient sein kann. Die mithilfe von *Cx36flox(lacZ)*-Mäusen gewonnenen Ergebnisse, in welchen Zellen eine Cre-vermittelte Deletion von Cx36 durch die Ausprägung des Reporterproteins angezeigt wird, sind auf *Cx36flox(CFP)*-Mäuse nicht übertragbar. Das Cre/loxP- bzw. das CreER^T/loxP-System ist komplex; das Abschalten der Proteinexpression hängt daher von mehreren Faktoren ab: von der Zelltypspezifität und Stärke des Promotors, der Cre kontrolliert; von der Induzierbarkeit des CreER^T-Proteins durch Tamoxifen; von der Kongruenz der Cre-Rekombinase- und der Kandidatengen-Ausprägung. Aufgrund der vorliegenden Daten wurde die Hypothese formuliert, dass die loxP-Erkennungsstellen in der *Cx36flox(CFP)*-Mausmutante im Unterschied zu den anders platzierten loxP-Stellen in der *Cx36flox(lacZ)*-Mausmutante ab einem bestimmten Alter für die Cre- bzw. die CreER^T-Rekombinase schlechter zugänglich sind. Möglicherweise liegt dies in der Sekundärstruktur der DNS begründet, die sich im Laufe ihres Lebens ändert (Khorasanizadeh, 2004), beispielsweise durch Methylierungen. Umlagerungen genomischer Bereiche würden dann höchstens noch in einigen wenigen Zellen stattfinden. Vooijs et al. (2001) bemerkten, dass die Effizienz der Rekombination durch die Cre-Rekombinase von der Positionierung der loxP-Erkennungsstellen abhängt; verschiedene gefloxtete Gene in einer Zelle werden unterschiedlich effizient deletiert. Neben der Entfernung zwischen den loxP-Stellen wird auch der Einfluß der Chromatinstruktur als Ursache diskutiert.

Die obige Hypothese kann erklären, warum die Parv-Cre-Rekombinase in *Cx36flox(CFP)*-Mäusen keine Deletion in den alpha-Ganglienzellen der Retina erzielt und warum es durch die CamKII α -Cre-Rekombinase und die induzierte PrP-CreER^T-Rekombinase nicht zur einer genomischen Rekombination in *Cx36flox(CFP)*-Mäusen kommt. Sowohl der Parvalbumin- als auch der CamKII α -Promotor werden erst postnatal aktiv (del Rio et al., 1994; Casanova et al., 2001), wenn sich die Neuronen weiter ausdifferenzieren. Die loxP-Erkennungssequenzen des *Cx36flox(CFP)*-Allels sind zu diesem Zeitpunkt für die Cre-Rekombinase anscheinend nicht mehr zugänglich. Neurone der Kleinhirnkerne würden demnach das Enzym unter dem Parvalbumin-Promotor relativ früh ausprägen, da es hier noch zu einer Deletion von Cx36 in *Cx36flox(CFP)*-Mäusen kommt. Um dieser Vermutung nachzugehen, müsste untersucht werden, ab wann die Parv-Cre-Rekombinase exprimiert wird und aktiv ist. Die Emx1-Cre- und die Nestin-Cre-Rekombinase führen zu einer Deletion von Cx36 in *Cx36flox(CFP)*-Mäusen, möglicherweise da die Promotoren bereits ab Tag 9,5 dpc bzw. 10,5 dpc aktiv sind (Guo et al., 2000; Betz et al., 1996). Der Emx1-Promotor kontrolliert ein Homöobox-Gen, dessen Ausprägung in der Embryonalentwicklung in nahezu jedem Neuron des cerebralen Cortex und *Bulbus olfactorius* beschrieben wurde (Simeone et al., 1992). Der Nestin-Promotor ist für die Expression eines Gens verantwortlich, das ein Intermediärfilament in neuronalen Stammzellen kodiert (Zimmerman et al., 1994). Beide Promotoren weisen damit eine weniger restriktive Zelltypspezifität auf als z.B. das Parv-Cre-Transgen und sind für physiologische Analysen hinsichtlich der zelltypspezifischen Funktion von Cx36 ungeeignet. Offensichtlich gilt die veränderte Zugänglichkeit von loxP-Erkennungssequenzen auch für das *Cx45flox(eGFP)*-Allel: In Mäusen des Genotyps *Cx45^{lacZ/flox(eGFP)}:PrP-CreERT* wurden nach

Induktion ebenfalls nur sehr wenige eGFP-positive Zellen in der Retina nachgewiesen (nicht gezeigt). Durch die Parv-Cre-Rekombinase ist das *Cx45flox(eGFP)*-Allel jedoch deletierbar (Stephan Maxeiner, Dissertation 2005). Der ROSA26-Lokus scheint hingegen auch in adulten Mäusen für die PrP-CreER^T-Rekombinase zugänglich zu sein (Weber et al., 2001).

Ob die formulierte Hypothese der altersabhängigen Zugänglichkeit der loxP-Stellen richtig ist, könnte durch weitere Untersuchungen wie z.B. der Tamoxifen-vermittelten Induktion von *Cx36flox(CFP)*-Mäusen *in utero* geklärt werden. In jedem Fall erfordert die Verwendung des Cre/loxP- bzw. CreER^T/loxP-Systems zusammen mit der *Cx36flox(CFP)*-Mausmutante eine äußerst sorgfältige Untersuchung hinsichtlich des Zelltyps, in dem eine Deletion von Cx36 stattfinden soll. Dass sich ein solches Vorhaben lohnt, demonstrieren die Experimente mit *Cx36flox(CFP):Parv-Cre*-Mäusen im olivocerebellären System. Weitere, von kooperierenden Arbeitsgruppen durchgeführte Versuche mit der *Cx36flox(CFP)*-Mausmutante und verschiedenen Cre-Transgenen zur Deletion von Cx36 werden derzeit durchgeführt. Die Arbeitsgruppe von Prof. Alan Herbison, Dunedin, Neuseeland versucht, Cx36 ausschließlich in sexualhormon-sezernierenden Neuronen im Gehirn auszuschalten. In der Arbeitsgruppe von Paolo Meda, Genf, Schweiz wurde mit der *Cx36flox(CFP)*-Mausmutante bereits eine erfolgreiche Deletion von Cx36 in insulinsezernierenden β -Zellen des Pankreas durch das Rip-Cre-Transgen (Ray et al., 1999) erzielt (Prof. Paolo Meda, persönl. Mitteilung). Eine Analyse der Rolle von Cx36 in den verschiedenen Klassen von Interneuronen (Hestrin und Galarretta, 2005) wird ermöglicht werden, wenn entsprechende Cre-transgene Mäuse entwickelt wurden, durch die die einzelnen neuronalen Zelltypen im ZNS exakt angesteuert werden können. Zurzeit laufende Microarray-Analysen zur Charakterisierung der spezifischen Expressionsprofile dieser zellulären Subtypen im Gehirn (Nelson et al., 2006) ebnen den Weg dorthin.

5.2.6 Zelltypspezifische Deletion von Cx36 in der Retina

Eine Deletion von Cx36 in neuronalen Subtypen der Retina wurde mit der *Cx36flox(CFP)*-Mausmutante in dieser Arbeit nicht erzielt. Bewahrheitet sich die in Kap. 5.2.5 formulierte Hypothese, ist diese Mauslinie wahrscheinlich nur in Einzelfällen dazu geeignet, da sich Neurone erst nach der Geburt weiter ausdifferenzieren. Dennoch ist ein zelltypspezifisches Ausschalten der Cx36-Ausprägung in der Retina von Interesse für physiologische Analysen. Es ist z.B. noch nicht geklärt, wie eine Entkopplung von Neuronen durch den Verlust von Cx36 in der Retina zu einer Veränderung in der B-Welle des Elektroretinogramms führt (Güldenagel et al., 2001). Welcher Zelltyp ist dafür verantwortlich? Lohnenswert ist dabei die Verpaarung von *Cx36flox(CFP)*-Mäusen z.B. mit zapfenspezifischen HRGP (*human red/green pigment*)-Cre-Mäusen (Le et al., 2004), in denen der Beginn der Ausprägung der Cre-Rekombinase unter dem HGRP-Promotor jedoch noch nicht untersucht wurde (Yun-Zheng Le, persönl. Mitteilung).

5.3 Projekt II: *Cx57-Mid* und *-CT*: Sind die gegen *Cx57* gerichteten Antikörper spezifisch?

In der vorliegenden Arbeit wurden die polyklonalen *Cx57*-Antikörper *Cx57-Mid* und *Cx57-CT* aus der Arbeitsgruppe von Prof. James Nagy charakterisiert. Beide Antikörper wiesen im Immunoblot das rekombinante Fusionsprotein *GST-Cx57CT-6xHis* (Abb. 4.22) sowie das *Cx57*-Protein bzw. *Cx57eGFP*-Fusionsprotein aus Lysaten transfizierter HeLa-Zellen (Abb. 4.24) nach. Die für *Cx57* zuvor theoretisch ermittelte molekulare Masse von etwa 56 kDa (Hombach et al., 2004) wurde bestätigt. In der Immunfluoreszenzanalyse transfizierter HeLa-Zellen kolokalisierten *Cx57-Mid* und *-CT* jeweils mit dem *Cx57eGFP*-Fusionsprotein (Abb. 4.23) und erkannten das *Cx57*-Protein ohne C-terminal angehängtes eGFP (nicht gezeigt). In der Retina lieferten die *Cx57-Mid*-Antikörper spezifische Signale zwischen INS und ÄPS (Abb. 4.25). Mit *Cx57-Mid* liegen Antikörper vor, die *Cx57* im histologischen Präparat erkennen. Sie ermöglichten zum ersten Mal den Nachweis von *Cx57* in Horizontalzellen auf Proteinebene. Anhand der *freeze-fracture immunogold labelling*-Technik wurden *Cx57*-Gap Junction-Kanäle in den Dendriten der Horizontalzellen gefunden (Prof. James Nagy, persönl. Mitteilung). Mithilfe von *Cx57-Mid* wird es möglich sein, die Ausprägung von *Cx57* im Thymus und in der embryonalen Niere (Hombach et al., 2004) zu überprüfen.

Die *Cx57-CT*-Antikörper führten in der *Cx57KO*-Retina zu deutlichen Signalen in der Horizontalzellschicht (Abb. 4.25). Das Antigen wird kodiert von einem Bereich, der sich in *Rest-Exon 2* der *Cx57KO*-Mausmutante befindet. Mit der Ausprägung von *Rest-Exon 2* würde *Cx57-CT* das Antigen erkennen können (vgl. Abb. 4.21). Zwischen dem *lacZ*-Gen und dem *Rest-Exon 2* liegt im *Cx57KO*-Lokus die *neoR*-Kassette. Es wurde spekuliert, dass der stromabwärts orientierte Thymidinkinasepromotor der *neoR*-Kassette zusammen mit Verstärkerelementen des *Cx57*-Promotors zu einer Expression eines *neo-Rest-Exon 2*-Fusionsproteins in den Horizontalzellen führen könnte. Daher wurde der Übergang zwischen der *neo*-Kassette und *Rest-Exon 2* über PCR aus dem Genom einer *Cx57KO*-Maus amplifiziert (Oligonukleotid-Startermoleküle *Cx57ko neo-USP* und *Cx57ko Exon 2-DSP*), kloniert und sequenziert. Es wurde bestätigt, dass das polyA-Signal von *neoR* existiert und somit das Ende der Transkription determiniert. Ein Durchlesefehler der RNS-Polymerase II von der *neoR*-Kassette in das *Rest-Exon 2* ist somit unwahrscheinlich. Darüber hinaus wurde eine Transkription des *Rest-Exon 2* in der Northern Blot-Analyse nicht eindeutig nachgewiesen. Im Gegensatz zu Hombach et al. (2004) wurde dabei eine Sonde verwendet, die ausschließlich mit *Rest-Exon 2* hybridisierte (Kap. 4.3.4). Zusätzlich wurde eine intronüberspannende RT-PCR mit Gesamt-RNS aus Retinae von *Cx57KO*-Mäusen durchgeführt (nicht gezeigt). Da der genomische Bereich stromabwärts von *Rest-Exon 2* in der *Cx57KO*-Mausmutante intakt ist, wurde postuliert, dass bei einer Expression *Rest-Exon 2* an *Cx57*-Exon 3 gespleißt wird. Oligonukleotid-Startermoleküle, die im *Rest-Exon 2* und in Exon 3 hybridisierten (*Cx57 USP4* und *Cx57 DSP6a*), führten nicht zu einem Nachweis eines

Transkripts. Somit kann ausgeschlossen werden, dass es zu einem Spleißprodukt bestehend aus *Rest-Exon 2* und *Cx57-Exon 3* kommt. Es ist unwahrscheinlich, dass das *Rest-Exon 2* als Bestandteil einer langen Vorläufer-RNS transkribiert (Banden „schatten“ bei 12 kb in der Northern Blot-Analyse) und nach komplexen Spleißvorgängen als Bestandteil eines Proteins translatiert wird, welches eine vergleichbar starke Ausprägung und ähnliche Lokalisation in der Zelle aufweist wie *Cx57* selbst. Eher ist vorstellbar, dass in den Horizontalzellen der Maus ein Protein ausgeprägt wird, mit welchem der *Cx57-CT*-Antikörper zusätzlich reagiert. Die ÄPS der Retina neigt bei Immunfluoreszenzen mit verschiedenen Antikörpern zur Ausbildung unspezifischer Signale (Prof. James Nagy, persönl. Mitteilung).

Mittels Immunpräzipitation mit den *Cx57-CT*-Antikörpern wurde in Wildtyp- und *Cx57KO*-Retinalysaten eine Bande nachgewiesen, die sich knapp über 50 kDa auf gleicher Höhe wie *Cx57* im HeLa-Lysat befindet (Abb. 4.26). Diese Bande trat in beiden Genotypen auch nach Präzipitation mit *Cx57-Mid* auf (nicht gezeigt). Es wurde vermutet, dass es sich hierbei um die schweren Ketten der zur Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper (etwa 50 kDa) handelt. Obwohl die Antikörper kovalent an die ProteinG-Sepharose gekoppelt wurden, kann ein Ablösen durch Proteasen erfolgen, die sich in dem Lysat befinden. Dies kann überprüft werden, indem die Membran nach Immunpräzipitation und SDS-PAGE nur mit den sekundären Antikörpern inkubiert wird. Treten Banden auf, ist das ein Hinweis auf die schweren Ketten der Antikörper in der Probe. Die eigentlichen Retina-Präzipitate von *Cx57-CT* können dadurch überdeckt werden.

MudPIT-Analysen mit Präzipitaten von *Cx57-CT* aus Wildtyp- und *Cx57KO*-Retinalysaten führten nicht zur Identifikation der präzipitierten Proteine. Auch bei einer Untersuchung von *Cx57-Mid*-Präzipitaten wurden keine Ergebnisse erzielt. Dies kann auf eine mangelnde Ausbeute an Präzipitat zurückzuführen sein oder auf Komponenten im Lyophyllisat des Präzipitats, die die enzymatische Spaltung und die anschließende massenspektrometrische Vermessung der Peptide negativ beeinflussten. Darüber hinaus erwiesen sich die *Cx57-Mid*- und die *-CT*-Antikörper während der Lagerung bei 4 °C als nicht besonders stabil. Auch eine Lagerung bei -20 °C über längere Zeit führte zum Aktivitätsverlust der Antikörper. Eine erneute MudPIT-Analyse mit frisch aufgereinigten *Cx57-Mid*- und *-CT*-Antikörpern und mehr Ausbeute an Präzipitat durch den Einsatz größerer Mengen an Retinalysat ist geplant.

Könnte eine weitere Connexin-Isoform durch *Cx57-CT* in der *Cx57KO*-Retina erkannt werden? In den Horizontalzellen des Zebrafisches wurden mehrere *Cx57*-ähnliche Connexin-Isoformen gefunden (Zoidl et al., 2004; Dermietzel et al., 2000). Allerdings liegen in der Zebrafisch-Retina auch verschiedene Typen von Horizontalzellen vor. Der nahezu vollständige Verlust der Farbstoffkopplung in *Cx57*-defizienten Mäusen spricht gegen die Ausprägung eines zweiten Connexins. Connexine müssen jedoch nicht zwangsläufig Gap Junction-Kanäle zwischen Zellen ausbilden, wie beispielsweise für *Cx43* in der inneren Mitochondrienmembran (Boengler et al., 2005; Rodriguez-Sinovas et al., 2006) oder für *Cx29* in Oligodendrozyten (Nagy et al., 2003) vermutet. *Cx26* und *Cx36* werden nicht in Horizontalzellen der Maus ausgeprägt (Deans und Paul, 2001). Das Vorliegen einer weiteren,

unbekannten Connexin-Isoform erscheint unwahrscheinlich, da mittels Datenbankrecherchen vermutlich alle im Mausgenom existierenden Connexin-Gene identifiziert wurden (Söhl und Willecke, 2004). Die Connexin-Isoform wäre dann bei vorhergegangenen Genom-Analysen nicht entdeckt worden, weil sie möglicherweise in Bereichen liegt, die für eine Sequenzierung nicht zugänglich waren.

Mittlerweile sind die Antikörper *Cx57-Mid* und *Cx57-CT* über die Firma Zymed/Invitrogen kommerziell erhältlich - trotz Unklarheit über die Spezifität von *Cx57-CT*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls ein gegen *Cx57* gerichteter monoklonaler Antikörper aus Hühnchen getestet, der von der Firma Diatheva vertrieben wird. Dieser Antikörper erkennt sowohl die zytoplasmatische Schleife als auch den C-Terminus des *Cx57*-Proteins als bakterielles Fusionsprotein im Immunoblot. Das ist erstaunlich, da ein monoklonaler Antikörper nur ein Epitop erkennen sollte. Trotz unterschiedlicher Fixierungs- und Blockierungsbedingungen war er in der Immunfluoreszenzanalyse von Retina-Gefrierschnitten aus Wildtyp- und *Cx57KO*-Mäusen unbrauchbar. Die Spezifität von Antikörpern kann nur mithilfe einer geeigneten Defekt-Mausmutante überprüft werden. Der gegen *Cx57* gerichtete Antikörper von Diatheva wird beworben, indem seine vermeintliche Spezifität anhand eines Immunoblots mit Mausgehirnlysate demonstriert wird. Gehirnlysate aus *Cx57KO*-Mäusen kam dabei als Negativkontrolle nicht zum Einsatz.

Die Immunfluoreszenzanalysen mit Wildtyp- und *Cx57KO*-Retinagewebe haben gezeigt, dass die *Cx57-Mid*-Antikörper das *Cx57*-Protein spezifisch erkennen. Ein weiterer polyklonaler *Cx57*-spezifischer Antikörper wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Reto Weiler, Oldenburg vorgestellt (FASEB Research Summer-Konferenz 2006). Damit könnten folgende Fragen beantwortet werden: Ist *Cx57* in der Plasmamembran der Horizontalzell-Dendriten lokalisiert? Bildet es Halbkanäle, die sich in räumlicher Nähe zu Kalzium-Kanälen in der Plasmamembran der Zapfen-Endfüßchen befinden? Ist es somit an der Ausbildung der ephaptischen Synapse beteiligt? Außerdem könnten *Cx57*-Phosphorylierungsstudien durchgeführt und nach Interaktionspartnern des *Cx57* gesucht werden.

5.4 Wieso sterben *Cx57*-exprimierende HeLa-Zellen?

Bereits in vorangegangenen Arbeiten (Steffen Latt, Diplomarbeit 2004) blieben Versuche, ein stabil *Cx57*-exprimierendes Zellsystem zu etablieren, erfolglos. Die mit den Vektoren *pMJ-Cx57Stop and -Go* stabil transfizierten HeLa-Zellen verloren nach einiger Kultivierungszeit ihre *Cx57*- bzw. *Cx57eGFP*-Expression. Es konnten daher keine elektrophysiologischen Experimente zur weiteren Charakterisierung von *Cx57*-Gap Junction-Kanälen durchgeführt werden. Es wurde vermutet, dass die exogene Ausprägung von *Cx57* toxisch auf HeLa-Zellen wirkt, beispielsweise durch die Bildung von Halbkanälen, deren Öffnungszustand in dieser Epithelkarzinomzelllinie nicht reguliert werden kann. Daher isolierte Steffen Latt mithilfe des Tetrazyklin-Genregulationssystems (Gossen und Bujard, 1992) HeLa-Zellen, die erst nach

Doxycyclin-Induktion Cx57eGFP exprimierten. Diese Zellen wurden im Zuge dieser Dissertation von Melanie Schütz während ihres Laborblocks charakterisiert. Sämtliche untersuchten Klone starben innerhalb von vier Tagen in Anwesenheit von Doxycyclin im Gegensatz zu nicht-induzierten Klonen. Eine Stabilisierung der Zellen über die Zugabe von Ca^{2+} zum Kulturmedium zum Schließen potentieller Cx57eGFP-Halbkanäle (Thimm et al., 2005) blieb ohne Erfolg.

Mittlerweile wurden bei einem Vergleich der in den *pMJ*-Vektoren vorliegenden Cx57-Sequenz mit der kodierenden Region von Cx57 in der Maus drei Punktmutationen gefunden (Stephan Sonntag, persönl. Mitteilung). Diese drei Mutationen betreffen zwar nicht die Epitope der gegen Cx57-gerichteten Antikörper *Cx57-Mid* und *Cx57-CT*. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass zumindest eine dieser Mutationen für das Absterben der transfizierten HeLa-Zellen verantwortlich ist. Vermutlich ist auch die in der Immunfluoreszenzanalyse beobachtete Akkumulation des Cx57eGFP-Proteins (Abb. 4.23) und des Cx57-Proteins (nicht gezeigt) in der Zellkernperipherie auf eine dieser Mutationen zurückzuführen, die verhindert, dass Cx57 bzw. Cx57eGFP zur Plasmamembran transportiert wird, wie beispielsweise für Cx36 von Placantonakis et al. (2002) beschrieben. Zusammen mit den relativ harschen Fixierungsbedingungen (4 % PFA) ergaben sich dann die schlierenartigen Fluoreszenzsignale. Neu klonierte *pMJ*-Vektoren mit der korrekten Cx57-Sequenz führten zu HeLa-Transfektanten, die zumindest das Cx57-Fusionsprotein Cx57eGFP relativ stabil ausprägen und es in die Plasmamembran integrieren (Stephan Sonntag, persönl. Mitteilung). Diese Zellen eignen sich daher für elektrophysiologische Studien zu Charakterisierung der Kanaleigenschaften von Cx57.

5.5 Projekt III: Versuche zur Erzeugung einer induzierbaren horizontalzellablatierenden Mausmutante

Die Erzeugung einer induzierbaren horizontalzellablatierenden Mausmutante eröffnet die Möglichkeit, den Einfluss der Horizontalzellen auf die Architektur der Retina und die Entstehung neuronaler Schaltkreise während der Entwicklung zu analysieren. Des Weiteren erlaubt sie die Untersuchung, welche Bedeutung die Informationsmodulation durch die Horizontalzellen auf das Sehvermögen im adulten Organismus hat.

Eine induzierbare Ablation von Maus-Horizontalzellen *in vivo* wird durch das Diphtherie-Toxin-Rezeptor(DTR)/Diphtherie-Toxin(DT)-System realisiert. Es wurde von Saito et al. (2001) erstmalig eingesetzt, um in Mäusen ein Absterben von Hepatozyten zu bewirken, und basiert auf der rezeptorvermittelten Aufnahme des zytotoxischen DTs. Zellen von Wildtyp-Mäusen verhalten sich resistent gegenüber dem Gift, da sie es nicht aufnehmen können. Nach intraperitonealer oder intramuskulärer DT-Applikation gehen in transgenen Mäusen nur diejenigen Zellen zugrunde, die den Primaten-DTR ausprägen. Wurde in früheren Ansätzen das DT selbst unter einem zelltypspezifischen Promotor exprimiert (z.B. Palmiter et al., 1987

(Pankreas), Lem et al., 1991 (Retina)) und war somit in seiner Expression zeitlich nicht kontrollierbar, erlaubt das DTR/DT-System eine induzierte Ablation von Zellen zu einem beliebigen Zeitpunkt und damit die Untersuchung der Funktion eines Zelltyps in sich entwickelnden wie auch in adulten Mäusen. Dies wurde bereits 1998 von Lee et al. erzielt, indem die kodierende Region für DT-Fragment A unter einem zelltypspezifischen Tetrazyklin-regulierbaren Promotor ausgeprägt wurde. Die direkte Expression des hochtoxischen DTs in Mauszellen birgt jedoch immer die Gefahr, dass das Toxin bereits bei einer schwachen zelltypspezifischen Ausprägung weitere Zelltypen absterben lässt, was einen unerwünschten Phänotyp bis hin zur Lethalität zur Folge haben kann (Brockschnieder et al., 2004 und 2006). Im Gegensatz zum Herpes-Thymidinkinase/Aciclovir-System, durch das nur proliferierende Zellen absterben (Borrelli et al., 1988), werden mit dem DTR/DT-System auch postmitotische Zellen angesprochen. DT passiert die Blut-Hirn-Schranke (Wrobel et al., 1990), wie auch das induzierte Absterben von DTR-ausprägenden Oligodendrozyten zeigte (Buch et al., 2005). Dadurch eignet es sich zur Ablation von Neuronen. Ein ähnliches System publizierten Kobayashi et al. (1995), wobei die α -Untereinheit des menschlichen Interleukin 2-Rezeptors unter dem Promotor des Dopamin-beta-Hydroxylase-Gens exprimiert wurde. Eine intracerebroventrikuläre Injektion des Immunotoxins PE40 führte zu einer Ablation entsprechender Neurone, jedoch in einer Dosierung, die auch Wildtypzellen schädigen kann. Die von Hombach et al. (2004) publizierte Cx57-Defekt-Mausmutante prägt anstelle des Cx57 das lacZ-Reportergen aus. Neben vereinzelt Zellen im Thymus sind in der adulten Cx57-Defekt-Maus nur Horizontalzellen der Retina β -Galaktosidase-positiv. Der Cx57-Promotor weist somit ein stark zelltypspezifisches Aktivitätsmuster auf. Die Expression des DTR unter Kontrolle des Cx57-Promotors sensibilisiert somit lediglich Horizontalzellen gegenüber DT. Eine gezielte Ablation von Horizontalzellen in Mäusen sollte folglich durch die Expression des Primaten-DTRs unter Kontrolle des Cx57-Promotors und Verabreichung von DT zu einem beliebigen versuchsrelevanten Zeitpunkt induziert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde der Austauschvektor *pKW-DTRfrtCre* kloniert, der nach homologer Rekombination in den Cx57-Lokus von murinen ES-Zellen zur Erzeugung einer induzierbaren horizontalzellablatierenden Mauslinie führen soll. In diesem Vektor wird der DTR bzw. das Fusionsprotein DTReGFP von frt-Erkennungsstellen flankiert; darauf folgt eine Cre-Rekombinase-kodierende Region. Bei Verpaarung von *DTRfrtCre*-Mäusen mit Flp-transgenen Mäusen wird die DTR-Kassette deletiert und stattdessen die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Cx57-Promotors ausgeprägt. Damit ist es durch die Herstellung der *DTRfrtCre*-Mauslinie ebenfalls möglich, in Horizontalzellen gezielt gefloxe Gene auszuschalten.

5.5.1 Der Austauschvektor *pKW-DTRfrtCre*

Der Austauschvektor *pKW-DTRfrtCre* (Abb. 4.27) für die homologe Rekombination in HM1-ES-Zellen wurde in insgesamt sieben Schritten kloniert. Zunächst wurde das eigentliche

Konstrukt *DTR^{frt}Cre* erzeugt, das in einem letzten Schritt anstelle des lacZ-Reportergens in den Austauschvektor *Cx57 KO* (Sonja Hombach, Diplomarbeit 2000) ligiert wurde. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass der DTR das zur β -Galaktosidase identische Expressionsmuster aufweist. Die Eigenschaften des *Cx57 KO*-Vektors führten möglicherweise erst dazu, dass die Aktivität des *Cx57*-Promotors und somit die beschriebene β -Galaktosidase-Ausprägung auf Horizontalzellen beschränkt ist. Es ist nicht auszuschließen, dass *Cx57* auch in Neuronen im Gehirn exprimiert wird, obwohl Experimente der Arbeitsgruppe von Prof. James Nagy mit den in Kap. 4.3 beschriebenen Antikörpern dagegen sprechen. Zu den Eigenschaften des Austauschvektors *Cx57 KO* zählen einerseits die neoR-Selektionskassette, die in der Maus nicht deletiert werden kann, da sie nicht von loxP- oder *frt*-Erkennungssequenzen flankiert ist. Damit ist der Thymidinkinase-Promotor dieses Gens auch in der Maus aktiv und kann die Expression des lacZ-Reportergens beeinflussen. Des Weiteren führt der *Cx57 KO*-Vektor bei der homologen Rekombination nicht zu einer vollständigen Deletion des Exons 2 von *Cx57*. Wie bereits erwähnt (Kap. 4.3), lässt sich die Vermutung nicht ganz ausräumen, dass dieser bestehende Bereich weiterhin ausgeprägt wird. Das würde bedeuten, dass es regulative Elemente gibt, die für die Expression des *Rest-Exons 2* verantwortlich sind und möglicherweise auch Einfluss auf die Expression des lacZ-Gens nehmen.

Durch Kontrollspaltungen mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurde das Vorliegen des Austauschvektors *pKW-DTR^{frt}Cre* überprüft (Abb.4.28 und Tab. 4.1). Transformation in *Flp-E.coli*-Bakterien und erneute Kontrollspaltungen des daraus gewonnenen Plasmids *pKW-Cre* bestätigten die Funktionalität der *frt*-Erkennungssequenzen (Abb. 4.29). Bei der Sequenzierung einiger Bereiche des *pKW-DTR^{frt}Cre*-Vektors wurden in fünf Fällen insbesondere im 5' Homologiebereich Abweichungen zu der Sequenz festgestellt, die für den Austauschvektor *Cx57 KO* vorlag. Daraufhin wurde auch dieser Vektor an den entsprechenden Stellen sequenziert. Es stellte sich heraus, dass diese Mutationen bereits in *Cx57 KO* existierten, sie also nicht weiter berücksichtigt werden mussten.

5.5.2 Untersuchungen im Zellkultursystem

Mithilfe der Testvektoren *pMJ-DTR^{frt}Cre* und *pMJ-Cre* wurde das Konstrukt *DTR^{frt}Cre* auf seine Expression und Funktionalität hin untersucht. Dabei musste beachtet werden, dass sich aufgrund der Klonierungsstrategie dieses Konstrukt von dem *DTR^{frt}Cre*-Konstrukt, das im finalen Austauschvektor *pKW-DTR^{frt}Cre* vorliegt, in zwei Punkten unterscheidet: Zum einen war das *AccI-AccI*-Fragment vor der kodierenden Region der Cre-Rekombinase noch vorhanden. Da es eine Mehrfachklonierungsstelle darstellt, sollte sein Fehlen auf die Expression und Funktionalität des Konstruktes keinen Einfluss haben. Des Weiteren befanden sich in den Testvektoren vor 5'-*frt*-Erkennungsstelle 20 bp eines PGK-Promotors. Er kann jedoch nur die Stärke der Expression, nicht aber die Funktionalität von DTR^{frt}GFP und Cre beeinflussen.

Anhand von Zellkulturexperimenten stellte sich heraus, dass das DTReGFP-Fusionsprotein ausgeprägt wird, erkennbar an den eGFP-Fluoreszenzsignalen nach Transfektion von N2A-Zellen mit dem Testvektor *pMJ-DTRfritCre* (Abb. 4.34). Obwohl sich das Fusionsprotein zum größten Teil in der Peripherie des Zellkerns befand, waren auch Fluoreszenzsignale in der Plasmamembran lokalisiert, wo der DTR seine Funktion, die Bindung und Einschleusung von DT in die Zelle, ausübt. Die Akkumulation des Fusionsproteins im Zellinneren resultierte vermutlich aus der transienten Transfektion der N2A-Zellen, die daher relativ schnell mit der Expression großer Mengen dieses Fusionsproteins begonnen hatten. Dementsprechend befand sich eine große Anzahl von DTReGFP-Molekülen vermutlich im Endoplasmatischen Retikulum. Nach Applikation von DT zu mit dem *pMJ-DTRfritCre*-Vektor transient transfizierten Kulturen starben die Zellen, so dass drei Tage später keine fluoreszierenden Zellen mehr zu sehen waren (Abb. 4.33 und 4.34). Bei den wenigen Zellen, die zu diesem Zeitpunkt noch lebten, war die Transfektion vermutlich nicht erfolgreich gewesen. Auf nicht-transfizierte Zellkulturen wirkte das DT nur leicht wachstumshemmend. Somit sensibilisiert der DTR bzw. das Fusionsprotein DTReGFP die transfizierten N2A-Zellen gegenüber DT.

Bei Versuchen mit DT im Zellkultursystem an stabil transfizierten embryonalen Stammzellen wurde ein komplettes Absterben der Zellkultur bereits 24 h nach Zugabe von DT beschrieben (Buch et al., 2005). Dies war bei den transient transfizierten N2A-Zellen trotz einer 100fach höheren Konzentration des applizierten DTs (10 µg/ml im Vergleich zu 100 ng/ml bei Buch et al., 2005) nicht der Fall. Möglicherweise ist dafür der Neuroblastom-Charakter der N2A-Zellen verantwortlich. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Zelllinie einen oder mehrere Defekte in Apoptose-relevanten Genen aufweist, so dass ein apoptotisches Absterben verzögert eintritt.

Die embryonale ES-Zelllinie HM1 eignete sich nicht für eine transiente Transfektion mit dem Vektor *pMJ-DTRfritCre*, da die Zellen bereits innerhalb von 24 h nach der Transfektion abstarben. Vermutlich bewirkte die durch den CMV-Promotor verursachte starke Ausprägung des DTReGFPs dieses Absterben, möglicherweise durch Veränderungen der Plasmamembran. Ähnliche Befunde traten in anderen Laboren bei Versuchen an ES-Zellen auf (Dr. Thorsten Buch, pers. Mitteilung). Die Expression des DTReGFP-Proteins unter einem endogenen Promotor hat keinen Effekt auf die Vitalität der transfizierten ES-Zellen. So kann das Fusionsprotein nach homologer Rekombination in den ROSA26-Lokus ohne unerwünschte Nebeneffekte in ES-Zellen ausgeprägt werden (Buch et al., 2005). Probleme in der ES-Zellkultur dürfte es bei der Transfektion mit dem Austauschvektor *pKW-DTRfritCre* nicht geben, da der Cx57-Promotor in ES-Zellen nicht aktiv ist (Hombach et al., 2004).

Zellkulturexperimente mit dem Testvektor *pMJ-Cre* haben gezeigt, dass auch die Cre-Rekombinase des *DTRfritCre*-Konstruktes exprimiert wird und gefloxt Gene deletiert. Für die Cre-Rekombinase gilt wie für den DTR, dass es von der Stärke des Cx57-Promotors abhängt, ob es in der Maus zu einer Ausprägung dieser Proteine kommt, die stark genug ist, um die jeweilige biologische Funktion - das Einschleusen des DTs in die Zelle bzw. die genomische Rekombination - zu erfüllen (siehe auch Kap. 5.2.5).

Es konnte nicht untersucht werden, ob die Cre-Rekombinase in Anwesenheit der geflirteten *DTReGFP*-Kassette im *DTRfritCre*-Konstrukt ausprägt wird. Dazu kommt es, wenn die RNS-Polymerase über das polyA-Signal der *DTReGFP*-Kassette hinweg transkribiert. Um dies zu untersuchen, hätten *Cx45flox(eGFP)*-Zellen mit dem Testvektor *pMJ-DTRfritCre* transfiziert werden müssen. HM1-Zellen sterben jedoch 24 h nach Transfektion mit diesem Vektor (s.o.). Würde die Cre-Rekombinase in den Horizontalzellen bereits von dem geflirteten Allel aus exprimiert werden, käme es gleichzeitig zur Ausprägung von DTR und Cre. Dies könnte dann zu unerwünschten Effekten führen, wenn Horizontalzellen in Mäusen ablatiert werden sollen, die ein in Horizontalzellen aktives, gefloxtes Gen tragen. Durch die ungewollte Expression der Cre-Rekombinase käme es zu einer Deletion dieses Gens, was eventuell die Physiologie dieser Zellen verändern und damit die Aussage der Ablationsversuche verfälschen könnte. Dies ist ein theoretisch möglicher, jedoch unwahrscheinlicher Fall, der nur dann eintritt, wenn *DTReGFP* und Cre gleichzeitig ausgeprägt werden würden. Er könnte umgangen werden, wenn *DTRfritCre*-Mäuse nicht mit „geflochten Mäusen“ verpaart werden würden, solange die von *frit*-Erkennungsstellen flankierte *DTReGFP*-Kassette nicht deletiert vorläge.

Die am Zellkultursystem gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass das *DTRfritCre*-Konstrukt alle gewünschten Eigenschaften - Ausprägung eines funktionellen *DTReGFP*-Fusionsproteins sowie Ausprägung einer funktionellen Cre-Rekombinase nach Deletion des geflirteten Bereiches - besitzt. Der nächste Schritt zur Erzeugung einer induzierbaren horizontalzellablatierenden Mausmutante ist die Transfektion von HM1-Zellen mit dem Austauschvektor *pKW-DTRfritCre*, um das *DTRfritCre*-Konstrukt in den *Cx57*-Lokus zu rekombinieren. Diese Aufgabe hätte den zeitlichen Rahmen der vorliegenden Dissertation gesprengt und wurde daher von Stephan Sonntag im Rahmen seiner Dissertation übernommen.

5.5.3 Die *DTRfritCre*-Maus – weitere Aspekte

Wie bereits erörtert, bewirkt vermutlich eine extrem hohe Expressionsrate des DTRs ein Absterben der transfizierten ES-Zellen. Eine relativ starke zelltypspezifische DTR-Ausprägung lag auch in Mäusen vor, die nach Vorkerninjektion bis zu 40 Kopien des DTR-Transgens im Genom integriert haben (Jung et al., 2002). Eine DT-unabhängige Ablation wurde jedoch nicht beobachtet. Da die *DTRfritCre*-Mausmutante mithilfe der homologen Rekombination hergestellt werden wird, besteht eher die Gefahr, dass die Expressionsstärke des *Cx57*-Promotors in den Horizontalzellen der Maus nicht genügt, um sie durch DT zum Absterben zu bringen. In *DTRfritCre*-Mäusen wird *DTReGFP* von höchstens zwei Allelen ausgeprägt. Der *Cx57*-Promotor ist jedoch stark genug, um eine effiziente Kopplung der Horizontalzellen über *Cx57* zu gewährleisten. Ein einziges aufgenommenes DT-Fragment A-Molekül reicht aus, um eine Zelle zu töten (Yamaizumi et al., 1978). Eine sehr geringe Ausprägung von DTR kann durch die Applikation größerer Mengen DT - bis zu 50 ng/g Körpergewicht der Maus (Saito et al., 2001) und/oder durch wiederholte Verabreichung von

DT mehrfach am Tag über einen Zeitraum von mehreren Tagen (Buch et al., 2005, Chen et al., 2005) kompensiert werden. Auch eine Wiederholung der DT-Induktion nach einem längeren Zeitraum ist möglich, da DT in Mäusen nur eine schwache Immunantwort hervorruft, die sich nicht neutralisierend auf das Gift auswirkt (Buch et al., 2005). Der Effekt der DT-Applikation, die Apoptose der DTR-exprimierenden Zellpopulation, trat bei Oligodendrozyten drei Tage nach der letzten DT-Injektion auf, bei Zellen des Immunsystems, z.B. B- und T-Zellen, innerhalb von 24 bis 48 h (Buch et al., 2005). Für Neuronen des ZNS liegen noch keine Ergebnisse vor, allerdings wurde eine induzierte Ablation von sensorischen Neuronen im olfaktorischen Epithel (Riechneuronen) beschrieben (Chen et al., 2005). Erste Anzeichen von Ablationen traten auch hier 24 h nach der ersten DT-Injektion auf. Erst elf Tage später waren 90% der Zellpopulation abgestorben, was jedoch damit zusammenhängt, dass Riechneurone permanent regeneriert werden.

Da die *DTR^{flrt}Cre*-Mausmutante nach Flp-vermittelter Deletion die Cre-Rekombinase unter dem *Cx57*-Promotor ausprägt, ist ein alternativer Ansatz zur induzierbaren Ablation von Horizontalzellen möglich: die Verpaarung dieser *Cx57*-Cre-Mäuse mit Cre-induzierbaren *iDTR*-Mäusen (Buch et al., 2005). In *Cx57*-Cre-transgenen Nachkommen dieser *iDTR*-Mäuse wird die gefloxt Stop-Kassette, die sich zwischen dem in vielen Zelltypen aktiven ROSA26-Promotor (Zambrowicz et al., 1997) und der kodierenden Region des DTReGFPs befindet, in Horizontalzellen deletiert. Auf diese Weise wird der DTR exprimiert, wenn der ROSA26-Promotor in Horizontalzellen aktiv ist. Ein Risikofaktor bei diesem Ansatz ist die Expressionstärke der *Cx57*-Cre-Rekombinase, wie generell bei der Verwendung der *DTR^{flrt}Cre*-Mausmutante als *Cx57*-Cre-Maus. Für eine erfolgreiche genomische Rekombination sind genügend Cre-Moleküle erforderlich.

Eine bereits publizierte DTR-transgene Mausmutante, die in ihrem Aufbau der *DTR^{flrt}Cre*-Maus ähnelt, ist die Langerin-DTR-Mausmutante (Bennett et al., 2005). Sie prägt das Fusionsprotein DTReGFP in Langerhans-Zellen der Epidermis aus. Auch hier wurde das DTReGFP-Konstrukt homolog in den Langerin-Lokus rekombiniert. Es wurden in Langerin-DTR-Mäusen nur einige eGFP-positive Langerhans-Zellen nachgewiesen. Dennoch war die gesamte Zellpopulation bereits 24 h nach DT-Applikation (16 ng/g) komplett ablatiert. Dieser Befund deutet darauf hin, dass ein Expressionniveau, das die Visualisierung von eGFP nicht mehr zulässt, genügt, um Kandidatenzellen gegenüber DT zu sensibilisieren. eGFP-negative Horizontalzellen der *DTR^{flrt}Cre*-Maus sollten daher dennoch durch DT zum Absterben gebracht werden. Ein Antikörper, der den DTR im Gewebe spezifisch erkennt, liegt zurzeit noch nicht vor (Dr. Björn Clausen, pers. Mitteilung).

Bennett et al. (2005) fanden keine Hinweise auf eine Entzündungsreaktion nach induzierter Apoptose der Langerhans-Zellen. Die Apoptose ist anders als die Nekrose durch ein Ausbleiben von Entzündungen charakterisiert. Im Gegensatz dazu kam es nach dem induzierten Absterben von Hepatozyten zu einer Hepatitis (Saito et al., 2001). Es wäre wünschenswert, dass die Retina nach Ablation der Horizontalzellen nicht mit einer

Entzündung reagiert. Infiltrierende Zellen des Immunsystems, z.B. Makrophagen und T-Zellen, könnten physiologische Messungen vermutlich beeinträchtigen.

Das Einbringen des *DTR^{flrt}Cre*-Konstruktes in den *Cx57*-Lokus hat den weiteren Vorteil, dass eine zweite *Cx57*-Defekt-Mausmutante hergestellt werden kann, in der *Cx57* deletiert, aber keine β -Galaktosidase exprimiert wird. Dies kann bei Verpaarung mit anderen Reportermausen, die die β -Galaktosidase ebenfalls in der Retina ausdragen, wichtig sein.

Es sollte beachtet werden, dass die Mäuse bei Verwendung des *DTR^{flrt}Cre*- oder des *Cre*-Allels für *Cx57* heterozygot sind. Anders als bei anderen Connexinen reduziert sich die Kopplung der Horizontalzellen auf nahezu die Hälfte, wenn *Cx57* nur noch von einem Allel aus exprimiert wird (Shelley et al, 2006). Bei der Analyse der Phänotypen nach der induzierten Ablation der Horizontalzellen und bei der Deletion gefloxter Gene in den Horizontalzellen muss dieser Aspekt berücksichtigt werden. Zur Entstehung eines auftretenden Phänotyps kann partiell auch die reduzierte Kopplung verantwortlich sein.

Der *Cx57*-Promotor ist während der Entwicklung in der embryonalen Niere aktiv (Hombach et al., 2004). Die Ausprägung des DTR allein hat keinen Einfluss auf die Physiologie der entsprechenden Zellen. Möglicherweise kommt es jedoch zu einer Schädigung der Niere der Embryonen, wenn den schwangeren Müttern DT appliziert wird. Eine Ablation von Horizontalzellen sollte daher erst nach der Geburt angestrebt werden.

Gibt es Zellen in anderen Bereichen des ZNS, die den DTR ausdragen, ist das für die Fragestellung, welchen Einfluss die Horizontalzellen auf die Physiologie der Retina haben, unerheblich, solange die *DTR^{flrt}Cre*-Mäuse bei der Applikation von DT nicht sterben. Die Signalmodulation über die Horizontalzellen steht am Anfang der visuellen Informationsverarbeitung. Veränderungen in höheren Schaltzentren des Gehirns sollten darauf keinen unmittelbaren Einfluss haben.

Bereits 1997 wurden von Peachey et al. Mäuse analysiert, in denen es mithilfe eines Onkogens zur Degeneration von Horizontalzellen kam (auch Hammang et al., 1993). Die Degeneration betraf jedoch auch andere neuronale Subtypen und konnte nicht induziert werden, sondern spielte sich in einem Zeitraum von zwei Wochen nach der Geburt ab. Im Gegensatz dazu sollte die Ablation von Horizontalzellen in *DTR^{flrt}Cre*-Mäusen nach Induktion von DT zu einem beliebigen Zeitpunkt sehr zelltypspezifisch sein. Technische Neuerungen erlauben darüber hinaus eine sehr viel genauere elektrophysiologische Analyse der Retinae mit ablatierten Horizontalzellen, als es 1997 möglich war.

Mit der *Cx57*-Defekt-Mausmutante wurde kürzlich bereits eine alternative induzierte Ablation von Horizontalzellen in der Retina angestrebt. Die dabei verwendete Methode nutzte die Expression der β -Galaktosidase in diesen Zellen zur enzymatischen Umwandlung eines der Maus injizierten Substrates, das nach einer zusätzlichen Photoinduktion toxisch wirkt (Nirenberg, 2000). Ein Absterben der Horizontalzellen wurde jedoch nur in isolierten Retinae erreicht, da die Photoinduktion *in situ* vermutlich nicht ausreichend war. Ergebnisse physiologischer Messungen liegen nicht vor. Des Weiteren eigneten sich nur homozygot *Cx57*-defiziente Retinae für eine Horizontalzellablation, da erst hier die β -Galaktosidase-

Ausprägung für die gewünschte Reaktion stark genug war (Dr. Karin Dedek, pers. Mitteilung). Mit der DTR^{fl}Cre-Mausmutante könnten diese Probleme eventuell umgangen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mausmutante, die *Cx36flox(CFP)*-Maus, erzeugt, in der das Connexin36 (Cx36)-Protein konditional durch das blaue Fluoreszenz-Protein (*cyan fluorescent protein*, CFP) ersetzt werden konnte. Es wurde gezeigt, dass diese Maus alle gewünschten Eigenschaften einer konditionalen Cx36-defizienten Mutante aufweist: Das Cx36-Protein wird in Anwesenheit der loxP-Erkennungssequenzen ausgeprägt und bildet funktionelle Gap Junction-Kanäle. Wenn die gefloxt Cx36-kodierende Region durch die Phosphoglyzeratkinase- oder die Nestin-Cre-Rekombinase deletiert wird, wird das CFP-Reportergen exprimiert. Dabei ist die CFP-Expression generell ein verlässlicher Reporter für die Cx36-Ausprägung. Experimente mit Cre-Rekombinasen, ausgeprägt unter der Kontrolle weiterer Promotoren, deuten darauf hin, dass eine Deletion von Cx36 nicht mit allen Cre-Transgenen erzielt werden kann, wie es in der *Cx36flox(LacZ)*-Maus der Fall ist. Es scheint, dass die loxP-Stellen der *Cx36flox(CFP)*-Mutante vermutlich nach der Geburt nicht mehr zugänglich für die Cre-Rekombinase sind. Um mit der konditional Cx36-defizienten Maus zu arbeiten, ist daher eine sorgfältige Analyse zur Identifikation der Zellen erforderlich, in denen Cx36 durch eine bestimmte Cre-Rekombinase deletiert wurde. Durch Verpaarung von *Cx36flox(CFP)*-Mäusen mit Parvalbumin-Cre-transgenen Mäusen wurde eine Deletion von Cx36 in den Kleinhirnkernen, nicht aber in den Neuronen der inferioren Olive erzielt. Es wurde in einem Verhaltenstest gezeigt, dass diese Mäuse im Gegensatz zu ubiquitär Cx36-deletierten Mäusen keine vom Lernen abhängige zeitliche Koordination des Augenblink-Reflexes aufweisen. Durch die gezielte Ausschaltung von Cx36 in neuronalen Subtypen konnte so die Rolle der elektrotonischen Kopplung in einem bestimmten Bereich des Zentralen Nervensystems, der inferioren Olive, analysiert werden.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit Antikörper gegen das Connexin57 (Cx57)-Protein charakterisiert. Anhand von Cx57-Defekt-Mäusen wurde gezeigt, dass die *Cx57-Mid*-Antikörper Cx57 spezifisch in Horizontalzellen der Retina erkennen. Damit wurde zum ersten Mal der Nachweis erbracht, dass Cx57 als Protein in diesem Zelltyp vorliegt.

Der in dieser Arbeit klonierte *pKW-DTRfritCre*-Austauschvektor erlaubt die Herstellung einer transgenen Mausmutante, in der die Horizontalzellen selektiv und mithilfe des Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR)/Diphtherie(DT)-Systems induziert ablatiert werden können. Die Verpaarung dieser Mäuse mit transgenen, ubiquitär deletierenden Flp-Rekombinase-Mäusen ermöglicht die Horizontalzell-spezifische Deletion von gefloxt Genen. Darauf deuten Zellkulturversuche hin, in denen das *DTRfritCre*-Konstrukt vor und nach Deletion durch die Flp-Rekombinase getestet wurde. Mit diesen „genetischen Werkzeugen“ und den Cx57-spezifischen Antikörpern kann die Biologie der Horizontalzellen weiter erforscht werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Ai Z, Fischer A, Spray DC, Brown AM, Fishman GI (2000) Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 105: 161-171.
- Al Ubaidi MR, White TW, Ripps H, Poras I, Avner P, Gomes D, Bruzzone R (2000) Functional properties, developmental regulation, and chromosomal localization of murine connexin36, a gap-junctional protein expressed preferentially in retina and brain. *J Neurosci Res* 59: 813-826.
- Allagnat F, Martin D, Condorelli DF, Waeber G, Haefliger JA (2005) Glucose represses connexin36 in insulin-secreting cells. *J Cell Sci* 118: 5335-5344.
- Altevogt BM, Kleopa KA, Postma FR, Scherer SS, Paul DL (2002) Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci* 22: 6458-6470.
- Arumugam H, Liu X, Colombo PJ, Corriveau RA, Belousov AB (2005) NMDA receptors regulate developmental gap junction uncoupling via CREB signaling. *Nat Neurosci* 8: 1720-1726.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16: 1-13.
- Baylor DA, Fuortes MG, O'Bryan PM (1971) Receptive fields of cones in the retina of the turtle. *J Physiol* 214: 265-294.
- Belluardo N, Mud inverted question mG, Trovato-Salinaro A, Le Gurun S, Charollais A, Serre-Beinier V, Amato G, Haefliger JA, Meda P, Condorelli DF (2000) Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain. *Brain Res* 19;865: 121-138.
- Benninghoff A. *Anatomie; makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 2002.
- Bennett CL, van Rijn E, Jung S, Inaba K, Steinman RM, Kapsenberg ML, Clausen BE (2005) Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* 169: 569-576.
- Bennett MV, Contreras JE, Bukauskas FF, Saez JC (2003) New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci* 26: 610-617.
- Betz UA, Vosshenrich CA, Rajewsky K, Muller W (1996) Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination. *Curr Biol* 6: 1307-1316.
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA (1987) Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol* 105: 2621-2629.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
- Blenkinsop TA, Lang EJ (2006) Block of inferior olive gap junctional coupling decreases Purkinje cell complex spike synchrony and rhythmicity. *J Neurosci* 26: 1739-1748.
- Bloomfield SA, Xin D, Persky SE (1995) A comparison of receptive field and tracer coupling size of horizontal cells in the rabbit retina. *Vis Neurosci* 12: 985-999.
- Boengler K, Dodoni G, Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Ruiz-Meana M, Gres P, Konietzka I, Lopez-Iglesias C, Garcia-Dorado D, Di Lisa F, Heusch G, Schulz R (2005) Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 67: 234-244.
- Boengler K, Schulz R, Heusch G (2005) Connexin 43 signaling and cardioprotection. *Heart online*.

- Borrelli E, Heyman R, Hsi M, Evans RM (1988) Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 7572-7576.
- Brockschneider D, Lappe-Siefke C, Goebbels S, Boesl MR, Nave KA, Riethmacher D (2004) Cell depletion due to diphtheria toxin fragment A after Cre-mediated recombination. *Mol Cell Biol* 24: 7636-7642.
- Brockschneider D, Pechmann Y, Sonnenberg-Riethmacher E, Riethmacher D (2006) An improved mouse line for Cre-induced cell ablation due to diphtheria toxin A, expressed from the Rosa26 locus. *Genesis* 44: 322-327.
- Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H (2003) Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13644-13649.
- Bruzzone R, Ressot C (1997) Connexins, gap junctions and cell-cell signalling in the nervous system. *Eur J Neurosci* 9: 1-6.
- Buch T, Heppner FL, Tertilt C, Heinen TJ, Kremer M, Wunderlich FT, Jung S, Waisman A (2005) A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods* 2: 419-426.
- Buchholz F, Angrand PO, Stewart AF (1996) A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res* 24: 3118-3119.
- Buhl DL, Harris KD, Hormuzdi SG, Monyer H, Buzsaki G (2003) Selective impairment of hippocampal gamma oscillations in connexin-36 knock-out mouse in vivo. *J Neurosci* 23: 1013-1018.
- Bukauskas FF, Verselis VK (2004) Gap junction channel gating. *Biochim Biophys Acta* 1662: 42-60.
- Butkevich E, Hulsman 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* 20;14: 650-658.
- Casanova E, Fehsenfeld S, Mantamadiotis T, Lemberger T, Greiner E, Stewart AF, Schutz G (2001) A CamKIIalpha iCre BAC allows brain-specific gene inactivation. *Genesis* 31: 37-42.
- Cha JH, Chang MY, Richardson JA, Eidels L (2003) Transgenic mice expressing the diphtheria toxin receptor are sensitive to the toxin. *Mol Microbiol* 49: 235-240.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- Chen H, Kohno K, Gong Q (2005) Conditional ablation of mature olfactory sensory neurons mediated by diphtheria toxin receptor. *J Neurocytol* 34: 37-47.
- Chen L, Yang P, Kijlstra A (2002) Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm* 10: 27-39.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- Christie JM, Bark C, Hormuzdi SG, Helbig I, Monyer H, Westbrook GL (2005) Connexin36 mediates spike synchrony in olfactory bulb glomeruli. *Neuron* 46: 761-772.
- Condorelli DF, Parenti R, Spinella F, Trovato SA, Belluardo N, Cardile V, Cicirata F (1998) Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur J Neurosci* 10: 1202-1208.
- Condorelli DF, Trovato-Salinaro A, Mudo G, Mirone MB, Belluardo N (2003) Cellular expression of connexins in the rat brain: neuronal localization, effects of kainate-induced seizures and expression in apoptotic neuronal cells. *Eur J Neurosci* 18: 1807-1827.

- Contreras JE, Sanchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, Bukauskas FF, Bennett MV, Saez JC (2002) Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 495-500.
- Dang X, Jeyaraman M, Kardami E (2006) Regulation of Connexin-43-Mediated Growth Inhibition by a Phosphorylatable Amino-Acid is Independent of Gap Junction-Forming Ability. *Mol Cell Biochem* 289: 201-207.
- de Lecea L, del Rio JA, Soriano E (1995) Developmental expression of parvalbumin mRNA in the cerebral cortex and hippocampus of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 32: 1-13.
- De Vuyst E, Decrock E, Cabooter L, Dubyak GR, Naus CC, Evans WH, Leybaert L (2006) Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. *EMBO J* 25: 34-44.
- De Zeeuw CI, Chorev E, Devor A, Manor Y, Van Der Giessen RS, De Jeu MT, Hoogenraad CC, Bijman J, Ruigrok TJ, French P, Jaarsma D, Kistler WM, Meier C, Petrasch-Parwez E, Dermietzel R, Sohl G, Gueldenagel M, Willecke K, 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.
- Deans MR, Gibson JR, Sellitto C, Connors BW, Paul DL (2001) Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36. *Neuron* 31: 477-485.
- Deans MR, Paul DL (2001) Mouse horizontal cells do not express connexin26 or connexin36. *Cell Commun Adhes* 8: 361-366.
- Dedek K, Pandarinath C, Alam NM, Wellershaus K, Willecke K, Prusky GT, Weiler R, Nirenberg S. The coupling of horizontal cells does not contribute to the spatial tuning of mouse retinal ganglion cells. (in Vorbereitung).
- Dedek K, Schultz K, Pieper M, Dirks P, Maxeiner S, Willecke K, Weiler R, Janssen-Bienhold U (2006) Localization of heterotypic gap junctions composed of connexin45 and connexin36 in the rod pathway of the mouse retina. *Eur J Neurosci* 24: 1675-1686.
- Degen J, Meier C, Van Der Giessen RS, Sohl G, Petrasch-Parwez E, Urschel S, Dermietzel R, Schilling K, De Zeeuw CI, Willecke K (2004) Expression pattern of lacZ reporter gene representing connexin36 in transgenic mice. *J Comp Neurol* 473: 511-525.
- Degen, Joachim. Erzeugung und Charakterisierung von konditionalen Knock-In Reporter-gen-Mäusen des Connexin36. Dissertation, Universität Bonn (2003).
- del Rio JA, de Lecea L, Ferrer I, Soriano E (1994) The development of parvalbumin-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 81: 247-259.
- Dermietzel R, Kremer M, Paputsoglu G, Stang A, Skerrett IM, Gomes D, Srinivas M, Janssen-Bienhold U, Weiler R, Nicholson BJ, Bruzzone R, Spray DC (2000) Molecular and functional diversity of neural connexins in the retina. *J Neurosci* 20: 8331-8343.
- DeVries SH, Qi X, Smith R, Makous W, Sterling P (2002) Electrical coupling between mammalian cones. *Curr Biol* 19;12: 1900-1907.
- Di WL, Monypenny J, Common JE, Kennedy CT, Holland KA, Leigh IM, Rugg EL, Zicha D, Kelsell DP (2002) Defective trafficking and cell death is characteristic of skin disease-associated connexin 31 mutations. *Hum Mol Genet* 11: 2005-2014.
- Dobrenis K, Chang HY, Pina-Benabou MH, Woodroffe A, Lee SC, Rozental R, Spray DC, Scemes E (2005) Human and mouse microglia express connexin36, and functional gap junctions are formed between rodent microglia and neurons. *J Neurosci Res* 82: 306-315.

- Dowling JE. *The Retina. An Approachable Part of the Brain.* The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, and London, England, 1987.
- Dymecki SM (1996) Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6191-6196.
- Eckardt D, Theis M, Degen J, Ott T, van Rijen HV, Kirchhoff S, Kim JS, de Bakker JM, Willecke K (2004) Functional role of connexin43 gap junction channels in adult mouse heart assessed by inducible gene deletion. *J Mol Cell Cardiol* 36: 101-110.
- Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hulser DF, Willecke K (1995) Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129: 805-817.
- Evans WH, Martin PE (2002) Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol* 19: 121-136.
- Fahrenfort I, Klooster J, Sjoerdsma T, Kamermans M (2005) The involvement of glutamate-gated channels in negative feedback from horizontal cells to cones. *Prog Brain Res* 147:219-229.: 219-229.
- Feigenspan A, Janssen-Bienhold U, Hormuzdi S, Monyer H, Degen J, Sohl G, Willecke K, Ammermuller J, Weiler R (2004) Expression of connexin36 in cone pedicles and OFF-cone bipolar cells of the mouse retina. *J Neurosci* 24: 3325-3334.
- Feigenspan A, Teubner B, Willecke K, Weiler R (2001) Expression of neuronal connexin36 in All amacrine cells of the mammalian retina. *J Neurosci* 21: 230-239.
- Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10887-10890.
- Filippov MA, Hormuzdi SG, Fuchs EC, Monyer H (2003) A reporter allele for investigating connexin 26 gene expression in the mouse brain. *Eur J Neurosci* 18: 3183-3192.
- Foote CI, Zhou L, Zhu X, Nicholson BJ (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.
- Fraser SE, Green CR, Bode HR, Gilula NB (1987) Selective disruption of gap junctional communication interferes with a patterning process in hydra. *Science* 237: 49-55.
- FURSHPAN EJ, POTTER DD (1959) Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol* 145: 289-325.
- Gabriel HD, Jung D, Butzler C, Temme A, Traub O, Winterhager E, Willecke K (1998) Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J Cell Biol* 140: 1453-1461.
- Garrick D, Fiering S, Martin DI, Whitelaw E (1998) Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat Genet* 18: 56-59.
- Giaume C, Venance L (1998) Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia* 24: 50-64.
- Giepmans BN, Moolenaar WH (1998) The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr Biol* 8: 931-934.
- Giepmans BN, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM, Moolenaar WH (2001) Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol* 11: 1364-1368.
- Gilula NB, Epstein ML, Beers WH (1978) Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol* 78: 58-75.

- Gimlich RL, Kumar NM, Gilula NB (1990) Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos. *J Cell Biol* 110: 597-605.
- Giraldo P, Montoliu L (2001) Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res* 10: 83-103.
- Goldberg GS, Lampe PD, Nicholson BJ (1999) Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nat Cell Biol* 1: 457-459.
- Goldberg GS, Lampe PD, Sheedy D, Stewart CC, Nicholson BJ, Naus CC (1998) Direct isolation and analysis of endogenous transjunctional ADP from Cx43 transfected C6 glioma cells. *Exp Cell Res* 239: 82-92.
- Goldberg GS, Valiunas V, Brink PR (2004) Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta* 1662: 96-101.
- Goodenough DA (1992) The crystalline lens. A system networked by gap junctional intercellular communication. *Semin Cell Biol* 3: 49-58.
- Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL (1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65:475-502.: 475-502.
- Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5547-5551.
- Goyal VK (1982) Lipofuscin pigment accumulation in the central nervous system of the mouse during aging. *Exp Gerontol* 17: 89-94.
- Gros DB, Jongsma HJ (1996) Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 18: 719-730.
- Gu H, Zou YR, Rajewsky K (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73: 1155-1164.
- Guldenagel M, Ammermuller J, Feigenspan A, Teubner B, Degen J, Sohl G, Willecke K, Weiler R (2001) Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin36. *J Neurosci* 21: 6036-6044.
- Guo H, Hong S, Jin XL, Chen RS, Avasthi PP, Tu YT, Ivanco TL, Li Y (2000) Specificity and efficiency of Cre-mediated recombination in *Emx1*-Cre knock-in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 661-665.
- Guo Y, Martinez-Williams C, Rannels DE (2003) Gap junction-microtubule associations in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L1213-L1221.
- Haefliger JA, Bruzzone R, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Paul DL (1992) Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. Molecular cloning, expression, and chromosome mapping. *J Biol Chem* 267: 2057-2064.
- Hammang JP, Behringer RR, Baetge EE, Palmiter RD, Brinster RL, Messing A (1993) Oncogene expression in retinal horizontal cells of transgenic mice results in a cascade of neurodegeneration. *Neuron* 10: 1197-1209.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Hanemann CO, Bergmann C, Senderek J, Zerres K, Sperfeld AD (2003) Transient, recurrent, white matter lesions in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with novel connexin 32 mutation. *Arch Neurol* 60: 605-609.
- He S, Weiler R, Vaney DI (2000) Endogenous dopaminergic regulation of horizontal cell coupling in the mammalian retina. *J Comp Neurol* 418: 33-40.

- Heinzel FR, Luo Y, Li X, Boengler K, Buechert A, Garcia-Dorado D, Di Lisa F, Schulz R, Heusch G (2005) Impairment of diazoxide-induced formation of reactive oxygen species and loss of cardioprotection in connexin 43 deficient mice. *Circ Res* 97: 583-586.
- Hempelmann A, Heils A, Sander T (2006) Confirmatory evidence for an association of the connexin-36 gene with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Res* 71: 223-228.
- Henderson D, Eibl H, Weber K (1979) Structure and biochemistry of mouse hepatic gap junctions. *J Mol Biol* 132: 193-218.
- Henikoff S (1998) Conspiracy of silence among repeated transgenes. *Bioessays* 20: 532-535.
- Hertzberg EL, Gilula NB (1979) Isolation and characterization of gap junctions from rat liver. *J Biol Chem* 254: 2138-2147.
- Hestrin S, Galarreta M (2005) Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *Trends Neurosci* 28: 304-309.
- Heynkes R, Kozjek G, Traub O, Willecke K (1986) Identification of a rat liver cDNA and mRNA coding for the 28 kDa gap junction protein. *FEBS Lett* 205: 56-60.
- Hombach S, Janssen-Bienhold U, Sohl G, Schubert T, Bussow H, Ott T, Weiler R, Willecke K (2004) Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *Eur J Neurosci* 19: 2633-2640.
- Hombach, Sonja. Erzeugung und Charakterisierung von Knock-In Reportergergen-Mäusen des Connexin57 und Versuche zur Herstellung spezifischer Antikörper. Dissertation, Universität Bonn (2004).
- Hombach, Sonja. Untersuchungen zur gezielten Deletion des Connexin57-Gens in embryonalen Stammzellen der Maus und zur Aufreinigung von Cx57-Antikörpern. Diplomarbeit, Universität Bonn (2000).
- Homma N, Alvarado JL, Coombs W, Stergiopoulos K, Taffet SM, Lau AF, Delmar M (1998) A particle-receptor model for the insulin-induced closure of connexin43 channels. *Circ Res* 83: 27-32.
- Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O (1968) Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem* 243: 3553-3555.
- Hormuzdi SG, Filippov MA, Mitropoulou G, Monyer H, Bruzzone R (2004) Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochim Biophys Acta* 1662: 113-137.
- Hormuzdi SG, Pais I, LeBeau FE, Towers SK, Rozov A, Buhl EH, Whittington MA, Monyer H (2001) Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice. *Neuron* 31: 487-495.
- Hunter AW, Barker RJ, Zhu C, Gourdie RG (2005) Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. *Mol Biol Cell* 16: 5686-5698.
- Janssen-Bienhold U, Schultz K, Gellhaus A, Schmidt P, Ammermuller J, Weiler R (2001) Identification and localization of connexin26 within the photoreceptor-horizontal cell synaptic complex. *Vis Neurosci* 18: 169-178.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH (1998) The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18: 8936-8946.
- John SA, Revel JP (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.

- Jones HW, Jr., McKusick VA, Harper PS, Wu KD (1971) George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet Gynecol* 38: 945-949.
- Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los SK, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR, Lang RA (2002) In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17: 211-220.
- Kamermans M, Fahrenfort I (2004) Ephaptic interactions within a chemical synapse: hemichannel-mediated ephaptic inhibition in the retina. *Curr Opin Neurobiol* 14: 531-541.
- Kamermans M, Fahrenfort I, Schultz K, Janssen-Bienhold U, Sjoerdsma T, Weiler R (2001) Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science* 292: 1178-1180.
- Kandler K (1997) Coordination of neuronal activity by gap junctions in the developing neocortex. *Semin Cell Dev Biol* 8: 43-51.
- Khorasanizadeh S (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116: 259-272.
- Kidder GM, Winterhager E (2001) Intercellular communication in preimplantation development: the role of gap junctions. *Front Biosci* 6:D731-6.: D731-D736.
- Kistler WM, De Jeu MT, Elgersma Y, Van Der Giessen RS, Hensbroek R, Luo C, Koekkoek SK, Hoogenraad CC, Hamers FP, Gueldenagel M, Sohl G, Willecke K, De Zeeuw CI (2002) Analysis of Cx36 knockout does not support tenet that olivary gap junctions are required for complex spike synchronization and normal motor performance. *Ann N Y Acad Sci* 978:391-404.: 391-404.
- Kleopa KA, Orthmann JL, Enriquez A, Paul DL, Scherer SS (2004) Unique distributions of the gap junction proteins connexin29, connexin32, and connexin47 in oligodendrocytes. *Glia* 47: 346-357.
- Kobayashi K, Morita S, Sawada H, Mizuguchi T, Yamada K, Nagatsu I, Fujita K, Kreitman RJ, Pastan I, Nagatsu T (1995) Immunotoxin-mediated conditional disruption of specific neurons in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1132-1136.
- Kreuzberg MM, Schrickel JW, Ghanem A, Kim JS, Degen J, Janssen-Bienhold U, Lewalter T, Tiemann K, 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.
- Kreuzberg MM, Sohl G, Kim JS, Verselis VK, Willecke K, Bukauskas FF (2005) Functional properties of mouse connexin30.2 expressed in the conduction system of the heart. *Circ Res* 96: 1169-1177.
- Kruger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, Willecke K (2000) Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 127: 4179-4193.
- Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84: 381-388.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lai A, Le DN, Paznekas WA, Gifford WD, Jabs EW, Charles AC (2006) Oculodentodigital dysplasia connexin43 mutations result in non-functional connexin hemichannels and gap junctions in C6 glioma cells. *J Cell Sci* 119: 532-541.
- Laird DW (2005) Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochim Biophys Acta* 1711: 172-182.
- Laird DW (2006) Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 394: 527-543.
- Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 19: 4293.

- Lallemand Y, Luria V, Haffner-Krausz R, 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.
- Lampl I, Yarom Y (1993) Subthreshold oscillations of the membrane potential: a functional synchronizing and timing device. *J Neurophysiol* 70: 2181-2186.
- Lan Z, Kurata WE, Martyn KD, Jin C, Lau AF (2005) Novel rab GAP-like protein, CIP85, interacts with connexin43 and induces its degradation. *Biochemistry* 44: 2385-2396.
- Landisman CE, Long MA, Beierlein M, Deans MR, Paul DL, Connors BW (2002) Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *J Neurosci* 22: 1002-1009.
- Latt, Steffen. Versuche zur Charakterisierung des Connexin57 in transfizierten Kulturzellen. Diplomarbeit, Universität Bonn (2004).
- Le YZ, Ash JD, Al Ubaidi MR, Chen Y, Ma JX, Anderson RE (2004) Targeted expression of Cre recombinase to cone photoreceptors in transgenic mice. *Mol Vis* 10:1011-8.: 1011-1018.
- Lee P, Morley G, Huang Q, Fischer A, Seiler S, Horner JW, Factor S, Vaidya D, Jalife J, Fishman GI (1998) Conditional lineage ablation to model human diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11371-11376.
- Lem J, Applebury ML, Falk JD, Flannery JG, Simon MI (1991) Tissue-specific and developmental regulation of rod opsin chimeric genes in transgenic mice. *Neuron* 6: 201-210.
- Li X, Olson C, Lu S, Kamasawa N, Yasumura T, Rash JE, Nagy JI (2004 a) Neuronal connexin36 association with zonula occludens-1 protein (ZO-1) in mouse brain and interaction with the first PDZ domain of ZO-1. *Eur J Neurosci* 19: 2132-2146.
- Li X, Olson C, Lu S, Nagy JI (2004 b) Association of connexin36 with zonula occludens-1 in HeLa cells, betaTC-3 cells, pancreas, and adrenal gland. *Histochem Cell Biol* 122: 485-498.
- Lin JH, Yang J, Liu S, Takano T, Wang X, Gao Q, Willecke K, Nedergaard M (2003) Connexin mediates gap junction-independent resistance to cellular injury. *J Neurosci* 23: 430-441.
- Llinás RR (1991) Depolarization release coupling: an overview. *Ann N Y Acad Sci* 635:3-17.: 3-17.
- Locovei S, Wang J, Dahl G (2006) Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett* 580: 239-244.
- Long MA, Deans MR, Paul DL, Connors BW (2002) Rhythmicity without synchrony in the electrically uncoupled inferior olive. *J Neurosci* 22: 10898-10905.
- Magin TM, McWhir J, Melton DW (1992) A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res* 20: 3795-3796.
- Marshall VM, Allison J, Templeton T, Foote SJ (2004) Generation of BAC transgenic mice. *Methods Mol Biol* 256:159-82.
- Mas C, Taske N, Deutsch S, Guipponi M, Thomas P, Covanis A, Friis M, Kjeldsen MJ, Pizzolato GP, Villemure JG, Buresi C, Rees M, Malafosse A, Gardiner M, Antonarakis SE, Meda P (2004) Association of the connexin36 gene with juvenile myoclonic epilepsy. *J Med Genet* 41: e93.
- Masland RH (2001 a) Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol* 11: 431-436.
- Masland RH (2001 b) The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4: 877-886.
- Maxeiner S, Dedek K, Janssen-Bienhold U, Ammermuller J, Brune H, Kirsch T, Pieper M, Degen J, Kruger O, Willecke K, Weiler R (2005) Deletion of connexin45 in mouse retinal neurons disrupts the

rod/cone signaling pathway between All amacrine and ON cone bipolar cells and leads to impaired visual transmission. *J Neurosci* 19;25: 566-576.

Maxeiner S, Kruger O, Schilling K, Traub O, Urschel S, Willecke K (2003) Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience* 119: 689-700.

Maxeiner, Stephan. Untersuchung zur Funktion von Cx45 in Neuronen und im Herzen mithilfe von konditionalen Connexin45-Defektmäusen. Dissertation, Universität Bonn (2005).

Mesnil M, Crespin S, Avanzo JL, Zaidan-Dagli ML (2005) Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 20;1719: 125-145.

Miltner WH, Braun C, Arnold M, Witte H, Taub E (1999) Coherence of gamma-band EEG activity as a basis for associative learning. *Nature* 397: 434-436.

Mitamura T, Higashiyama S, Taniguchi N, Klagsbrun M, Mekada E (1995) Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J Biol Chem* 270: 1015-1019.

Mochizuki Y, Park MK, Mori T, Kawashima S (1995) The difference in autofluorescence features of lipofuscin between brain and adrenal. *Zoolog Sci* 12: 283-288.

Moreno AP, Laing JG, Beyer EC, Spray DC (1995) Properties of gap junction channels formed of connexin 45 endogenously expressed in human hepatoma (SKHep1) cells. *Am J Physiol* 268: C356-C365.

Morimoto H, Bonavida B (1992) Diphtheria toxin- and Pseudomonas A toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 149: 2089-2094.

Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-50.: 335-350.

Nagai Y, Sano H, Yokoi M (2005) Transgenic expression of Cre recombinase in mitral/tufted cells of the olfactory bulb. *Genesis* 43: 12-16.

Naglich JG, Metherall JE, Russell DW, Eidels L (1992) Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* 69: 1051-1061.

Nagy A, Perrimon N, Sandmeyer S, Plasterk R (2003) Tailoring the genome: the power of genetic approaches. *Nat Genet* 33 Suppl:276-84.: 276-284.

Nagy JI, Ionescu AV, Lynn BD, Rash JE (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.

Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J (2005) Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 434: 83-88.

Nelson SB, Hempel C, Sugino K (2006) Probing the transcriptome of neuronal cell types. *Curr Opin Neurobiol* 16: 571-576.

Nicholson B, Dermietzel R, Teplow D, Traub O, Willecke K, Revel JP (1987) Two homologous protein components of hepatic gap junctions. *Nature* 329: 732-734.

Nirenberg S (2000) Photoablation of cells expressing beta-galactosidase. *Methods Mol Biol* 135:475-80.: 475-480.

Odermatt B, Wellershaus K, Wallraff A, Seifert G, Degen J, Euwens C, Fuss B, Bussow H, Schilling K, Steinhauser C, 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.

Olmsted JB, Carlson K, Klebe R, Ruddle F, Rosenbaum J (1970) Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65: 129-136.

Pakhotin P, Verkhratsky A (2005) Electrical synapses between Bergmann glial cells and Purkinje neurones in rat cerebellar slices. *Mol Cell Neurosci* 28: 79-84.

Palmiter RD, Behringer RR, Quaife CJ, Maxwell F, Maxwell IH, Brinster RL (1987) Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene. *Cell* 50: 435-443.

Pappenheimer AM, Jr., Harper AA, Moynihan M, Brockes JP (1982) Diphtheria toxin and related proteins: effect of route of injection on toxicity and the determination of cytotoxicity for various cultured cells. *J Infect Dis* 145: 94-102.

Parpura V, Haydon PG (2000) Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8629-8634.

Paznekas WA, Boyadjev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, Innis JW, Dinulos MB, Christian C, Hannibal MC, Jabs EW (2003) Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet* 72: 408-418.

Peachey NS, Roveri L, Messing A, McCall MA (1997) Functional consequences of oncogene-induced horizontal cell degeneration in the retinas of transgenic mice. *Vis Neurosci* 14: 627-632.

Pearson RA, Dale N, Llaudet E, Mobbs P (2005) ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* 46: 731-744.

Pereda A, O'Brien J, Nagy JI, Bukauskas F, Davidson KG, Kamasawa N, Yasumura T, Rash JE (2003 a) Connexin35 mediates electrical transmission at mixed synapses on Mauthner cells. *J Neurosci* 20;23: 7489-7503.

Pereda A, O'Brien J, Nagy JI, Smith M, Bukauskas F, Davidson KG, Kamasawa N, Yasumura T, Rash JE (2003 b) Short-range functional interaction between connexin35 and neighboring chemical synapses. *Cell Commun Adhes* 10: 419-423.

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

Perkins GA, Goodenough DA, Sosinsky GE (1998) Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons. *J Mol Biol* 277: 171-177.

Perlman I, Ammermuller J (1994) Receptive-field size of L1 horizontal cells in the turtle retina: effects of dopamine and background light. *J Neurophysiol* 72: 2786-2795.

Phelan P, Starich TA (2001) Innexins get into the gap. *Bioessays* 23: 388-396.

Placantonakis D, Cicerata F, Welsh JP (2002) A dominant negative mutation of neuronal connexin 36 that blocks intercellular permeability. *Brain Res Mol Brain Res* 98: 15-28.

Placantonakis DG, Bukovsky AA, Aicher SA, Kiem HP, Welsh JP (2006) Continuous electrical oscillations emerge from a coupled network: a study of the inferior olive using lentiviral knockdown of connexin36. *J Neurosci* 26: 5008-5016.

Pottek M, Hoppenstedt W, Janssen-Bienhold U, Schultz K, Perlman I, Weiler R (2003) Contribution of connexin26 to electrical feedback inhibition in the turtle retina. *J Comp Neurol* 466: 468-477.

Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F (1996) Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98: 600-603.

- Rash JE, Staines WA, Yasumura T, Patel D, Furman CS, Stelmack GL, Nagy JI (2000) Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proc Natl Acad Sci U S A* 20;97: 7573-7578.
- Ray MK, Fagan SP, Moldovan S, DeMayo FJ, Brunicardi FC (1999) Development of a transgenic mouse model using rat insulin promoter to drive the expression of CRE recombinase in a tissue-specific manner. *Int J Pancreatol* 25: 157-163.
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J (1995) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267: 1831-1834.
- Reitsamer HA, Pflug R, Franz M, Huber S (2006) Dopaminergic modulation of horizontal-cell-axon-terminal receptive field size in the mammalian retina. *Vision Res* 46: 467-474.
- Reuss B, Hellmann P, Traub O, Butterweck A, Winterhager E (1997) Expression of connexin31 and connexin43 genes in early rat embryos. *Dev Genet* 21: 82-90.
- Revel JP, Karnovsky MJ (1967) Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* 33: C7-C12.
- Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25: 139-140.
- Rodriguez-Sinovas A, Boengler K, Cabestrero A, Gres P, Morente M, Ruiz-Meana M, Konietzka I, Miro E, Totzeck A, Heusch G, Schulz R, Garcia-Dorado D (2006) Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection. *Circ Res* 99: 93-101.
- Rozental R, Morales M, Mehler MF, Urban M, Kremer M, Dermietzel R, Kessler JA, Spray DC (1998) Changes in the properties of gap junctions during neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci* 18: 1753-1762.
- Rozental R, Srinivas M, Spray DC (2001) How to close a gap junction channel. Efficacies and potencies of uncoupling agents. *Methods Mol Biol* 154: 447-76.
- Saez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MV (2005) Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1711: 215-224.
- Saito M, Iwawaki T, Taya C, Yonekawa H, Noda M, Inui Y, Mekada E, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K (2001) Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 19: 746-750.
- Scherer SS, Deschenes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL (1995) Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci* 15: 8281-8294.
- Schoppa NE, Westbrook GL (2001) Glomerulus-specific synchronization of mitral cells in the olfactory bulb. *Neuron* 31: 639-651.
- Schubert T, Degen J, Willecke K, Hormuzdi SG, Monyer H, Weiler R (2005) Connexin36 mediates gap junctional coupling of alpha-ganglion cells in mouse retina. *J Comp Neurol* 485: 191-201.
- Schwenk F, Kuhn R, Angrand PO, Rajewsky K, Stewart AF (1998) Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 26: 1427-1432.
- Seki A, Coombs W, Taffet SM, Delmar M (2004 a) Loss of electrical communication, but not plaque formation, after mutations in the cytoplasmic loop of connexin43. *Heart Rhythm* 1: 227-233.

- Seki A, Duffy HS, Coombs W, Spray DC, Taffet SM, Delmar M (2004 b) Modifications in the biophysical properties of connexin43 channels by a peptide of the cytoplasmic loop region. *Circ Res* 20;95: e22-e28.
- Serre-Beinier V, Le Gurun S, Belluardo N, Trovato-Salinaro A, Charollais A, Haefliger JA, Condorelli DF, Meda P (2000) Cx36 preferentially connects beta-cells within pancreatic islets. *Diabetes* 49: 727-734.
- Shelley J, Dedek K, Schubert T, Feigenspan A, Schultz K, Hombach S, Willecke K, Weiler R (2006) Horizontal cell receptive fields are reduced in connexin57-deficient mice. *Eur J Neurosci* 23: 3176-3186.
- Simeone A, Gulisano M, Acampora D, Stornaiuolo A, Rambaldi M, Boncinelli E (1992) Two vertebrate homeobox genes related to the *Drosophila* empty spiracles gene are expressed in the embryonic cerebral cortex. *EMBO J* 11: 2541-2550.
- Singh D, Solan JL, Taffet SM, Javier R, Lampe PD (2005) Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. *J Biol Chem* 280: 30416-30421.
- Sohl G, Degen J, Teubner B, 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, Guldenagel M, Beck H, Teubner B, Traub O, Gutierrez R, Heinemann U, Willecke K (2000) Expression of connexin genes in hippocampus of kainate-treated and kindled rats under conditions of experimental epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res* 83: 44-51.
- Sohl G, Maxeiner S, Willecke K (2005) Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* 6: 191-200.
- Sohl G, Willecke K (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* 10: 173-180.
- Sohl G, Willecke K (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62: 228-232.
- Soriano P (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21: 70-71.
- Spray DC, White RL, Mazet F, Bennett MV (1985) Regulation of gap junctional conductance. *Am J Physiol* 248: H753-H764.
- Srinivas M, Rozental R, Kojima T, Dermietzel R, Mehler M, Condorelli DF, Kessler JA, Spray DC (1999) Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction protein connexin36. *J Neurosci* 19: 9848-9855.
- Stout C, Goodenough DA, Paul DL (2004) Connexins: functions without junctions. *Curr Opin Cell Biol* 16: 507-512.
- Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC (2002) Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* 277: 10482-10488.
- Strauss O (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85: 845-881.
- Suzuki H, Pinto LH (1986) Response properties of horizontal cells in the isolated retina of wild-type and pearl mutant mice. *J Neurosci* 6: 1122-1128.
- Taniguchi M, Sanbo M, Watanabe S, Naruse I, Mishina M, Yagi T (1998) Efficient production of Cre-mediated site-directed recombinants through the utilization of the puromycin resistance gene, pac: a transient gene-integration marker for ES cells. *Nucleic Acids Res* 26: 679-680.

- Teubner B, Degen J, Sohl G, Guldenagel M, Bukauskas FF, Trexler EB, Verselis VK, De Zeeuw CI, Lee CG, Kozak CA, Petrasch-Parwez E, Dermietzel R, Willecke K (2000) Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein. *J Membr Biol* 176: 249-262.
- Theis M, Magin TM, Plum A, Willecke K (2000) General or cell type-specific deletion and replacement of connexin-coding DNA in the mouse. *Methods* 20: 205-218.
- Theis M, Mas C, Doring B, Kruger O, Herrera P, Meda P, Willecke K (2001) General and conditional replacement of connexin43-coding DNA by a lacZ reporter gene for cell-autonomous analysis of expression. *Cell Commun Adhes* 8: 383-386.
- Theis M, Sohl G, Eiberger J, Willecke K (2005) Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci* 28: 188-195.
- Theis M, Sohl G, Speidel D, Kuhn R, Willecke K (2003) Connexin43 is not expressed in principal cells of mouse cortex and hippocampus. *Eur J Neurosci* 18: 267-274.
- Thimm J, Mechler A, Lin H, Rhee S, Lal R (2005) Calcium-dependent open/closed conformations and interfacial energy maps of reconstituted hemichannels. *J Biol Chem* 280: 10646-10654.
- Thorburn J, Frankel AE, Thorburn A (2003) Apoptosis by leukemia cell-targeted diphtheria toxin occurs via receptor-independent activation of Fas-associated death domain protein. *Clin Cancer Res* 9: 861-865.
- Tran VN, Clair C, Bruzzone R, Mesnil M, Sansonetti P, Combettes L (2003) Connexin-dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of *Shigella* in epithelial cells. *Nat Cell Biol* 5: 720-726.
- Traub O, Janssen-Timmen U, Druge PM, Dermietzel R, Willecke K (1982) Immunological properties of gap junction protein from mouse liver. *J Cell Biochem* 19: 27-44.
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schutz G (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23: 99-103.
- Turnbull MW, Volkoff AN, Webb BA, Phelan P (2005) Functional gap junction genes are encoded by insect viruses. *Curr Biol* 15: R491-R492.
- Uhlenberg B, Schuelke M, Ruschendorf F, Ruf N, Kaindl AM, Henneke M, Thiele H, Stoltenburg-Didinger G, Aksu F, Topaloglu H, Nurnberg P, Hubner C, Weschke B, Gartner J (2004) Mutations in the gene encoding gap junction protein alpha 12 (connexin 46.6) cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Am J Hum Genet* 75: 251-260.
- Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, Yeager M (1999) Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 19;283: 1176-1180.
- Unwin PN, Ennis PD (1983) Calcium-mediated changes in gap junction structure: evidence from the low angle X-ray pattern. *J Cell Biol* 97: 1459-1466.
- Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7963-7968.
- Urschel S, Hoher T, Schubert T, Alev C, Sohl G, Worsdorfer P, Asahara T, Dermietzel R, Weiler R, Willecke K (2006) Protein Kinase A-mediated Phosphorylation of Connexin36 in Mouse Retina Results in Decreased Gap Junctional Communication between All Amacrine Cells. *J Biol Chem* 281: 33163-33171.

- Valiunas V, Polosina YY, Miller H, Potapova IA, Valiuniene L, Doronin S, Mathias RT, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS, Brink PR (2005) Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J Physiol* 568: 459-468.
- Van Der Giessen RS, Koekkoek K, Khosrovani S van Dorp S, Dortland B, Wellershaus K, Degen J, Marshall SP, Deuchars J, Fuchs EC, Monyer H, Willecke K, Lang EJ, De Jeu MTG, De Zeeuw CI Role of Olivary Coupling in Learning-Dependent Timing. (eingereicht).
- Van Der Giessen RS, Maxeiner S, French PJ, Willecke K, De Zeeuw CI (2006) Spatiotemporal distribution of Connexin45 in the olivocerebellar system. *J Comp Neurol* 495: 173-184.
- Vaney DI, Nelson JC, Pow DV (1998) Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina. *J Neurosci* 18: 10594-10602.
- Vintersten K, Testa G, Stewart AF (2004) Microinjection of BAC DNA into the pronuclei of fertilized mouse oocytes. *Methods Mol Biol* 256:141-58.
- Vooijs M, Jonkers J, Berns A (2001) A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Rep* 2: 292-297.
- Wallraff A, Kohling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhauser C (2006) The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci* 26: 5438-5447.
- Weber P, Metzger D, Chambon P (2001) Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in the mouse brain. *Eur J Neurosci* 14: 1777-1783.
- Weber P, Schuler M, Gerard C, Mark M, Metzger D, Chambon P (2003) Temporally controlled site-specific mutagenesis in the germ cell lineage of the mouse testis. *Biol Reprod* 68: 553-559.
- Weiler R, Pottek M, He S, Vaney DI (2000) Modulation of coupling between retinal horizontal cells by retinoic acid and endogenous dopamine. *Brain Res Brain Res Rev* 32: 121-129.
- Weiler R, Schultz K, Janssen-Bienhold U (1996) Ca²⁺-dependency of spinule plasticity at dendrites of retinal horizontal cells and its possible implication for the functional role of spinules. *Vision Res* 36: 3891-3900.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383: 725-737.
- Wrobel CJ, Wright DC, Dedrick RL, Youle RJ (1990) Diphtheria toxin effects on brain-tumor xenografts. Implications for protein-based brain-tumor chemotherapy. *J Neurosurg* 72: 946-950.
- Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T, Okada Y (1978) One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* 15: 245-250.
- Yeager M, Unger VM, Falk MM (1998) Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol* 8: 517-524.
- Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, Soriano P (1997) Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3789-3794.
- Zampighi GA, Eskandari S, Kreman M (2000) Epithelial organization of the mammalian lens. *Exp Eye Res* 71: 415-435.
- Zhang C, Restrepo D (2003) Heterogeneous expression of connexin 36 in the olfactory epithelium and glomerular layer of the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 459: 426-439.

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

Zhao HB, Kikuchi T, Ngezahayo A, White TW (2006) Gap junctions and cochlear homeostasis. *J Membr Biol* 209: 177-186.

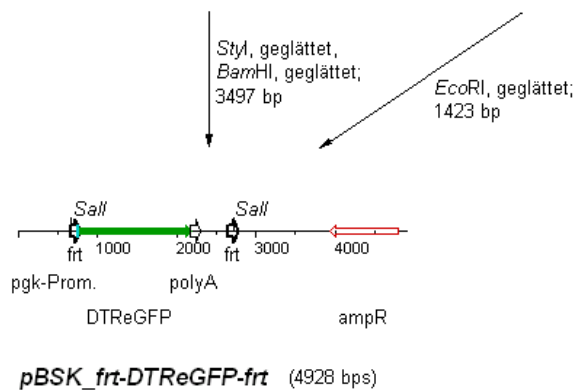
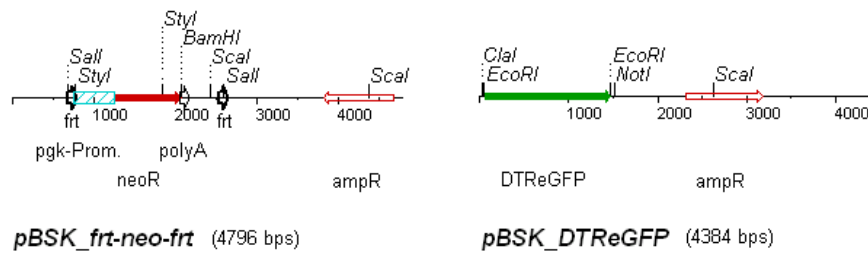
Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A (1994) Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12: 11-24.

Zoidl G, Bruzzone R, Weickert S, Kremer M, Zoidl C, Mitropoulou G, Srinivas M, Spray DC, Dermietzel R (2004) Molecular cloning and functional expression of zfCx52.6: a novel connexin with hemichannel-forming properties expressed in horizontal cells of the zebrafish retina. *J Biol Chem* 279: 2913-2921.

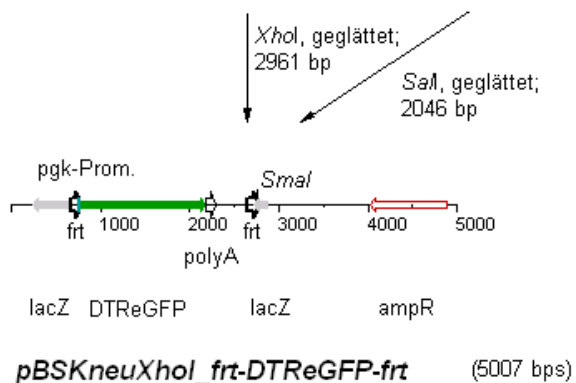
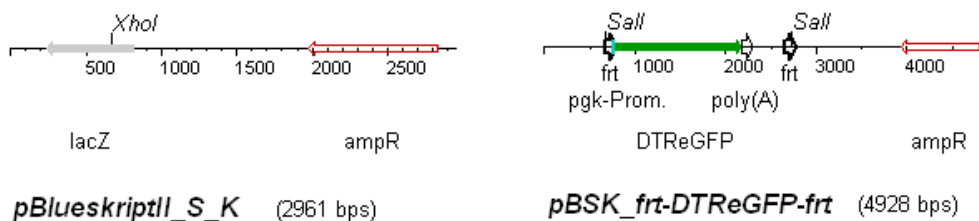
Zufall F (2005) Connexins and olfactory synchronicity: toward the olfactory code. *Neuron* 46: 693-694.

8 ANHANG

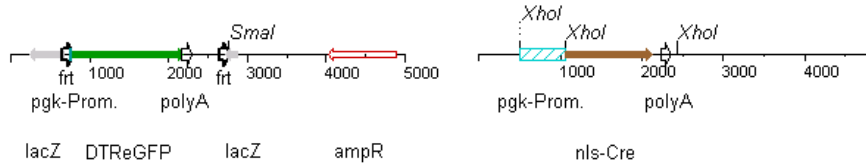
A1 Klonierung des Austauschvektors *pKW-DTRfrtCre*



Schritt 1: Einfügen der DTRReGFP-Kassette zwischen die *frt*-Erkennungssequenzen des Vektors *pBSK_frt-neo-frt* nach Entfernung der *neoR*-Kassette.



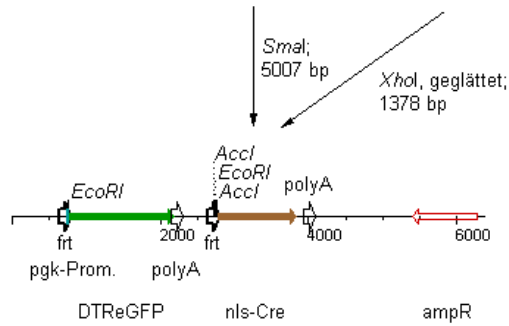
Schritt 2: Umklonieren des *frt-DTRReGFP-frt*-Konstrukts in den Zielvektor *pBSK*.



pBSKneuXhoI_frt-DTReGFP-frt

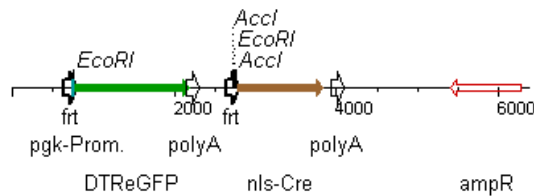
(5007 bps)

pPGK-Cre bpA (4850 bps)

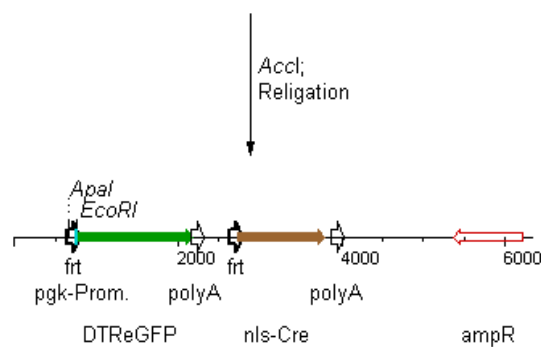


pBSKneuXhoI_frt-DTReGFP-frt-nls-Cre-polyA SmaI (6389 bps)

Schritt 3: Einbringen der Cre-Rekombinase-Kassette in den Vektor *pBSKneuXhoI_frt-DTReGFP-frt*.

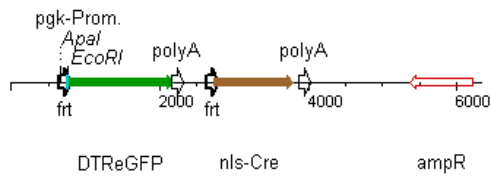


pBSKneuXhoI_frt-DTReGFP-frt-nls-Cre-polyA SmaI (6389 bps)



pBSKneuXhoI_frt-DTReGFP-frt-nls-Cre-polyA SmaI Accl del (6342 bps)

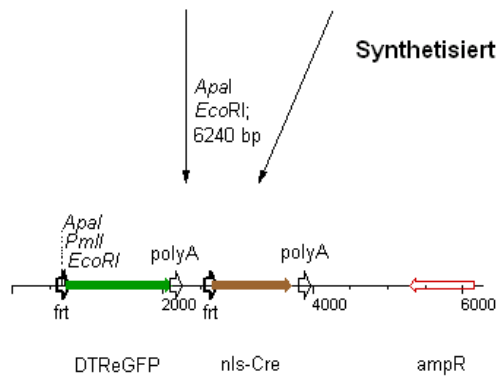
Schritt 4: Accl-Spaltung und Religation des Vektors *pBSKneuXhoI_frt-DTReGFP-nls-Cre-polyA SmaI*.



pBSKneuXhoI_frt-DTReGFP-frt-nls-Cre-polyA Smal Accl del (6342 bps)

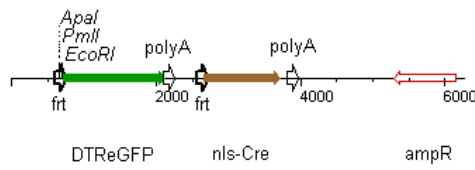


Synthetisiertes Zwischenstück (50 bps)

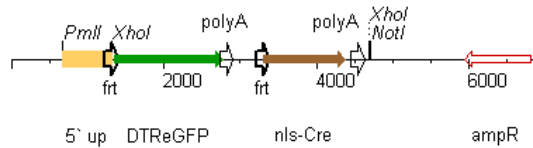
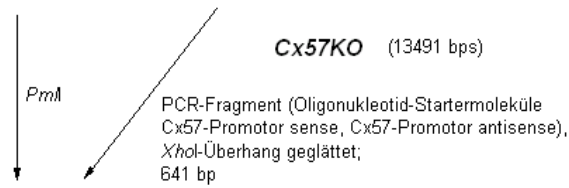
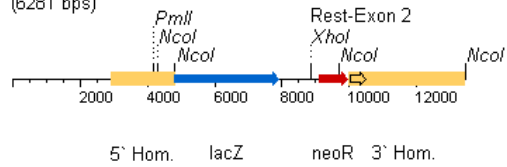


pBSK_DTRfrtCre del pgk-Prom. (6281 bps)

Schritt 5: Ersetzen des *Apal-EcoRI*-Fragmentes, welches 20 bp des PGK-Promotors enthält, durch ein optimiertes, künstlich hergestelltes DNS-Zwischenstück.

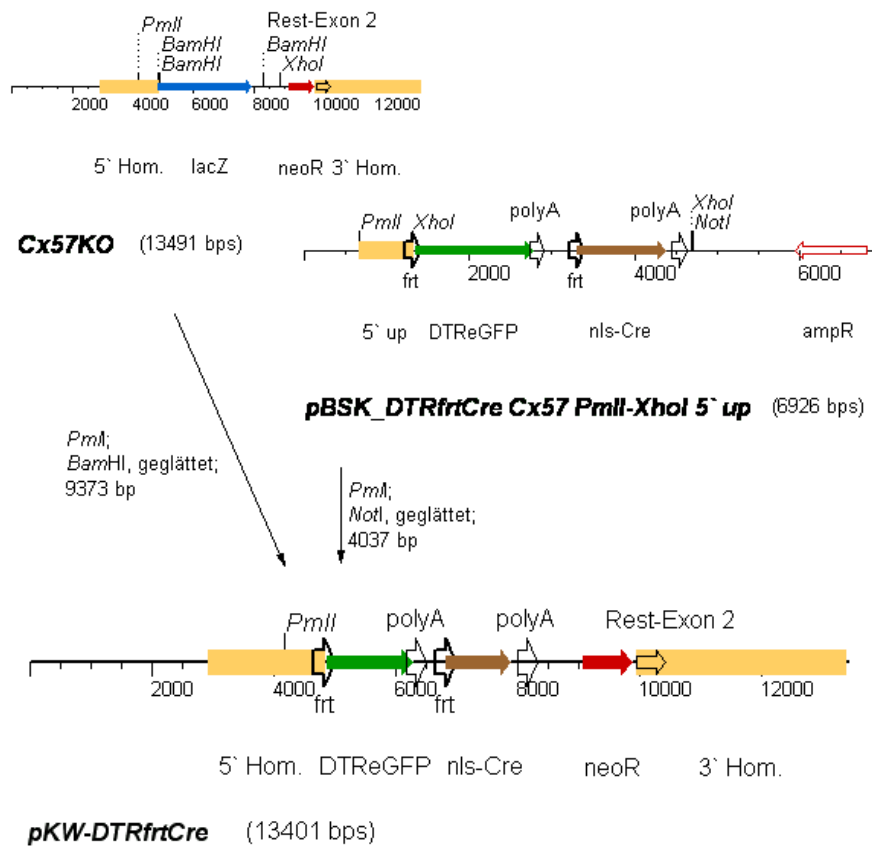


pBSK_DTRfrtCre del pgk-Prom. (6281 bps)



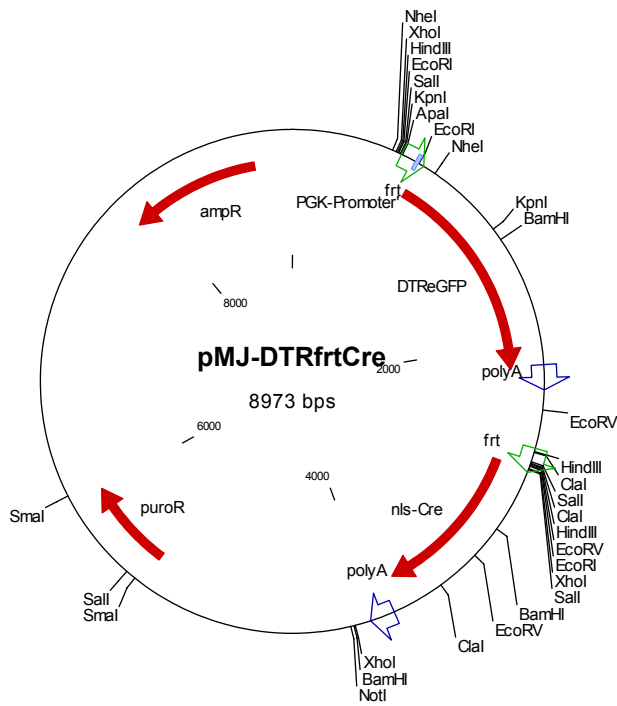
pBSK_DTRfrtCre Cx57 PmlI-XhoI 5' up (6926 bps)

Schritt 6: Einbringen eines PCR-Fragmentes der 5' homologen Region von *Cx57* in den Vektor *pBSK_DTRfrtCre del pgk-Prom.*

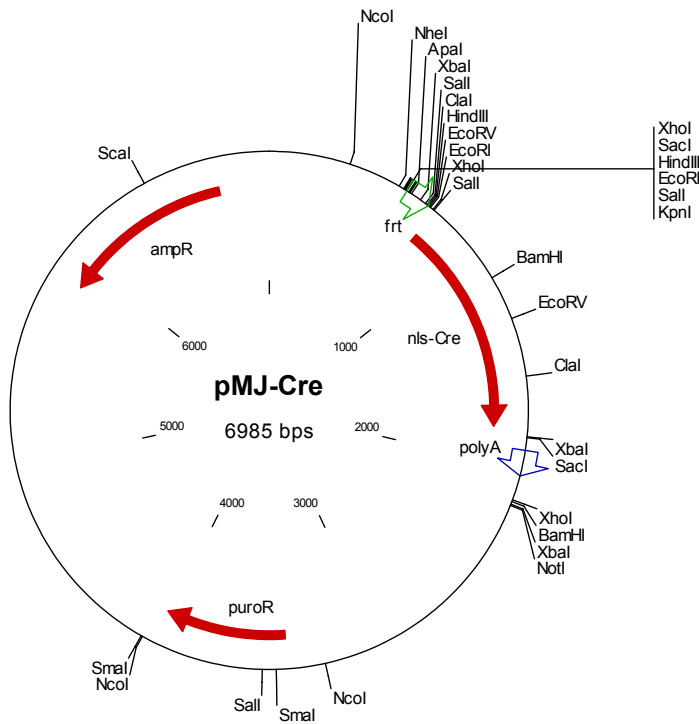


Schritt 7: Einbringen des DTRfrtCre-Konstrukts anstelle des lacZ-Gens in den Austauschvektor Cx57KO.

A2 Die Testvektoren pMJ-DTRfrtCre und pMJ-Cre



Der Testvektor pMJ-DTRfrtCre



Der Testvektor pMJ-Cre

A4 Eigene Veröffentlichungen

Odermatt B, **Wellershaus K**, Wallraff A, Seifert G, Degen J, Euwens C, Fuss B, Bussow H, Schilling K, Steinhauser C, 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: 4549-59.

van der Giessen RS, Koekkoek K, Khosrovani S, van Dorp S, Dortland B, **Wellershaus K**, Degen J, Marshall SP, Deuchars J, Fuchs EC, Monyer H, Willecke K, Lang EJ, De Jeu MTG, and De Zeeuw CI. (2006). Role of Olivary Coupling in Learning-Dependent Timing. (eingereicht).

Wellershaus K, Degen J, Deuchars J, Janssen-Bienhold U, Willecke K. (2007). A conditional connexin36 deficient mouse with cyan fluorescent reporter protein (CFP) can be used to study cell type specific functions of connexin36. (in Vorbereitung).

Dedek K, Pandarinath C, Alam NM, **Wellershaus K**, Willecke K, Prusky GT, Weiler R, Nirenberg S (2007). The coupling of horizontal cells does not contribute to the spatial tuning of mouse retinal ganglion cells. (in Vorbereitung).

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.

Kerstin Wellershaus

Bonn, im November 2006