

**Erzeugung und Charakterisierung einer Mausmutante, in der  
Horizontalzellen induzierbar abgetötet werden können**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Stephan Sonntag

aus

Bonn

Bonn, im September 2008

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Willecke
2. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann

Tag der Promotion: 15. Dezember 2008

Erscheinungsjahr 2009

## Danksagung:

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

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Klaus Willecke danke ich für die Möglichkeit, in meiner Doktorarbeit unter so guten Bedingungen an einem spannenden Thema arbeiten zu können und dabei in Kontakt mit verschiedenen Arbeitsgruppen aus unterschiedlichen Bereichen kommen zu können.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann danke ich für die Übernahme des Koreferats sowie Herrn Prof. Dr. Nobert Koch und Frau PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert für ihre Teilnahme an der Prüfungskommission als fachnaher Gutachter und fachangrenzende Gutachterin.

Mein großer Dank gilt den Mitgliedern hiesiger und auswärtiger Arbeitsgruppen, mit denen ich im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich zusammenarbeiten durfte. Besonders Prof. Dr. Reto Weiler, PD Dr. Ulrike Janssen-Bienhold und Dr. Karen Dedek aus Oldenburg für die gemeinsame Arbeit an Horizontalzellen-ablatierten Mäusen, Prof. Dr. Nobert Koch und Sebastian Temme hier in Bonn für die gemeinsame Arbeit am Thymus, der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Feliksas Bukauskas in New York für die teils schwierige und dennoch erfolgreiche Arbeit an Cx57 und Prof. Dr. Rolf Dermietzel, PD Dr. Georg Zoidl und Dr. Chantaz Alev aus Bochum sowie Thorsten Höher aus Bonn für die gemeinsame Arbeit an der Interaktion von Cx36 und CaMKII. Außerdem danke ich Prof. Dr. Elke Winterhager aus Essen, Dr. Goran Söhl, Dr. Radoslaw Dobrowolski und Dr. Martin Theiss aus Bonn für die erfolgreiche Zusammenarbeit am „kleinsten“ aller Connexine.

Dr. Stephanie Urschel danke ich für die herzliche Betreuung am Anfang meiner Arbeit als „Neuling“ im Institut. Ich möchte Dr. Kerstin Wellershaus danken, von der zusammen mit Dr. Sonja Hombach die Idee und Vorarbeiten zu der in dieser Arbeit erzeugten Mauslinie stammen. Außerdem danke ich Dr. Kerstin Wellershaus, Dr. Joachim Degen und Dr. Stephanie Urschel für das kritische Lesen dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön gilt auch Petra Kussmann und Christine Siegmund für ihre tatkräftige Unterstützung als technische Assistentinnen bei der Erzeugung und der Analyse der Mauslinie. Michael Lange möchte ich für die Geduld mit meinen kleinen und großen Computerproblemen danken.

Bei allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Willecke aber auch von Prof. Scheidtmann und Prof. Koch, besonders bei den Mitgliedern des „Doc-Labors“, „826“ und allen Doppelkopfspielern im Institut möchte ich mich für die große Hilfsbereitschaft und das phantastische Arbeitsklima bedanken.

Außerdem möchte ich meiner Familie und meinen Freunden, besonders Christian Drigalla, für die Unterstützung und den Rückhalt während des Studiums und der Doktorarbeit danken.

## Inhalt

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Gap Junction Kanäle.....	1
1.1.1	Aufbau von Gap Junctions .....	2
1.1.2	Funktion und Regulation von Gap Junctions .....	3
1.2	Erzeugung und Bedeutung transgener Mäuse.....	5
1.3	Das Auge .....	6
1.4	Die Linse.....	7
1.4.1	Bedeutung von Gap Junctions in der Linse .....	8
1.5	Die Retina .....	9
1.5.1	Aufbau und Funktion der Photorezeptoren.....	10
1.5.2	Signalweitergabe und Verarbeitung.....	12
1.5.3	Gap Junctions in der Retina .....	13
1.5.4	Horizontalzellen.....	13
1.6	Das DT/DT-Rezeptor System .....	16
1.7	Ziel der Arbeit .....	18
<b>2.</b>	<b>Material</b> .....	19
2.1	Allgemeine Lösungen und Puffer .....	19
2.2	Allgemeine Labor-, Zellkulturmaterialien und Geräte .....	19
2.3	Plasmide.....	20
2.4	Oligonukleotidstartermoleküle.....	20
2.5	Größenstandards .....	22
2.6	Antikörper .....	22
2.7	Bakterienstämme .....	23
2.8	Zelllinien.....	23
2.9	Mauslinien.....	23
<b>3.</b>	<b>Methoden</b> .....	24
3.1	Erzeugung der Cx57-DTRfrtCre Mauslinie.....	24
3.2	Analyse der Genotypen von Cx57-DTRfrtCre ES-Zellen und Mäusen .....	24
3.3	Behandlung von Cx57-DTRfrtCre Mäusen mit Diphtherie Toxin .....	26
3.4	Präparation und Analyse von Geweben.....	26
3.5	Analyse der Expression von DTR und Cre-Rekombinase in der Retina.....	27
3.6	Herstellung und Analyse von stabilen HeLa Transfektanten.....	28
3.6.1	Neuklonierung von Connexin57 Expressionsvektoren .....	28
3.6.2	Klonierung von Cx23-Expressionsvektoren.....	29
3.6.3	Analyse stabiler HeLa-Transfektanten.....	30
3.7	Klonierung verschiedener GST-Cx36 Fusionsproteine .....	30

---

3.8	<i>in vitro</i> Bindeexperimente .....	33
3.9	<i>in vitro</i> Phosphorylierung .....	34
3.10	Analyse der Cx23 Expression .....	34
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
4.1	Erzeugung und Analyse einer Connexin57-DTRfrtCre Mauslinie.....	35
4.1.1	Herstellung einer murinen embryonalen Cx57-DTRfrtCre Stammzelllinie ..	36
4.1.1.1	Etablierung einer Test-PCR zum Nachweis homolog rekombinierter Cx57-DTRfrtCre embryonaler Stammzellen.....	36
4.1.1.2	Elektroporation und Analyse der entstandenen ES-Zellklone.....	37
4.1.2	Erzeugung einer Cx57-DTRfrtCre Mauslinie .....	40
4.1.3	Analyse der Cx57-DTRfrtCre Mauslinie.....	41
4.1.3.1	Bestimmung der verschiedenen Genotypen mittels PCR Analyse .....	41
4.1.3.2	Nachweis verschiedener Genotypen mittels Southernblot-Hybridisierung..	42
4.1.3.3	Analysen zur Expression von DT-Rezeptor und Cre-Rekombinase in der Retina.....	43
4.1.4	Ablation von Horizontalzellen in Cx57-DTRfrtCre Mäusen mittels Injektion von Diphtherie Toxin .....	45
4.1.5	Effizienz der Ablation von Horizontalzellen bei unterschiedlichen Dosen von Diphtherietoxin .....	46
4.1.6	Morphologische Analysen der Retinae von Horizontalzell-ablatierten Mäusen .....	48
4.1.7	Effekte von DT auf andere Organe von Cx57-DTRfrtCre Mäusen.....	54
4.1.8	Funktion der Cre-Rekombinase in der Cx57Cre-Mauslinie.....	59
4.2	Analysen der Kanaleigenschaften von Connexin57 .....	61
4.2.1	Die Cx57-Sequenz .....	61
4.2.2	Herstellung stabil Cx57eGFP exprimierender HeLa-Zellen .....	62
4.2.3	Transfektion von Cx57 ohne eGFP-Markierung .....	64
4.2.4	Analyse des Farbstofftransfers durch Cx57eGFP Kanäle .....	64
4.2.5	Analyse der elektrophysiologischen Eigenschaften von Connexin57eGFP Kanälen.....	66
4.2.6	Analyse der Halbkanalaktivität von Connexin57.....	68
4.3	Analyse der Interaktion zwischen Connexin36 und Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin abhängiger Kinase II (CaMKII).....	69
4.3.1	Bindung der CaMKII an Connexin36 .....	70
4.3.2	Phosphorylierung von Connexin36 durch die CaMKII .....	71
4.4	Analysen zu Vorkommen und Funktion von Maus Connexin23 .....	74
4.4.1	Das Connexin23 Gen .....	74

---

4.4.2	Vorkommen von Connexin23 in der Maus.....	77
4.4.3	Herstellung stabil Connexin23 exprimierender HeLa-Zelllinien .....	77
4.4.4	Eigenschaften von Connexin23 Voll- und Halbkanälen .....	79
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>82</b>
5.1	Die Cx57-DTRfrtCre Mauslinie.....	82
5.1.1	Erzeugung und Primäranalyse .....	82
5.1.2	Ablation der Horizontalzellen der Retina .....	83
5.1.3	Veränderung der Retina nach Ablation der Horizontalzellen .....	85
5.1.4	Effekte von DT-Behandlung auf den Thymus.....	87
5.1.5	Bewertung der Cx57-DTRfrtCre Mauslinie .....	91
5.1.6	Die Cx57-Cre Mauslinie .....	92
5.2	Kanaleigenschaften von Cx57 in Hela-Zellen .....	93
5.2.1	Die Cx57eGFP HeLa Zelllinie.....	93
5.2.2	Kanaleigenschaften von Cx57 .....	94
5.2.3	Besonderheiten von Cx57 .....	96
5.3	Cx36-Interaktion mit CaMKII.....	97
5.3.1	Bindung von Cx36 an CaMKII .....	98
5.3.2	Phosphorylierung von Cx36 durch die CaMKII .....	99
5.4	Analyse von Vorkommen und Kanaleigenschaften von mCx23 .....	101
5.4.1	Sequenzanalyse von Cx23.....	101
5.4.2	Konservierung von Cx23 in Vertebraten.....	102
5.4.3	Expression von Cx23 in der Maus.....	103
5.4.4	Funktionsanalysen von Cx23 Kanälen .....	104
5.5	Ausblick .....	105
5.5.1	Die Cx57-DTRfrtCre Mauslinie .....	105
5.5.1.1	Die Retina .....	105
5.5.1.2	Andere Organe.....	106
5.5.2	Die Cx57-Cre Mauslinie .....	107
5.5.3	Connexin57 .....	108
5.5.4	CaMKII .....	109
5.5.5	Connexin23.....	109
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>111</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>113</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>126</b>

---

## Abkürzungen

---

### Abkürzungen:

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AmpR	Ampizilin-Resistenz Kasette
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin abhängige Kinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	DNA-Kopie einer RNA (copy DNA)
CFP	zyan fluoreszierendes Protein
CL	zytoplasmatische Schleife
cm	Zentimeter
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CT	Carboxy-Terminus
cTEC	Cortex Thymusepithelzelle
Cx	Connexin
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DSP	downstream primer
DT	Diphtheria Toxin
DTR	Diphtheria Toxin-Rezeptor
DTReGFP	Fusionsprotein aus dem Diphtherie Toxin Rezeptor und dem verstärkt grün fluoreszierenden Protein
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen (der Maus)
et al.	et altera
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
eYFP	verstärkt gelb fluoreszierendes Protein

---

## Abkürzungen

---

G	Guanin
g	Gramm
G418	Gentamycin418
GCL	Ganglienzellschicht (der Retina)
GST	Glutathion-S-Transferase
HR	homologe Region
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HUSAR	Heidelberg Unix Sequence Analysis Resource
INL	innere nukleäre Schicht (der Retina)
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IPL	innere plexiforme Schicht (der Retina)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LSM	Laser-Scan-Microscope
M	molar
MCS	mehrfach-Klonierungsstelle
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	boten-RNA
MT	Mitochondrien
mTEC	Medulläre Thymusepithelzelle
MudPIT	Multidimensionale Proteinidentifizierungs-Technologie
mV	Millivolt
NCBI	National Center for Biotechnology Information
neoR	Neomycin-Resistenzkassette
Neurobiotin	N-(2-aminoethyl)-biotinamid
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
ONL	äußere nukleäre Schicht (der Retina)
OPL	äußere plexiforme Schicht (der Retina)
OS	Außensegmente (der Photorezeptoren)
pA	Pikoampere
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C

---



## Abkürzungen

---

PolyA-Signal	Polyadenylierungssignal
pS	Pikosiemens
Px	Pannexin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
s oder sec	Sekunden
sog.	sogenannt
SR	Bändersynapse (synaptic ribbon)
SV40	Simianvirus 40
T	Thymin
Tab.	Tabelle
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-b-D-galaktosid
z.B.	zum Beispiel

## 1. Einleitung

### 1.1 Gap Junction Kanäle

Der direkte Austausch von Molekülen zwischen Zellen eines Zellverbandes ist eine wichtige Voraussetzung zur Entwicklung mehrzelliger Organismen. So haben sich in allen Abteilungen mehrzelliger Organismen unabhängig voneinander Strukturen entwickelt, die einen solchen Austausch ermöglichen. In Pflanzen sind dies verlängerte Brücken des Zytoplasmas, die die Zellwand durchspannen, die Plasmodesmata (Heinlein, 2002; Zambryski und Crawford, 2000). In Pilzen existiert eine vergleichbare Struktur, die Septal-Poren (Potapova et al., 1988; Shepherd et al., 1993). In mehrzelligen tierischen Organismen werden direkte Zellverbindungen dagegen aus Proteinkanälen gebildet (Gilula et al., 1972; Kumar und Gilula, 1986). Entsprechende Strukturen wurden bisher in fast allen untersuchten Spezies entdeckt (Panchin, 2005). Deren Aufbau und physiologische Eigenschaften ähneln sich dabei. So handelt es sich um Ansammlungen von Zell-Zell Kanälen die zu einer Annäherung der Plasmamembran von normalerweise 20-30 nm auf ca. 3-4 nm führen (Revel und Karnovsky, 1967; Payton et al., 1969). Dieser Spalt (engl. gap) gibt der Struktur ihren Namen: Gap Junctions (siehe Abb. 1.1 A). In Vertebraten und Invertebraten wurden zwei unabhängige Protein-Familien identifiziert, die für die Bildung von Gap Junctions verantwortlich sind. Die Proteine der Connexin-Familie bilden Gap Junctions ausschließlich in Vertebraten. In Invertebraten ist dies die Familie der *Innexine*, abgeleitet von **Invertebraten Connexinen** (Phelan et al., 1998). Eine kleine dazu verwandte Gruppe von Proteinen ist sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten zu finden, weshalb sie nach dem griechischen Wort *pan* für „ganz“ oder „alles“ als *Pannexine* bezeichnet werden (Bruzzone et al., 2003). Sie wird mit den Innexinen zu einer Familie zusammengefasst (Yen und Saier, 2007; Baranova et al., 2004).

Zur Familie der Connexine gehören im Menschen 21 Gene, in der Maus 20 (Söhl und Willecke, 2004). Diese werden laut gängiger Konvention nach dem Molekulargewicht des Proteins benannt, für das sie kodieren. So kodiert das Gen Gja1 der Maus für ein Protein von 43 kDa, welches entsprechend als Connexin43 oder kurz Cx43 bezeichnet wird (Beyer et al., 1987). Die Connexin Gene wurden mit der Abkürzung Gj für Gap Junction Proteine versehen und nach ihrer Sequenzverwandtschaft in fünf Gruppen eingeteilt, Gja - Gje für Mausgene und GJA - GJE für menschliche Gene, die analog zur Abfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert sind (Söhl und Willecke, 2003; eine aktualisierte Fassung findet sich unter <http://www.informatics.jax.org/> für Maus-Connexine bzw. <http://www.genenames.org/genefamily/gj.php> für menschliche Connexine). So wurde Cx43 als erstes Protein der alpha-Gruppe der Connexine beschrieben; das zugehörige Gen heißt entsprechend Gja1 bzw. GJA1 (Dupont et al., 1988; Hsieh et al., 1991).

Die verschiedenen Mitglieder der Connexin-Familie unterscheiden sich neben ihrer Größe vor allem in ihrer entwicklungs- und gewebespezifischen Ausprägung sowie in ihren physiologischen Eigenschaften (Willecke et al. 2002, Goldberg et al., 2004). Die

Diversität der Gap Junctions wird, wie im Folgenden zu sehen, durch Kombination verschiedener Isoformen noch deutlich erhöht (Willecke et al. 2002).

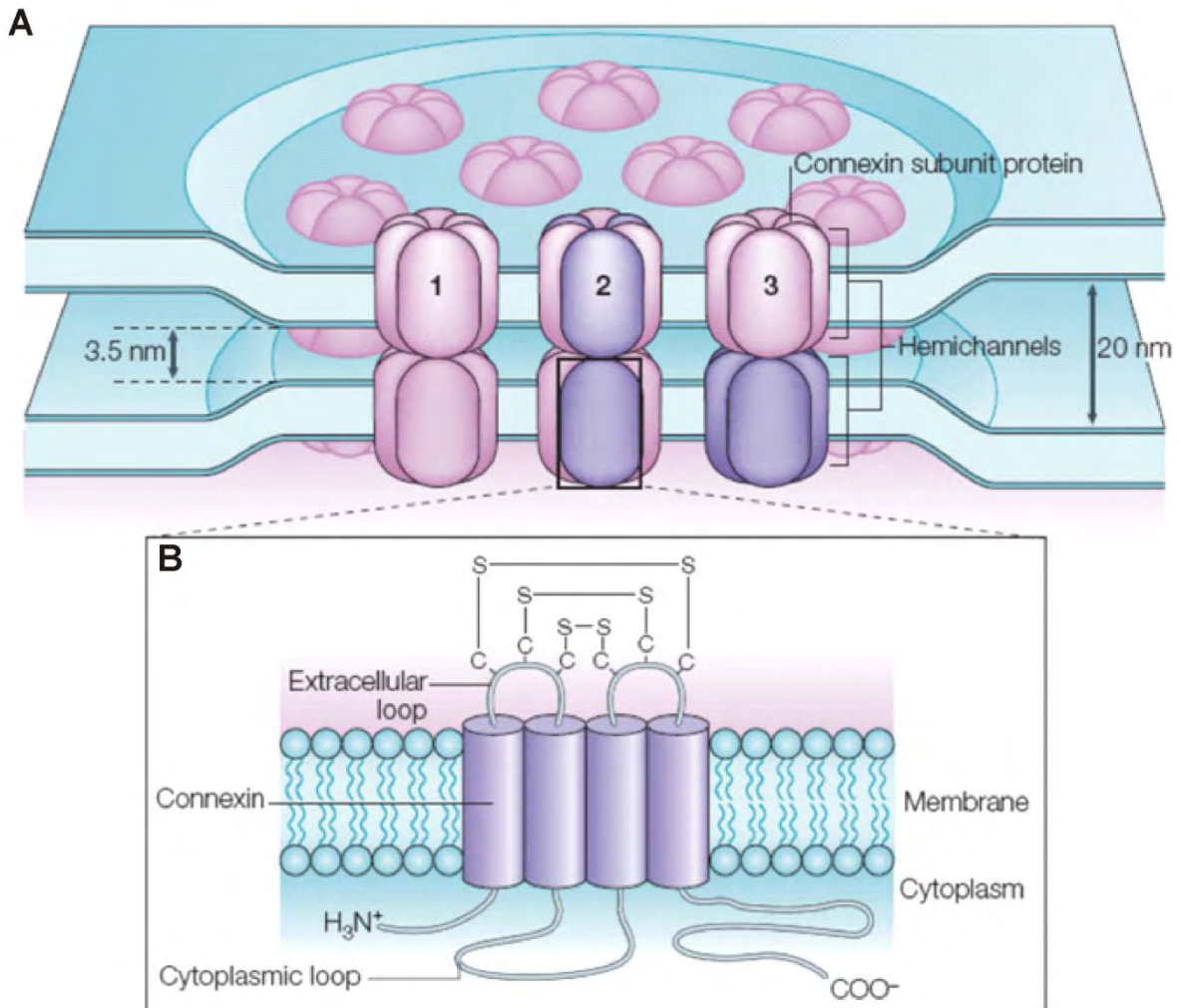
### 1.1.1 Aufbau von Gap Junctions

Gap Junctions konnten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen mittels Gefrierbruchtechnik als Ansammlung von vielen tausend Einzelkanälen identifiziert werden, sog. Gap Junction Plaques (Revel et al., 1971). Ein einzelner Gap Junction Kanal besteht aus zwei Halbkanälen oder Connexonen, die ihrerseits aus jeweils sechs Connexin-Untereinheiten aufgebaut sind (Kumar und Gilula, 1996). Bei Connexonen, aufgebaut aus einer einzigen Connexin-Isoform, spricht man von homomeren Connexonen, bei solchen aus verschiedenen Isoformen von heteromeren Connexonen. Zusätzlich können sich die beiden Halbkanäle in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. Man spricht dann von heterotypischen Kanälen im Gegensatz zu Kanälen aus zwei identischen Connexonen, die als homotypisch bezeichnet werden (Kumar und Gilula, 1996).

Alle Connexin-Proteine zeigen eine identische Topologie mit vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Schleifen zwischen erster und zweiter bzw. dritter und vierter Transmembrandomäne und drei zytoplasmatischen Domänen, dem N-Terminus, der intrazellulären Schleife zwischen zweiter und dritter Transmembrandomäne sowie dem C-Terminus (Milks et al., 1988; Fleishman et al., 2004) (siehe Abbildung 1.1 B). Von diesen Domänen zeigen der N-Terminus, die Transmembrandomänen und die extrazellulären Schleifen eine besonders hohe Homologie unter den Connexinen (Cruciani und Mikalsen, 2007). Letztere weisen eine charakteristische Verteilung von jeweils drei Cysteinresten auf, welche bis auf wenige Ausnahmen dem Muster  $CX_6CX_3C$  in der ersten extrazellulären Schleife und  $CX_4CX_5C$  in der zweiten extrazellulären Schleife folgen (C steht für Cystein, X für beliebige andere Aminosäuren). Die einzigen Ausnahmen bilden Cx31, mit  $CX_5CX_5C$  in der zweiten extrazellulären Schleife sowie Cx23 mit nur jeweils den zwei äußeren extrazellulären Cysteinresten (Söhl und Willecke, 2004). Zwischen den Cysteinresten der extrazellulären Schleifen ausgebildete intramolekulare Disulfidbrücken führen zu einer komplexen Struktur von  $\beta$ -Faltblättern, die schließlich das sog. Docken von zwei Halbkanälen zu einem beide Zellmembranen durchspannenden Kanal ermöglicht (Foote et al., 1998).

Pannexine und Innexine zeigen keine Sequenzhomologie zu Connexinen (Phelan et al., 1998; Bauer et al., 2005). Ihre Struktur ist jedoch ähnlich. Auch hierbei handelt es sich um Transmembranproteine mit vier Transmembrandomänen, die eine identische Orientierung der extrazellulären und zytoplasmatischen Domänen aufweisen (Panchin et al. 2005; Bauer et al., 2005). Ihre extrazellulären Schleifen, die teilweise wesentlich länger als die der Connexine sind (Panchin et al., 2005; Bauer et al., 2005), enthalten jedoch jeweils nur zwei Cysteinreste. Dies sind ebenso wie bei Cx23 die jeweils äußeren. Es wird angenommen, dass sich Connexine nach der Entstehung von Innexin-Gap Junctions *de novo* als zusätzliche Proteine entwickelt haben. Aufgrund der

gemeinsamen Funktion und einer konvergenten Entwicklung sind beide Proteinfamilien trotz unterschiedlicher Aminosäuresequenzen strukturell gleich (Alexopoulos et al., 2004; Hua et al., 2003).



**Abbildung 1.1: Struktur und Aufbau von Gap Junctions.** (A) Ein Gap Junction Kanal wird durch Docken zweier Halbkanäle aus beiden beteiligten Zellen gebildet, welche wiederum aus sechs Connexin-Untereinheiten aufgebaut sind. Die Plasmamembranen nähern sich dadurch von 20 nm auf 3,5 nm an. Die beiden Halbkanäle umschließen eine zentrale wässrige Pore, die die Zytoplasmata beider Zellen miteinander verbindet. Besteht ein Kanal auf beiden Seiten nur aus einer Connexin-Isoform, ist er homomer/homotypisch (1). Besteht ein Halbkanal aus unterschiedlichen Isoformen, so ist er heteromer (2), und besteht der gesamte Kanal aus zwei unterschiedlich aufgebauten Halbkanälen, bezeichnet man dies als heterotypisch (3). (B) Connexine sind Transmembranproteine mit vier Transmembrandomänen. Die beiden extrazellulären Schleifen besitzen jeweils drei charakteristische Cystein-Reste, welche intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Verschiedene Connexin-Isoformen unterscheiden sich meist in Zusammensetzung und Länge von zytoplasmatischer Schleife und Carboxy-Terminus (Aus Söhl et al., 2005).

### 1.1.2 Funktion und Regulation von Gap Junctions

Ein Gap Junction Kanal ermöglicht die Diffusion von Molekülen bis zu einer molekularen Masse von 1,8 kDa zwischen zwei Zellen (Neijssen et al., 2005). Dies gewährleistet den Austausch von Ionen, Metaboliten und kleinen Signalmolekülen. Eine wichtige Rolle spielen dabei Signalmoleküle wie Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), zyklisches Adenosinmonophosphat

(cAMP), zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) sowie Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) (Goldberg et al., 2004; Goldberg et al., 1999). Kanäle aus unterschiedlichen Connexin-Isoformen zeigen jedoch eine spezifische selektive Durchlässigkeit für bestimmte Signalmoleküle. So wird beispielsweise cAMP über Cx43 Gap Junction Kanäle etwa 30mal besser weitergegeben als über Gap Junctions aufgebaut aus Cx36 (Bedner et al., 2005). Cx43-Kanäle sind außerdem etwa 300mal besser permeabel für ATP als Cx32-Kanäle (Goldberg et al., 2002). Zusätzlich wird durch die Kombination verschiedener Connexine in einem heteromeren Kanal die Durchlässigkeit für bestimmte Moleküle beeinflusst (Bevans et al., 1998). Auch für Peptide und kleine RNA Moleküle sind Gap Junctions teilweise permeabel (Neijssen et al., 2005; Valiunas et al., 2005).

Gap Junction Kanäle sind keineswegs einfache, unveränderliche Poren, sondern werden über verschiedene Mechanismen gesteuert. Zum einen kann der Öffnungszustand elektrisch, durch eine Spannungsdifferenz zwischen beiden Zellen, oder chemisch verändert werden, was als „Gating“ bezeichnet wird (Harris et al., 1981). So schließen eine hohe Spannungsdifferenz, ein niedriger intrazellulärer pH-Wert oder ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration die meisten Gap Junction Kanäle (Spray et al., 1984; Morley et al., 1997; Perachia et al., 2004). Der Phosphorylierungszustand der Connexine hat ebenfalls Einfluss auf das Gating von Gap Junctions (Moreno et al., 2005).

Zum Anderen wird die Kopplung zwischen zwei Zellen durch die Zahl der Gap Junction Kanäle kontrolliert. Die Halbwertszeit von Connexinen in der Plasmamembran ist mit wenigen Stunden teilweise relativ kurz (Laird et al., 1991; Beardslee et al. 1998; He et al., 2005), weshalb ihre Synthese und ihr Abbau wichtige Prozesse für die Kontrolle der Gap Junction vermittelten Kopplung darstellen. Die Synthese der Connexine findet im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt (Zhang et al., 1996; Falk und Gilula, 1998). Der Ort des Zusammenbaus zu Connexonen ist vermutlich das trans-Golgi Netzwerk (Musil und Goodenough, 1991; Koval et al., 1997; Laird, 2006). Von dort gelangen Connexone in die Plasmamembran, in der sie frei diffundieren können, bis sie in einen Gap Junction Plaque eingebaut werden und mit einem entsprechenden Connexon aus der zweiten beteiligten Zelle zu einem Gap Junction Kanal docken (Thomas et al., 2005).

Der Abbau von Gap Junctions konnte zunächst in Form von großen von Doppelmembranen umgebenden Vesikeln, den sog. „Annularen Junctions“, beobachtet werden, in denen Gap Junctions oder Teile eines Gap Junction Plaques in Vesikel internalisiert und schließlich über den lysosomalen Weg abgebaut werden (Marquart, 1977; Severs et al., 1989; Sasaki und Garant, 1986). Zusätzlich konnte auch eine Kollokalisierung von Clathrin mit Connexin43 nachgewiesen werden (Huang et al., 1996), was die Möglichkeit eines alternativen Abbauweges aufzeigt. Für ein Recycling von internalisierten Connexinen zur Membran gibt es ebenfalls Hinweise (Van Slyke und Musil, 2005).

Auch in der Internalisierung von Gap Junctions kann Phosphorylierung eine wichtige Rolle spielen. So führt zum Beispiel die Aktivierung der p34<sup>cdc2</sup> Protein Kinase zur Internalisierung von Gap Junctions Kanälen (Xie et al., 1997; Lampe et al., 1998). Daneben können auch interagierende Proteine wie ZO-1, N- und E-Cadherin, Caveolin-1 sowie Tubulin (Jongen et al., 1991; Wei et al., 2005; Giepmans und Moolenaar, 1998; Giepmans et al., 2001; Schubert et al., 2002) den Zusammenbau und Abbau von Gap Junctions beeinflussen.

In den letzten Jahren ist eine andere Funktion von Connexin-Kanälen verstärkt ins Interesse der Forschung getreten: die Funktion von ungepaarten Connexonen in der Plasmamembran, den sog. Connexin-Halbkanälen (Evans et al., 2006; Spray et al., 2006). So konnte die Abgabe von ATP über Cx43 Halbkanäle in C6-Zellen und das Vorkommen von Cx43 Halbkanälen in Astrozyten gezeigt werden, wo ATP Abgabe eine Rolle in der Weiterleitung von interzellulären Calciumwellen spielt (Kang et al., 2008). Neben Cx43 wurden auch für Cx26, Cx30, Cx30.2, Cx32, Cx36, Cx45, Cx46 und Cx50 Hinweise auf eine Funktion als Halbkanäle gefunden (Valiunas und Weingart, 2000; Valiunas, 2002; Bukauskas et al., 2006; De Vuyst et al., 2006; Gerido et al., 2007; Schock et al., 2008). Die Aufklärung der physiologischen Bedeutung von Connexin Halbkanälen hat jedoch gerade erst begonnen (Spray et al., 2006).

### 1.2 Erzeugung und Bedeutung transgener Mäuse

Zur Aufklärung der meist zelltyp- und/oder entwicklungspezifischen Funktion verschiedener Connexine hat die Technik des sog. „Gene Targeting“ erheblich beigetragen (Capecchi, 1989; Ratcliff et al., 1992; Doetschmann et al., 1987). Hiermit war es möglich, im Genom der Maus gezielt einzelne Gene auszuschalten oder durch andere zu ersetzen und damit unter anderem die Funktion vieler Connexine in der Maus zu klären (Söhl et al., 2004).

Beim Gene-Targeting macht man sich das Prinzip der homologen Rekombination in Säugerzellen zunutze. Dabei werden sequenzähnliche Bereiche zwischen verschiedenen DNA-Strängen gegeneinander ausgetauscht, wobei die Effizienz mit der Länge der homologen Bereiche deutlich zunimmt (Thomas et al., 1992). Zwischen den homologen Bereichen können dabei völlig andere Sequenzen eingefügt oder Bereiche ausgelassen werden. Zur Erzeugung einer gezielt veränderten Mauslinie führt man die homologe Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen durch und bringt diese anschließend mittels Blastozysteninjektion in einen Embryo ein. Über eine sog. chimäre Maus, hervorgegangen aus wildtyp und veränderten Stammzellen, kann man schließlich in der Folgegeneration Mäuse mit der gewünschten vererbaren genomischen Veränderung erzeugen (Theiss et al., 2000).

Auf diese Weise ist es möglich, mithilfe eines Vektors mit entsprechenden homologen Bereichen nahezu jeden beliebigen Locus im Mausgenom zu verändern und Gene zu deletieren (Knock-Out), Reportergene einzubringen oder Gene gegeneinander

auszutauschen (Knock-In). Ist diese Veränderung bereits von Beginn der Entwicklung der Maus in allen Zellen vorhanden, spricht man von einem sog. nicht-konditionalen Knock-Out bzw. Knock-In. Der Verlust vieler Gene, so auch einiger Connexine (Cx26, Cx43 und Cx45), ist jedoch embryonal oder postnatal letal. Um dennoch die Funktion des entsprechenden Gens in einem bestimmten Gewebe der Maus untersuchen zu können, bedient man sich des sog. konditionalen Knock-Outs bzw. Knock-Ins.

Dabei werden Elemente aus Systemen der Genomumlagerung aus dem Bakteriophagen P1 bzw. der Hefe verwendet, um ausschließlich in bestimmten Geweben und/oder zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung die Deletion eines Gens zu erreichen. Diese bestehen jeweils aus zwei Elementen. Dem Enzym, das die Umlagerung katalysiert, und Erkennungsstellen, an denen das Enzym angreift.

Im Fall des Phagen P1 sind dies die Cre-Rekombinase (**C**auses **r**ecombination) und sog. loxP Erkennungsstellen (**l**ocus of **c**rossing over of **P**1). loxP Erkennungsstellen bestehen aus zwei außen liegenden invertierten Sequenzwiederholungen und einer zentralen Erkennungssequenz, die die Orientierung der loxP-Stellen angibt. Zur konditionalen Deletion eines Gens wird dieses auf beiden Seiten mit loxP-Stellen flankiert (gefloxt). Sind diese in der gleichen Orientierung angeordnet, führt die Aktivität der Cre-Rekombinase zum Entfernen des dazwischen liegenden Bereichs, sind sie entgegengesetzt orientiert, wird der Bereich zwischen den loxP-Stellen invertiert (Kos, 2004; Branda und Dymecki, 2004).

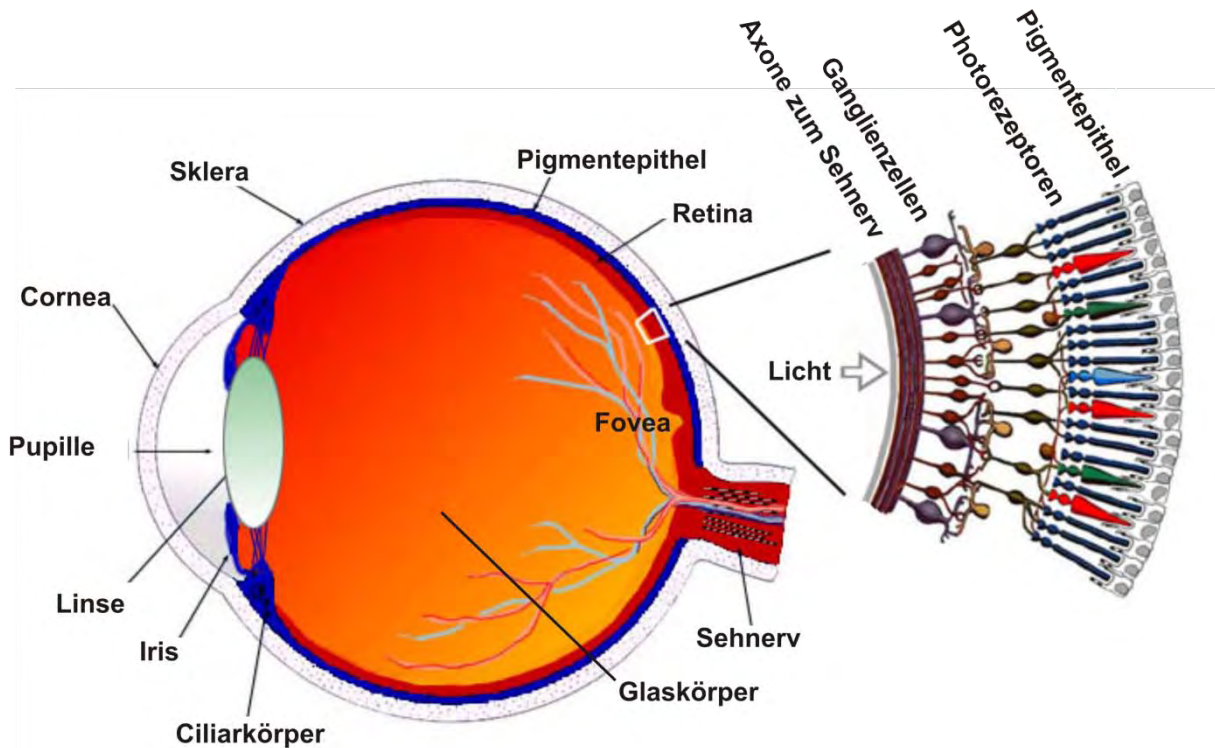
Zur Herstellung einer konditionalen Knock-Out Maus werden zunächst über homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen die loxP-Erkennungsstellen vor und hinter der zu deletierenden Region eingebracht. Um nun eine gewebespezifische Deletion mithilfe der Cre-Rekombinase in der Maus zu erreichen, bedient man sich transgener Mäuse, die die Rekombinase unter einem gewebespezifischen Promotor exprimieren. Diese können sowohl durch homologe Rekombination als auch durch Vorkerninjektion (Gordon et al., 1980) erzeugt werden. Durch Verpaarung beider Mauslinien miteinander erhält man Tiere, in denen die Cre-Rekombinase den gefloxtten Bereich in all den Geweben aus dem Genom entfernt, in denen sie exprimiert wird.

Das FLP/frt-System der Hefe beruht auf dem gleichen Prinzip wie das Cre/loxP-System (Dymecki, 1996). Aufgrund der jeweils spezifischen Erkennungssequenzen können beide Systeme auch gleichzeitig in einer Maus verwendet werden.

### 1.3 Das Auge

Das Auge der Säugetiere stellt ein hochentwickeltes Sinnesorgan zur Wahrnehmung von Licht dar. Es lässt sich dabei in den lichtbrechenden Apparat aus Cornea, Iris, Linse und Glaskörper sowie den eigentlichen sensorischen Teil, die Netzhaut oder Retina, unterteilen. Eine schematische Darstellung eines sagittalen Schnittes durch ein menschliches Auge ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Im Folgenden wird zunächst auf die

Entwicklung der Linse und insbesondere auf die Bedeutung von Gap Junctions eingegangen, bevor die Funktion der Retina genauer dargestellt wird.



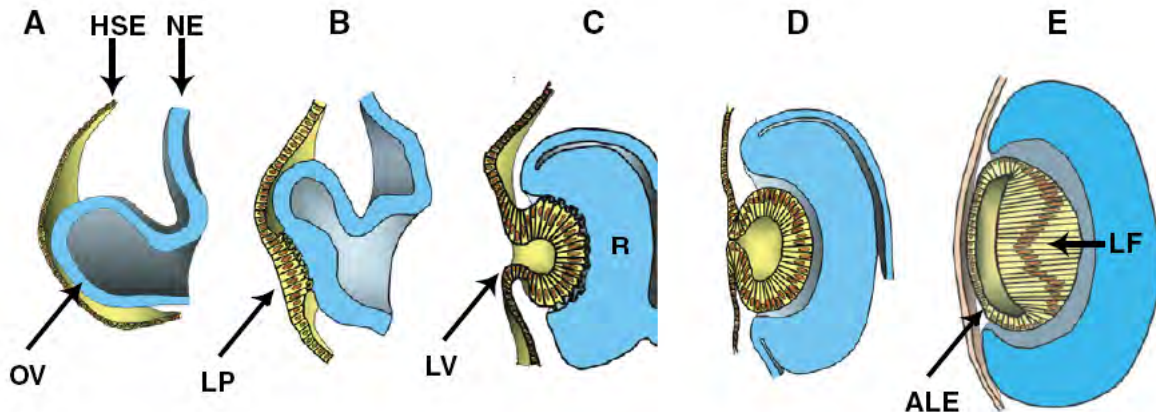
**Abbildung 1.2: Das Auge.** Schematische Darstellung eines sagittalen Schnitts durch das menschliche Auge. Licht wird über den lichtbrechenden Teil aus Cornea, Linse und Glaskörper auf den sensorischen Teil, die Retina, projiziert. Dort wird Licht von den Photorezeptoren detektiert, und über verschiedene Interneurone werden Signale bis zu den Ganglienzellen weitergegeben. Dabei findet bereits eine mehrfache Signalverarbeitung statt. Die Ganglienzellen übermitteln diese Signale als Folge von Aktionspotentialen über den Sehnerv zum Gehirn (Aus Webvision; Kolb, Fernandez und Nelson, verändert).

### 1.4 Die Linse

Die Linse ist ein avaskuläres transparentes Gewebe, das Licht auf die Retina fokussiert. Sie entsteht in der Embryonalentwicklung der Säugetiere aus ektodermalem Gewebe und wird durch die Entwicklung der Retina in Form des optischen Vesikel initiiert. Dabei verdickt sich ein Teil des Ektoderms bei Kontakt mit dem optischen Vesikel zur sog. Linsenplakode, aus der sich im Folgenden das Linsenvesikel bildet (Brownell et al., 2000; Swindell et al., 2006; Medina-Martinez und Jamrich, 2007). Die Zellen im hinteren Teil der Linse beginnen zu differenzieren, wachsen aus und formen die primären Linsenfaserzellen. Diese Zellen verlieren die meisten Organellen, um Lichtstreuung zu verhindern, und werden transkriptionell inaktiv. Die Zellen im vorderen Teil der Linse, dem späteren Linsenepithel, behalten ihren proliferativen Charakter und bilden im Laufe des Lebens langsam ständig neue Linsenfaserzellen, die sekundären Linsenfaserzellen, welche ebenfalls ihre intrazellulären Organellen verlieren (Abbildung 1.3) (Piatigorsky, 1981; Bassnett, 2002). Die Transparenz der Linse ist eine wichtige Eigenschaft, ohne die es zur Streuung des Lichts statt zur Fokussierung auf die Retina kommen würde. So sind



Linsenfaserzellen besonders angepasst und enthalten hohe Konzentrationen von Proteinen wie Crystallinen, Metaboliten, Ionen und Wasser, die ihren Brechungsindex beeinflussen (Delaye und Tardieu, 1983; Jones et al., 2005). Der genaue Mechanismus, der diese Eigenschaften der Linse kontrolliert, ist jedoch noch größtenteils unbekannt.



**Abbildung 1.3 Entwicklung der Linse.** (A) Die Entwicklung der Linse beginnt mit dem Auswachsen des optischen Vesikels (OV) aus neuroektodermalem Gewebe (NE). (B) Ein Kontakt mit dem Ektoderm der Kopfoberfläche (HSE) induziert dort eine Verdickung zur sog. Linsenplakode (LP). (C/D) Aus dem optischen Vesikel entsteht im Folgenden die Retina (R), während die Linsenplakode sich zum Linsenvesikel (LV) entwickelt. (E) Die Zellen im hinteren Teil des Linsenvesikels elongieren zu primären Linsenfaserzellen (LF), während die Zellen im vorderen Teil einen Monolayer bilden, das spätere vordere Linsenepithel (ALE) (aus Medina-Martinez und Jamrich, 2007).

### 1.4.1 Bedeutung von Gap Junctions in der Linse

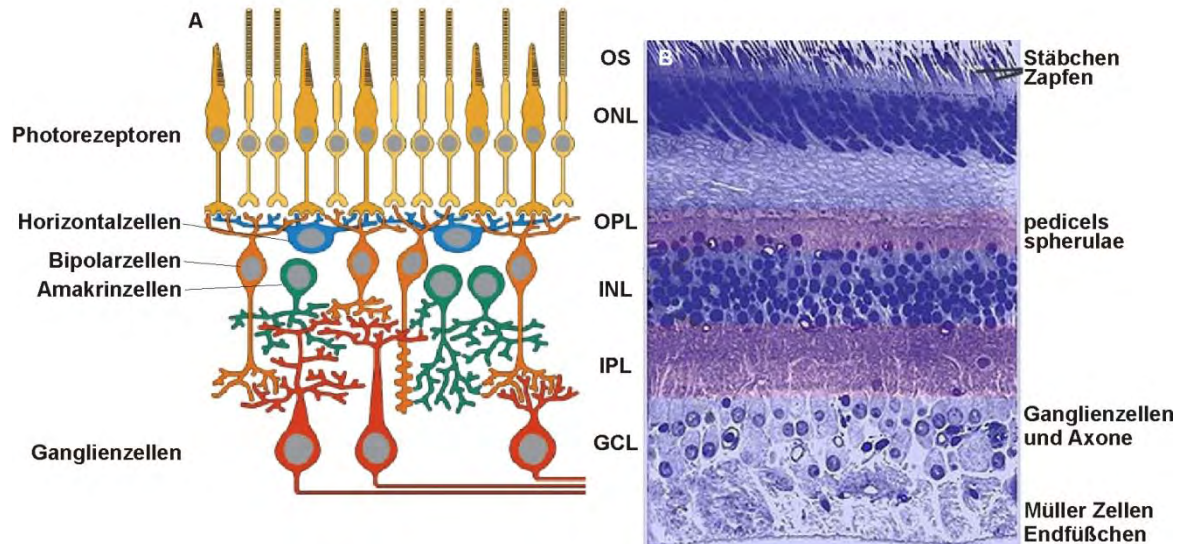
Gap Junctions spielen in der Linse als avaskuläres Organ eine besonders wichtige Rolle. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Homöostase der Linse durch einen zirkulierenden Strom von  $\text{Na}^+$  und Wasser durch Gap Junctions aufrecht erhalten wird, über den wichtige Metabolite wie Glukose ins Linseninnere transportiert werden (Mathias et al., 1997; Mathias und Rae, 2004). In der Linse der Maus wurden ursprünglich drei verschiedene Connexine nachgewiesen. Cx43 im Linsenepithel (Beyer et al., 1989), Cx46 in Faserzellen und Cx50 in beiden Zelltypen (Rong et al., 2002). Der Verlust von Cx46 bzw. Cx50 in der Maus beeinträchtigt die Transparenz der Linse deutlich. So führt der Verlust von Cx46 zu Trübungen der Linse und nukleären Katarakten (Baruch et al., 2001; Gao et al., 2004), während der Verlust von Cx50 neben der Transparenz der Linse auch ihre Entwicklung und damit die Größe beeinflusst, was zu verkleinerten Linsen in Cx50<sup>-/-</sup> Mäusen führt (Rong et al., 2002; Sellitto et al., 2004; White et al., 1998). Cx50 scheint daher zwei verschiedene Funktionen in der Linse zu besitzen. So kann eine Überexpression von Cx46 in Cx50<sup>KICx46/KICx46</sup> Mäusen den Verlust der Cx50 vermittelten Kopplung teilweise ausgleichen, und es kommt nicht mehr zur Kataraktbildung. Die Funktion von Cx50 in der Linsenentwicklung lässt sich durch Knock-In von Cx46 jedoch nicht ausgleichen. So sind die Linsen von Cx50<sup>KICx46/KICx46</sup> Mäusen ebenso wie die der Cx50KO Mäuse verkleinert (White, 2002).

Punktmutationen von Cx46 und Cx50 führen beim Menschen zu vererbbarer Kataraktbildung (Addison et al., 2006; Hansen et al., 2006; Vanita et al., 2006). Eine Untersuchung verschiedener Punktmutationen anhand entsprechender Knock-In Mäuse erbrachte, dass die An- bzw. Abwesenheit der Wildtypformen von Cx46 bzw. Cx50 die Auswirkungen einer Mutation stark beeinflussen (Chang et al., 2002; Xia et al., 2006). So führt die Mutation von Serin 50 zu Prolin (Cx50<sup>S50P</sup>) in der ersten extrazellulären Schleife in Anwesenheit von Cx50wt und Abwesenheit von Cx46 zur gestörten Elongation der primären Faserzellen und in Anwesenheit von Cx46 und Abwesenheit von Cx50 zur Störung der Elongation von sekundären Faserzellen. Die Cx50<sup>S50P</sup> Punktmutation hat in einem Tier mit ansonsten intaktem Cx46 und Cx50 Gen die stärksten Auswirkungen und stört die gesamte Linsenentwicklung von primären und sekundären Faserzellen (Xia et al., 2006).

Als letztes in der Linse exprimiertes Connexin wurde vor einigen Jahren Cx23 identifiziert (Gustinch et al., 2003; Söhl et al., 2004), dessen Expression in der Linse nun auch in Zebrafisch und Maus gezeigt werden konnte (Iovine et al., 2008; Puk et al., 2008). Im Gegensatz zu Mutationen von Cx46 und Cx50 inhibiert eine Mutation von Cx23 (Cx23R32Q) die gesamte Linsenentwicklung, und es kommt im homozygoten Zustand nicht zur Elongation der primären oder sekundären Faserzellen, was zu einem leeren Linsenvesikel und letztlich zum Fehlen der Linse führt (Puk et al., 2008). Die physiologische Rolle, die Cx23 in der Linse spielt, konnte jedoch bisher nicht geklärt werden.

### 1.5 Die Retina

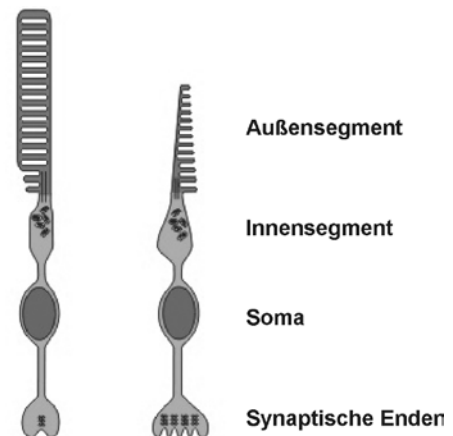
Die Netzhaut oder Retina stellt den sensorischen Teil des Auges dar. Hier findet sowohl die Detektion von Licht als auch die erste Signalverarbeitung statt. Die Netzhaut ist ein dünnes Gewebe von weniger als 0,5 mm Dicke, das nahezu die gesamte Innenseite des Auges auskleidet. Sie besteht aus drei Schichten mit Somata von Neuronen und zwei Verschaltungsschichten (vergl. Abb. 1.4). Den Schichten der Photorezeptoren, den Außensegmenten (OS) und der äußeren nukleären Schicht (ONL) mit den Somata der Rezeptoren, folgt die äußere plexiforme Schicht (OPL) mit Verschaltungen der Photorezeptoren zu nachfolgenden Neuronen. Weiter folgen die innere nukleäre Schicht (INL) mit den Somata der Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen, die innere plexiforme Schicht (IPL) als weitere Schicht mit Verschaltungen und die Ganglienzellschicht (GCL) mit den Somata der Ganglienzellen. Die Retina von Vertebraten bezeichnet man als invers, da hierbei Licht zunächst durch die Schichten mit Reiz verarbeitenden Zellen hindurch auf die innen liegenden Rezeptoren fällt (Benninghoff, 2002) (siehe auch Abb. 1.2).



**Abbildung 1.4 Aufbau der Retina.** (A) Eine schematische Darstellung der Retina in einem vertikalen Schnitt zeigt die an der Detektion und Verarbeitung von Licht beteiligten Neurone der Retina. Die äußere nukleäre Schicht (ONL) bilden die Somata der verschiedenen Rezeptoren, deren Außensegmente (OS) sich als separate Schicht unterscheiden lassen. In der äußeren plexiformen Schicht (OPL) findet die erste Verschaltung mit Horizontalzellen und Bipolarzellen in den synaptischen Endigungen der Zapfen und Stäbchen statt, den pedicels und spherulae. Die Somata der Horizontal- und Bipolarzellen liegen zusammen mit denen der nachgeschalteten Amakrinzellen in der inneren nukleären Schicht (INL). Die zweite Ebene der Verschaltung zwischen Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen findet in der inneren plexiformen Schicht (IPL) statt. Die Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht (GCL) leiten schließlich über ihre Axone Signale an das Sehzentrum des Gehirns weiter (verändert nach Prof. R. Weiler). (B) Lichtmikroskopisches Bild eines vertikalen Schnittes durch die zentrale menschliche Retina (aus Webvision; Kolb, Fernandez und Nelson).

### 1.5.1 Aufbau und Funktion der Photorezeptoren

Photorezeptoren bestehen aus einem äußeren Segment mit Stapeln von invaginierten Membranen, die das Photopigment enthalten, gefolgt von einem darunter liegenden inneren Segment mit Mitochondrien, ER und Golgi-Apparat, einem Zellkörper mit Zellkern und einem synaptischen Terminal, über das Kontakt zu Signalverarbeitenden Neuronen hergestellt wird (Abb. 1.5). Die Retina besitzt zwei morphologisch und funktionell unterschiedliche Typen von Photorezeptoren: Die Zapfen mit einem konischen vergleichsweise breiten Außensegment liegen mit ihren Zellkörpern direkt unterhalb der sog. äußeren limitierenden Membran in einer Reihe am oberen Rand der äußeren nukleären Schicht (ONL). Sie sind für das Farbsehen bei Tag (photopisches Sehen) verantwortlich und zeigen eine schnelle Reaktion auf Lichtreize (Kawamura und Tashibanaki, 2008). Die Zellkörper

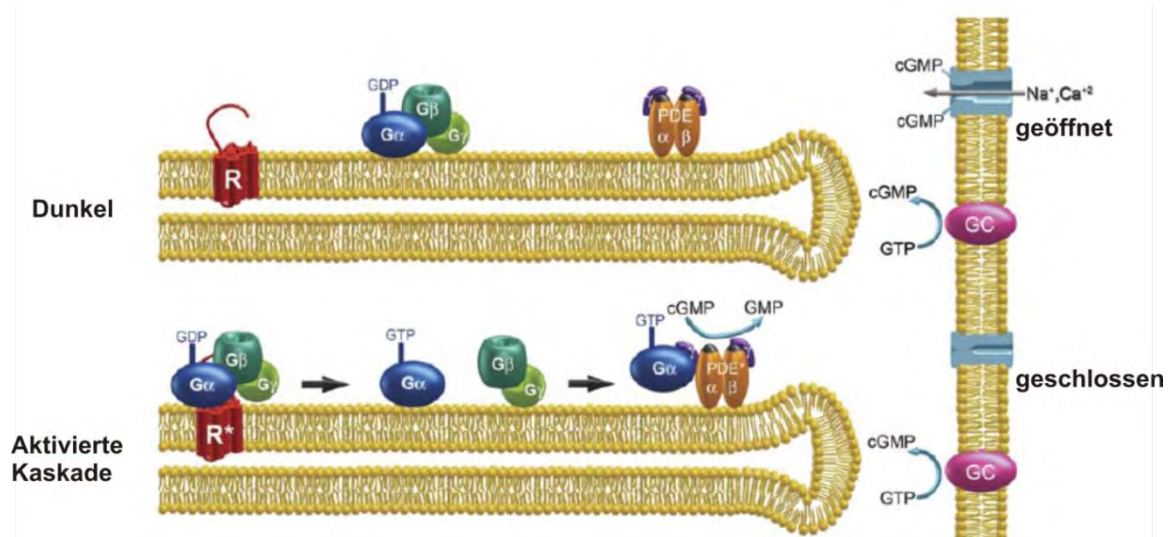


**Abbildung 1.5: Photorezeptoren und ihre synaptischen Enden.** Die beiden Photorezeptortypen Stäbchen (links) und Zapfen (rechts) bestehen jeweils aus einem Außensegment mit den optischen Pigmenten, einem Innensegment mit Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum und Golgi Apparat, dem Soma mit dem Zellkern und den synaptischen Enden. Für Stäbchen werden diese als spherulae bezeichnet, während man bei Zapfen von pedicels spricht.

der Stäbchen, mit einem schlanken stabförmigen Außensegment, liegen dagegen in der gesamten äußeren nukleären Schicht verteilt und machen in der Säugetierretina den Großteil der Rezeptoren aus. Sie sind für das Sehen bei Dämmerlicht (skotopisches Sehen) verantwortlich und ermöglichen durch äußerst empfindliche Detektion von sogar nur einzelnen Photonen pro Rezeptor das Schwarz/Weiß-Sehen (Hecht et al., 1942; Schneeweis und Schnapf, 1995). Ihre Signalverarbeitung ist dagegen deutlich langsamer als die der Zapfen (MacLeod, 1972). In ihrem Aufbau zeigt die Retina verschiedener Spezies eine deutliche Anpassung an die entsprechenden Lebensbedingungen. In meist nachtaktiven Spezies, wie der Maus oder der Ratte, sowie in den Retinae der meisten anderen Säuger dominiert das Stäbchen-abhängige Sehen mit einem Zapfenanteil von nur 3 - 5 % z.B. in der Maus (Jeon et al., 1998).

Die Detektion von Licht findet innerhalb der Außensegmente über Photopigmente statt, die in Membranstapeln eingebaut sind. Dabei handelt es sich um das Pigment Retinal, welches über einen Lysin-Rest in der letzten Transmembrandomäne des Sieben-Transmembranproteins Opsin gebunden ist. Das Gesamtmolekül wird als Rhodopsin bezeichnet (Hargrave et al., 1984; Hargrave und McDowell, 1992).

Trifft ein Lichtquant auf ein Rhodopsinmolekül, so verändert der Retinal-Anteil seine Konformation von 11-Cis-Retinal zu all-Trans-Retinal. Eine Zwischenstufe in dieser Reaktion aktiviert das G-Protein Transduzin, welches wiederum eine Phosphodiesterase aktiviert. Dies führt zum Abbau von cGMP. Die Verringerung des cGMP-Spiegels in der Zelle schließt einen cGMP-abhängigen Ionenkanal, wodurch die Membran des Photorezeptors hyperpolarisiert wird (Hargrave und McDowell, 1992) (vergl. Abb. 1.6).



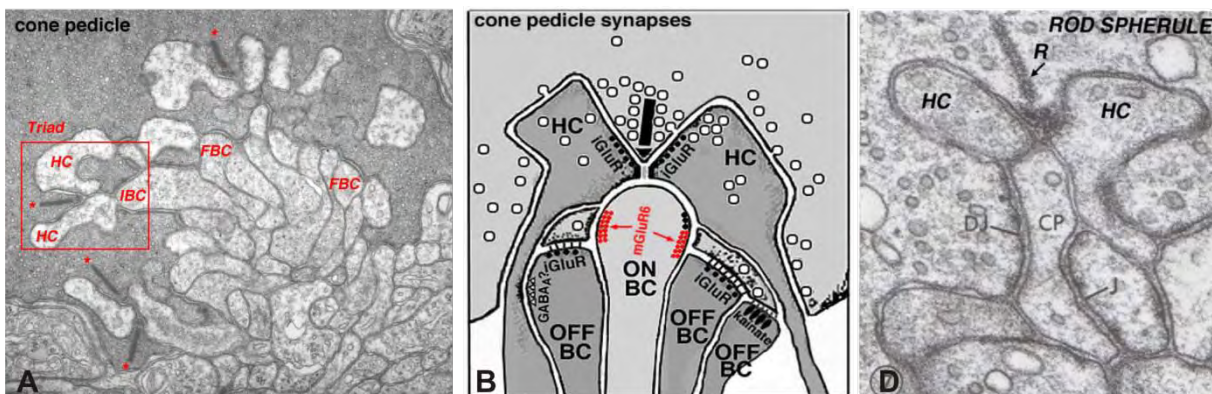
**Abbildung 1.6: Die optische Signalkaskade.** Die obere Reihe („Dunkel“) zeigt die an der Phototransduktion beteiligten Proteine, Rhodopsin (R), Transduzin (bestehend aus  $G\alpha$ ,  $G\beta$  und  $G\gamma$  Untereinheit) und die Phosphodiesterase (PDE mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  Untereinheit) an den Membranstapeln in den Außensegmenten der Photorezeptoren. Nach Aktivierung des Rhodopsins mittels Licht (untere Reihe „Aktivierte Kaskade“) wird durch Interaktion von Transduzin mit der aktivierten Form des Rhodopsins gebundenes GDP durch GTP ersetzt. Dies führt zur Freisetzung der  $G\alpha$ -Untereinheit des Transduzins, welche wiederum die PDE aktiviert. Diese setzt cGMP zu GMP um und verringert damit den cGMP-Spiegel der Zelle. Dadurch wird ein cGMP-abhängiger Ionenkanal geschlossen und es kommt zur Hyperpolarisation der Rezeptormembran. Die Guanylatzyklase (GC) sorgt für ein Wiederansteigen der cGMP Konzentration nach Inaktivierung der PDE (aus Burns und Arshavsky, 2005).

Die Photorezeptoren sind also im Dunkeln durch einen ständigen  $\text{Na}^+$ - bzw.  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ -Strom depolarisiert, was zu einer kontinuierlichen Abgabe von Glutamat an nachgeschaltete Neurone führt. Durch einen Lichtreiz versiegt dieser Strom, und die Glutamatausschüttung wird verringert oder gestoppt (Stryer 1991, Yau 1994).

### 1.5.2 Signalweitergabe und Verarbeitung

Über ihre synaptischen Enden, die sog. pedicles für Zapfen und spherules für Stäbchen, stellen Photorezeptoren Kontakt zu mehreren Zelltypen gleichzeitig her. Dabei hat sich eine sehr ungewöhnliche synaptische Struktur entwickelt: die sog. synaptische Triade (Abb. 1.7). In dieser Synapse treffen sich invaginierende Fortsätze der Horizontalzellen und Bipolarzellen in unmittelbarer Nähe zur sog. Bändersynapse der Photorezeptoren, einer bandartigen Struktur mit synaptischen Vesikeln, die eine langanhaltende Ausschüttung von Glutamat ermöglicht (Thoreson, 2007).

Neben den invaginierenden Fortsätzen der Bipolarzellen, bei denen es sich um sog. ON-Bipolarzellen handelt, welche mit einer Hyperpolarisation auf Glutamatfreisetzung durch die Photorezeptoren reagieren, gibt es zusätzlich an der Basis der pedicles ansetzende Bipolarzellen sog. OFF-Bipolarzellen, die Kontakt über sog. „Basal Junctions“ aufnehmen. Sie reagieren mit einer Depolarisation auf Glutamatfreisetzung (Werblin und Dowling, 1969; Werblin, 1991). Die unterschiedliche Reaktion beider Bipolarzelltypen ist auf die Expression unterschiedlicher Glutamat-Rezeptortypen zurückzuführen (Slaughter und Miller, 1983; Dhingra, 2001). Dadurch werden die Lichtsignale der Zapfen bereits an der ersten Synapse der Retina in zwei parallele Systeme von ON – und OFF- Signalweg aufgeteilt (Kolb, 2003).



**Abbildung 1.7: Die synaptischen Enden der Photorezeptoren.** Elektronenmikroskopische Aufnahme (A) und Schema (B) eines Zapfen pedicles. Ein Zapfen pedicle enthält mehrere als Triade bezeichnete Strukturen aus einer Bändersynapse (\*), den lateralen Elementen der Horizontalzellen (HC) und einem zentralen Fortsatz einer ON-Bipolarzelle (ON-BC). Weiter unterhalb gehen OFF-Bipolarzellen (OFF-BC) sog. Basalkontakte (FBC) mit den Zapfen ein. Die Ausstattung mit unterschiedlichen Glutamatrezeptortypen (mGluR6 bzw. iGluR) lässt ON- und OFF-Bipolarzellen jeweils entgegengesetzt auf eine Glutamatausschüttung der Rezeptoren reagieren. (C) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer von meist zwei Triaden in einem Stäbchen spherule. Auch hier sind die lateralen Elemente der Horizontalzellen (HC) und der zentrale Fortsatz der Bipolarzelle (CP) an der Bändersynapse (R) zu erkennen. Basalkontakte besitzen Stäbchen spherulae nicht. (DJ distal Junction, J Junction) (Aus Lasansky, 1972; Wevvision, Kolb, Fernandez und Nelson)

Für Zapfen gibt es jeweils eigene Zapfen-ON und OFF-Bipolarzellen, welche direkt mit entsprechenden ON- bzw. OFF-Ganglienzellen verschaltet sind. Die Stäbchen hingegen benutzen einen indirekten Weg. Auch sie besitzen entsprechende Bipolarzellen, diese sind jedoch zunächst mit All-Amakrinzellen verschaltet. All-Amakrinzellen wiederum nehmen über elektrische Synapsen Kontakt zu Zapfen ON-Bipolarzellen auf, über die dann entsprechende ON-Ganglienzellen innerviert werden. So nutzen die Stäbchenbipolarzellen den Zapfensignalweg, um Lichtsignale über die Ganglienzellen schließlich an die Bereiche zur Verarbeitung visueller Informationen im Subcortex und Cortex weiterzugeben (Kolb, 2003).

### 1.5.3 Gap Junctions in der Retina

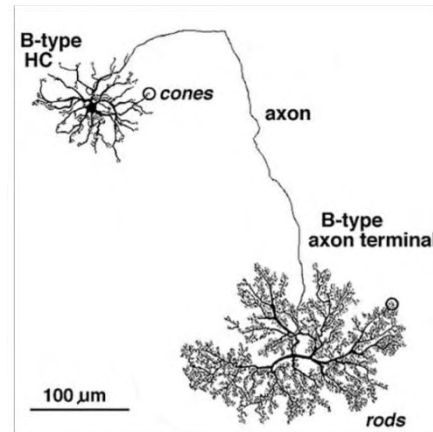
Am Beispiel der All-Amakrinzellen erkennt man, dass elektrische Kopplung über Gap Junctions in der Signalweiterleitung der Retina eine wichtige Rolle spielt. So sind, wie bereits beschrieben, All-Amakrinzellen und Zapfen-ON-Bipolarzellen über eine heterotypische Kopplung von Cx45 und Cx36 miteinander verbunden (Maxeiner et al., 2005). Auch Stäbchen und Zapfen sind mittels Cx36 vermutlich über kleine Ausläufer der Zapfen, den Telodendrien, miteinander gekoppelt (Ciolofan et al., 2007). Außerdem finden sich Gap Junctions zwischen Amakrinzellen (Cx36), Ganglienzellen (Cx36, Cx30.2) und auch Horizontalzellen (Cx57) (Massey et al., 2003; Feigenspan et al., 2004; Schubert et al., 2005; Perez de Sevilla-Müller et al. in Vorbereitung; Hombach et al., 2004). Das Ausmaß der Kopplung kann durch lichtabhängige Neurotransmitter wie Dopamin verändert werden. So bewirkt beispielsweise eine lichtabhängige Aktivierung der cAMP abhängigen Proteinkinase (PKA) eine Phosphorylierung von Cx36, was die Cx36 vermittelte Kopplung zwischen Amakrinzellen reduziert (Urschel et al., 2006). Die Retina als Teil des Gehirns ist somit ein gut geeignetes und oft verwendetes System, um die Bedeutung, Funktion und Regulation von elektrischen Synapsen zu untersuchen.

### 1.5.4 Horizontalzellen

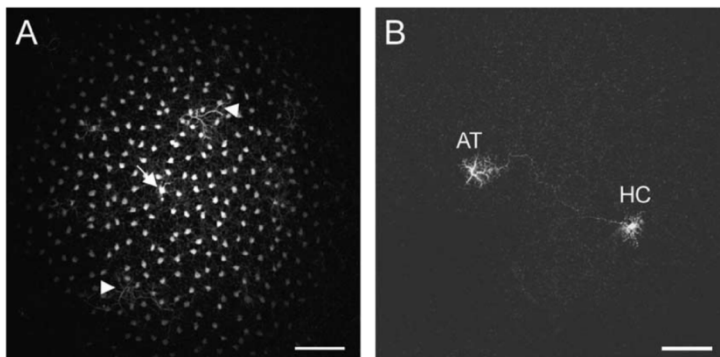
Der dritte an der synaptischen Triade der Photorezeptoren beteiligte Zelltyp sind die Horizontalzellen. In der Maus ist, im Gegensatz zu anderen Säugetierarten, nur ein Typ beschrieben, der axontragende oder B-Typ (Suzuki und Pinto, 1986; He et al., 2000) (Abb. 1.8).

Dieser Horizontalzelltyp steht über seine dendritischen Ausläufer in Form der lateralen Elemente der synaptischen Triade in Kontakt mit den synaptischen Enden der Zapfen, mit seinen axonalen Ausläufern dagegen mit denen der Stäbchen (Peichl und Gonzalez-Soriano, 1993). Eine einzige Horizontalzelle erhält über ihre verzweigten synaptischen Enden Eingang von meist vielen hundert Photorezeptoren (Peichl und Gonzales-Soriano, 1993).

Die Signalweiterleitung geschieht dabei über den Neurotransmitter Glutamat und entsprechende Rezeptoren auf den Horizontalzellen (Schmidt, 1997; Schubert et al., 2006). Den Bereich der Retina, in dem eine Horizontalzelle auf Lichtreize reagiert, bezeichnet man als ihr rezeptives Feld. Dieses wird durch Gap Junction-vermittelte Kopplung zwischen den dendritischen bzw. den axonalen Enden noch zusätzlich vergrößert (Weiler et al., 1999; He et al., 2000). Für die Kopplung von Horizontalzellen ist nahezu ausschließlich Cx57 verantwortlich, dessen Verlust zu einer 99%igen Reduktion der Kopplung (Hombach et al., 2004) (Abbildung 1.9) und einer Reduktion der Größe der rezeptiven Felder der Horizontalzellen führt (Shelly et al., 2006). Der Grad der Kopplung von Cx57 Gap Junctions wird lichtabhängig über Neurotransmitter wie Dopamin, Stickstoffmonoxid (NO) und Retinsäure gesteuert (Weiler et al. 2000; Weiler et al., 2001), wobei auch der pH-Wert eine wichtige Rolle spielt (Hampson et al., 1994).



**Abbildung 1.8: Morphologie einer B-Typ Horizontalzelle nach Golgi-Färbung aus der Retina der Katze.** Eine B-Typ Horizontalzelle besteht aus dem Soma mit dendritischen Ausläufern (oben links) und den Axonterminalien (unten rechts), verbunden durch ein langes Axon (Kolb, 1974).



**Abbildung 1.9: Kopplung von Horizontalzellen.** Die Kopplung der Horizontalzellen über Gap Junctions wurde mithilfe des Spurmoleküls Neurobiotin in Cx57<sup>+/+</sup> (A) und Cx57<sup>-/-</sup> (B) Retina untersucht. In Wildtyp Retina zeigt sich ein großes Netzwerk von Zellsomata, die mit der injizierten Zelle (Pfeil) gekoppelt sind. Zusätzlich sind auch einige Axonterminalien gefärbt (Pfeilspitzen) Diese Kopplung ist in Cx57KO Retinae nicht mehr vorhanden. Der Maßstab entspricht 100 µm (aus Hombach et al., 2004).

Um den Kontrast bereits während der Signalverarbeitung in der Retina zu erhöhen, besitzen Bipolarzellen und entsprechend auch Ganglienzellen ein System aus aktivierenden zentralen Bereichen und inhibierenden lateralen Bereichen (ON-Bipolarzellen) bzw. umgekehrt (OFF-Bipolarzellen). Dies bezeichnet man als Center-Surround Antagonismus (Kuffler, 1953; Hubel und Wiesel, 1960). So ist die Antwort einer ON-Bipolarzelle auf einen Lichtreiz im Zentrum (Center) am stärksten, wenn die Umgebung (Surround) dunkel ist. Ist die Lichtintensität dagegen für Zentrum und Umgebung einer Bipolarzelle gleich, ist die Antwort wesentlich schwächer. Den zentralen Anteil macht der direkte Kontakt der Bipolarzellen zu den Photorezeptoren aus, während die Umgebungshelligkeit vermutlich über die Horizontalzellen wahrgenommen wird (Kamermans und Spekreijse, 1999). Zusätzlich gibt es auch für den Center-Surround

Antagonismus der Ganglienzellen in der inneren plexiformen Schicht eine Umgebungs-komponente, die durch die Amakrinzellen beigesteuert wird (Ichinose und Lukasiewicz, 2005).

Die laterale Inhibition durch Horizontalzellen kann über zwei mögliche Wege stattfinden: eine direkte Inhibition der Bipolarzellen (Xang und Wu, 1991) und eine negative Rückkopplung zu den Photorezeptoren, was wiederum das Signal an die Bipolarzellen verändert (Kamermans et al., 2001). Der Mechanismus der negativen Rückkopplung ist zwar seit vielen Jahren bekannt, dessen molekulare Grundlagen sind jedoch nicht endgültig geklärt. So wurde zunächst eine Rückkopplung über den Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) vorgeschlagen (Kaneko und Tachibana, 1986), und es konnten auch alle dazu notwendigen Komponenten in Horizontalzellen und Photorezeptoren nachgewiesen werden (Kamermans et al., 1999). Dennoch lässt sich die Rückkopplung durch den GABA-Rezeptor Antagonisten Picrotoxin nicht vollständig unterdrücken (Hirasawa und Kaneko, 2003; Vessey et al., 2005). Eine weitere Hypothese betrifft die Beteiligung von Protonen im synaptischen Spalt zwischen Horizontalzellen und Photorezeptoren (Hirasawa und Kaneko, 2003; Jouhou et al., 2007; Davenport et al., 2008), die bei Lichtstimulation über Erhöhung des pH-Wertes im synaptischen Spalt die Leitfähigkeit von Calciumkanälen in der Membran der Photorezeptoren verändern. Eine Alkalisierung der Oberfläche der Horizontalzellen als Antwort auf Glutamatstimulation oder Depolarisation (entsprechend dem Zustand im Dunkeln), wie in verschiedenen Arbeiten beschrieben (Molina et al., 2004; Kreitzer et al., 2007), spricht jedoch gegen diesen hypothetischen Mechanismus. In der dritten Hypothese wird eine Beteiligung von Connexin-Halbkanälen im synaptischen Spalt vermutet, die durch einen sog. ephaptischen Effekt zu einer Inhibition des Calciumeinstroms in die Photorezeptoren führen (Kamermans et al., 2001). Bei einem ephaptischen Effekt handelt es sich um die Beeinflussung zweier benachbarter Neurone über eine Veränderung des Potentials im extrazellulären Spalt (Kamermans und Fahrenfort, 2004). Für die synaptische Triade wurde folgender Mechanismus vorgeschlagen: Stimulation der Rezeptoren durch Licht reduziert die Ausschüttung von Glutamat, was zu einer Hyperpolarisation der Horizontalzellen führt. Dies soll Connexin-Halbkanäle in den der Bändersynapse benachbarten lateralen Elementen der Horizontalzellen öffnen. Dadurch kommt es zu einem  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Einstrom in Horizontalzellen, was auch das Potential über der Zapfenmembran beeinflusst. Dieses wird weniger negativ, wodurch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle in der Membran der Rezeptoren geöffnet werden, was wiederum zu einer Erhöhung der Glutamat-ausschüttung führt. In der Goldfischretina wurden Connexin-Halbkanäle in den lateralen Elementen der synaptischen Triade bereits identifiziert (Shields et al., 2007) und auch in der Maus gibt es Hinweise auf eine Lokalisation von Cx57 an dieser Stelle (Ciolofan et al., 2007).

Doch auch für diese Hypothese werden Gegenargumente angeführt. So führt der Verlust von Cx57 in der Maus, dem bisher einzigen in Horizontalzellen beschriebenen Connexin,



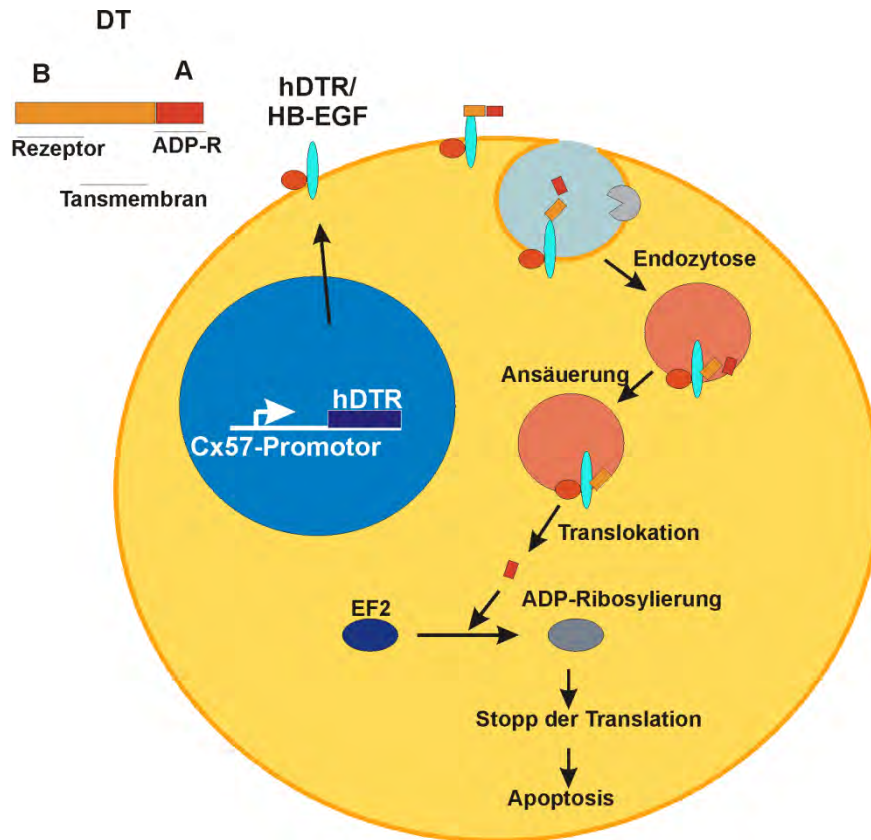
nicht zu einem Verlust der negativen Rückkopplung (Shelley et al., 2006), und der Center-Surround Antagonismus der Ganglienzellen wird nicht beeinflusst (Dedek et al., 2007). Die Rolle der Horizontalzellen und deren negative Rückkopplung zu den Photorezeptoren im Besonderen bedarf daher noch ausgiebiger Untersuchungen.

### 1.6 Das DT/DT-Rezeptor System

Eine Möglichkeit, die Funktion eines bestimmten Zelltyps zu untersuchen, ist die Ablation der entsprechenden Zellen *in vivo*. Dies kann entweder konstitutiv geschehen, was zum Verlust einer bestimmten Zelllinie und ihrer Nachfahren bereits während der Entwicklung führt, oder konditional, wobei sich der Zeitpunkt der Ablation genau bestimmen lässt. Zur konstitutiven Ablation werden zum Beispiel bestimmte, für die Entwicklung einer Zelllinie essentielle Gene mithilfe der Knock-Out Technik zerstört (Kitamura et al., 1991), oder ein toxisches Protein, wie z.B. die katalytische Untereinheit des Diphtherie Toxins, werden unter einem zelltypspezifischen Promotor exprimiert (Palmiter et al., 1987; Breitman et al. 1987; Kobayakawa et al., 2007).

Zur konditionalen Ablation eines Zelltyps wird ein System aus Diphtherie Toxin (DT) und DT-Rezeptor verwendet. Das Toxin besteht aus zwei Untereinheiten, von denen die B-Untereinheit die Bindung an einen bestimmten Rezeptor vermittelt und für den Import des gesamten Proteins in das Zytoplasma der Zelle sorgt. Die A-Untereinheit katalysiert eine Enzymreaktion, wobei der eukaryotische Translationsfaktor EF2 über ADP-Ribosylierung inaktiviert wird. Dies führt zu einem Stopp der Translation und schließlich zur Einleitung der Apoptose (Morimoto und Bonavida, 1992; siehe Abb.1.10). Aufgrund der enzymatischen Wirkung des Toxins genügt bereits ein einzelnes DT Molekül pro Zelle, um diese zu töten (Yamaizumi et al., 1978).

Als Rezeptor für die Aufnahme des Toxins wurde eine membranständige Vorläuferform des heparinbindenden epidermalen Wachstumsfaktors (HB-EGF) identifiziert (Honjo et al., 1968). Die Affinität der murinen Form dieses Rezeptors zu DT ist jedoch um den Faktor  $10^5$  geringer als die des menschlichen Rezeptors. Daher sind Mäuse resistent gegen DT (Mitamura et al., 1995; Pappenheimer et al., 1982). Um nun einem bestimmten Zelltypen die Aufnahme von DT möglich zu machen, wird die menschliche Form des HB-EGF (nachfolgend DT-Rezeptor genannt) unter einem zelltypspezifischen Promotor exprimiert. Dadurch werden nach Behandlung der Mäuse mit DT ausschließlich diese Zellen ablatiert (vergl. Saito et al., 2001; Buch et al., 2005).



**Abbildung 1.10: Das Diphtherie Toxin/DT-Rezeptor System.** Der DT-Rezeptor (der menschliche HB-EGF Vorläufer oder hDTR) wird in der Maus unter einem zelltypspezifischen Promotor (hier der Cx57-Promotor) exprimiert. Dies versetzt diese Zellen in die Lage die B-Untereinheit (Rezeptor) des Diphtherie Toxins (DT) zu binden und über Endozytose aufzunehmen. Ein Teil der B-Untereinheit ermöglicht die Translokation der A-Untereinheit aus Endosomen in das Zytoplasma der betroffenen Zelle (Transmembran). Dort wird der Translationselongationsfaktor EF2 durch die katalytisch wirksame A-Untereinheit des DT ADP-ribosyliert und damit inaktiviert. Es kommt zu einem Stopp der Translation und schließlich zur Apoptose der Zelle. Wildtypzellen der Maus ohne die menschliche Form des Rezeptors können das Toxin hingegen nicht aufnehmen und sind entsprechend resistent gegen DT.

### 1.7 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das DT/DT-Rezeptor System verwendet, um mithilfe des Connexin57-Promotors den DT-Rezeptor speziell in Horizontalzellen einer transgenen Mauslinie zu exprimieren. Nach Behandlung mit DT sollten diese Zellen selektiv ablatiert werden. Dazu wurde mithilfe eines von Dr. K. Wellershaus hergestellten Austauschvektors die Cx57-DTRfrtCre Mauslinie erzeugt und analysiert. Die zur Ablation der Horizontalzellen nötige Menge an DT sollte ermittelt und die Auswirkung der Ablation der Horizontalzellen auf die Morphologie der Retina untersucht werden. Die auf diese Weise Horizontalzell-ablatierten Mäuse sollten in weiteren physiologische Untersuchungen Aufschluss geben über die Bedeutung der Horizontalzellen in der Signalverarbeitung der Retina allgemein und über die Beteiligung der Horizontalzellen an der Ausbildung des Center-Surround Antagonismus der Ganglienzellen im Besonderen.

Als zweites Gen enthielt der Austauschvektor, und damit auch die resultierende Mauslinie, eine Cre-Rekombinase, die nach FLP/frt-vermittelter Deletion des DT-Rezeptors unter die Kontrolle des Cx57-Promotors gelangt. Mittels einer Mauslinie mit ubiquitärer FLP-Rekombinase Expression sollte so aus der Cx57-DTRfrtCre die Cx57-Cre Mauslinie erzeugt und die Funktion der Cre-Rekombinase nachgewiesen werden. Diese sollte dann für die konditionale Ausschaltung verschiedener Rezeptoren in Horizontalzellen zur Verfügung stehen.

Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Arbeit die Kanaleigenschaften von Cx57, dem Connexin der Horizontalzellen, und Connexin23 (Cx23), einem Connexin der Linse, genauer bestimmt. Dazu wurden jeweils stabil exprimierende Zelllinien hergestellt und analysiert.

Eine Untersuchung des vorwiegend neuronal exprimierten Connexins Connexin36 (Cx36) und der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) sollte Auskunft über die Interaktion beider Proteine sowie die Phosphorylierung von Cx36 durch die CaMKII geben.

## 2. Material

### 2.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer für molekularbiologische Grundtechniken wurden, falls nicht anders in Kapitel 3 erwähnt, entsprechend den Angaben in der Protokollsammlung "Current Protocols im Molekular Biology" (Ausubel et al., 1989) verwendet. Die Lösungen zur Analyse von  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in Gewebeschnitten entsprachen den Angaben in Güldenagel et al. (2000). Medien für die embryonale Stammzellkultur und die Kultur von HeLa-Zellen entsprachen den Angaben in Theis et al. (2000) bzw. Elfgang et al. (1995). Alle verwendeten Chemikalien, Enzyme, Nukleotide sowie Radiochemikalien wurden von den Firmen Difco, Fulka, GE Healthcare, Gibco, ICN Biomedicals, Invitrogen, Merck, MWG-Biotech, New England Biolabs, Perbio Science, Promega, Riedel-de-Haën, Roche, Roth, Serva und Sigma bezogen.

### 2.2 Allgemeine Labor-, Zellkulturmaterialien und Geräte

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Glaswolle	Roth
Hybond <sup>TM</sup> -ECL <sup>TM</sup> Nitrozellulosemembran	GE Healthcare
Hybond <sup>TM</sup> -N <sup>TM</sup> Nylonmembran	GE Healthcare
Objekträger, Deckgläschen	Marienfeld, Menzel-Gläser
Pipettenspitzen, Reagenzgefäße	Sarstedt, Falcon
Röntgenfilm BIOMAX MR	Kodak
Fuji Medical X-Ray Super RX	Fujifilm
Röntgenfilm Amersham Hyperfilm <sup>TM</sup> MP	GE Healthcare
Sterile Zellkulturartikel	Falcon, Sarstedt, Nunc, Becton Dickinson
<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Axiophot: Durchlicht-/Fluoreszenzmikroskop mit AxioCam Color HR	Zeiss
Binokular MS5	Leica
Blotting Chamber Mighty-small II	Bio-Rad
Elektrophoresekammer Mighty-small II (SDS-PAGE)	Hoefer
Elektrophoresekammer GNA-100 und GNA-200	Pharmacia
Inkubatoren für die eukaryotische Zellkultur mit CO <sub>2</sub> -Regulierung	Heraeus
Kryostat HM500OM	Microm
Laser Scan Mikroskop 510 META	Zeiss
Multifuge 3 S-R	Heraeus
PCR-Maschine PTC-100 und PTC-200	Biozym
Spektralphotometer DU 640	Beckman
Szintillationszähler LS 1801	Beckman
Ultraschallbad TransonicT460	Branson
UV Stratalinker 2400	Stratagene
UV-Transluminator E.A.S.Y. Win32	Herolab
Zentrifuge 5415 D	Eppendorff

### 2.3 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pBlueskript SKII <sup>+</sup> pMJ-Green	Klonierungsvektor, MCS, Ampizilinresistenz eukaryotischer Expressionsvektor mit kodierender Region des eGFP unter der Kontrolle des CMV- Promotors, MCS, Ampizilin und Puromycin-Resistenz	Stratagene Heidelberg Maxeiner et al., 2003
pGEX-6P	Prokaryotischer Expressionsvektor für GST- Fusionsproteine; kodierende Region der Glutathion- S-Transferase, MCS, Ampizilin-Resistenz, Lac- Induktor	GE-Healthcare
pIRESeGFP-zeo <sup>+</sup>	Eukaryotischer Expressionsvektor mit kodierender Sequenz des eGFP unter der Kontrolle eines CMV- Promotors hinter einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES), MCS, Ampizilin und Zeozin- Resistenz	Dobrowolski et al., 2007
pCx57ret-cDNA	Retinale Cx57cDNA in pBlueskript	Dissertation S. Hombach, 2004
pMJ-Cx57-STOP	pMJ-Green, der für Cx57 kodiert	Diplomarbeit S. Latt, 2003
pMJ-Cx57-GO	pMJ-Green, der für ein Fusionsprotein aus Cx57 und eGFP kodiert	Diplomarbeit S. Latt, 2003
pKW-DTRfrtCre	ES-Zell Austauschvektor für die Herstellung der Cx57-DTRfrtCre Mauslinie	Dissertation K. Wellershaus, 2006
pKW-DTRfrtCre PCR Test	Austauschvektor mit verlängertem 5'-Homologie- bereich zur Etablierung einer PCR zum Nachweis der homologen Rekombination in Cx57-DTRfrtCre embryonalen Stammzellen	Dissertation K. Wellershaus, 2006
pGEM-T-easy- Cx23STOP	Klonierungsvektor mit kompletter kodierender Region von Cx23	Dr. G. Söhl unveröffentlicht
pBSK-Cx57-Cre	Klonierungsvektor mit kodierender Region von NLS- Cre-Rekombinase	Dissertation K. Wellershaus, 2006
pMJ-Cx36	Eukaryotischer Expressionvektor mit kodierender Region von Cx36	Dr. J. Degen unveröffentlicht
pGEX-6P	Prokaryotischer Expressionsvektor zur induzierbaren Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E.coli</i>	GE-Healthcare
pGEX-5P	Prokaryotischer Expressionsvektor zur induzierbaren Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E.coli</i>	GE-Healthcare
pCMV-SPORT6- CaMKIIa	Eukaryotischer Expressionsvektor mit der kodierenden Region der $\alpha$ -CaMKII unter der Kontrolle des CMV und T7-Promotors	RZPD, Berlin

### 2.4 Oligonukleotidstartermoleküle

Name	Sequenz	Bindestelle	PCR
UP-ES-DTR4	TGG GCA AGC AGC ACG TAG TCA ATT AGG	<i>pKW-DTRfrtCre- PCR-Test</i>	ES Cx57-DTRfrtCre
DOWN-ES-DTR4	GTG ACT CTC AAA ACG TCC AGA TCT GCC	<i>pKW-DTRfrtCre- PCR-Test</i>	ES Cx57-DTRfrtCre
UP-ES-DTR3	AAT CAG CTT TTG CAG CCA GGT CC	<i>pKW-DTRfrtCre- PCR-Test</i>	ES Cx57-DTRfrtCre
DOWN-ES-DTR3	AGG TCC AGA TCT GCC TCT TGC	<i>pKW-DTRfrtCre- PCR-Test</i>	ES Cx57-DTRfrtCre
Intron2 for	AAA CAT GGC CTG CAG ACT GG	C57-Intron 2	3'Sonden-PCR

## 2. Material

Name	Sequenz	Bindestelle	PCR
Exon3 rev	ATG GCA ACT GCT CTT GGT GC	Cx57-Exon 3	3'Sonden-PCR
Cx57for	CAA TGA GTG GTA GTG GAA GCT TAG	Cx57-Intron	Cx57GT-PCR
Cx57rev	GGC CCA TAT ACA CCA AAG AAG GG	Cx57 kodierende Region	Cx57GT-PCR
DTR-rev	CAT TCT CCG TGG ATG CAG AAG TC	DT-Rezeptor	Cx57GT-PCR DTR-RT-PCR
intCre-rev	TCC ATG AGT GAA CGA ACC TGG TCG	Cre-Rekombinase	Cx57GT-PCR bzw. Cre-JD
lacZ-rev	TTC CCA GTC ACG ACG TTG TAA AAC	lacZ kodierende Region	Cx57GT-PCR
Scal-for	GGT AAG AGC AGC AAA TAC CC	Cx57-Intron	3'Sonden Scal-PCR
Scal-rev	CTG GTT GCT CTT CTC AGT TC	Cx57-Intron	3'Sonden Scal-PCR
DTR-for	AGT TCT TTC GGC ACT GGT GAC TG	DT-Rezeptor	DTR-RT-PCR
intCre-for	TTT GCC TGC ATT ACC GGT CGA TGC	Cre-Rekombinase	<i>Cre-JD</i>
Aktin-USP	CGT GGG CCG CCC TAG GCA CCA G	Aktin-Gen	Aktin RT-PCR
Aktin-DSP	TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G	Aktin-Gen	Aktin RT-PCR
Cx57USP1	ATG GGA GAT TGG AAT TTA CTG GG	Cx57 kodierende Region	Cx57-Exon 2
Cx57DSP1	ATG GGC TGT TTT CTC CGT GTG	Cx57 kodierende Region	Cx57-Exon 2
Cx36loop-DCaMKB- for	GGG AAT TCC TTA CAG CCC AGA TGG ATG TGG	Cx36 kodierende Region	Cx36loop-DEL
Cx36CL-UP-BamHI	CGG ATC CGC CAA GCA GCG AGA ACG	Cx36 kodierende Region	Cx36loop-DEL / Cx36CT-hinten
Cx36CT-DCaMKB-for	GAT GGC GAT CGG TCT ATG AGA TAC GTA AC	Cx36 kodierende Region	Cx36CT-hinten
Cx36CT-DCaMKB-rev	CAT AGA CCG ATC GCC ATC CCA GAT GG	Cx36 kodierende Region	Cx36CT-vorne
Cx36CT-Smal-USP	TCC CCC GGG CTG AAC TTA ACC ATC TGG GAT GG	Cx36 kodierende Region	Fusion-PCR
Cx36CT-NotI-DSP	ATA AGA ATG CGG CCG CCC TTT CAC ACA TAG GCA GAG	Cx36 kodierende Region	Cx36CT-vorne / Fusion-PCR
Cx36-T111A-for	CGG GAT CCC AAT CCG CCA AGC AGC GAG AAC GCC GGT ACT CTG CAG TC	Cx36 kodierende Region	Cx36loop-PCR
Cx36loop-DSP-EcoRI	GGA ATT CCT TAG ATA CCT TCC TGT CTT CGG AG	Cx36 kodierende Region	Cx36loop-PCR
Cx23KXhol-USP	CCG CTC GAG CGG CCA CCA TGT CTC TAA ATT ACA TCA AGA AC	Cx23 kodierende Region	23Phusion-PCR Cx23 RT-PCR
Cx23-rev STOP	GGA ATT CCT CAT CGT TTA AAG AGA AAA CAT GAT C	Cx23 kodierende Region	23Phusion-PCR Cx23 RT-PCR
Cx23-rev GO	GGA ATT CCT CTT CGT TTA AAG AGA AAA CAT GAT C	Cx23 kodierende Region	23Phusion-PCR

## 2.5 Größenstandards

Standard	Fragmentgrößen
100 bp DNA-Leiter (Invitrogen)	2,0 kb; 1,5 kb-0,1 kb in 100 bp Schritten;
1 kb DNA-Leiter (Invitrogen)	12,2 kb; 11,2 kb; 10,2 kb; 9,15 kb; 8,15 kb; 7,1 kb; 6,1 kb; 5,1 kb; 4,1 kb; 3,05 kb; 2,05 kb; 1,65 kb; 1 kb; 0,5 kb; 0,4 kb; 0,34 kb; 0,3 kb; 0,22 kb; 0,2 kb; 0,15 kb; 0,13 kb; 0,08 kb
0,5-10 kb RNA-Leiter (Invitrogen)	10 kb; 8 kb; 6 kb; 4 kb; 3 kb; 2 kb; 1,5 kb; 1 kb; 0,5 kb
Precision Plus Protein Prestained Standard (Biorad)	250 kDa; 150 kDa; 100 kDa; 75 kDa; 50 kDa; 37 kDa; 25 kDa; 20 kDa; 15 kDa; 10 kDa

## 2.6 Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Einsatz	Referenz
Anti-eGFP	Huhn anti eGFP	1:2000	Immunfluoreszenz Primär	Abcam
Anti-Aktin (AC-40)	Maus anti Aktin	1:500	Immunoblot Primär	Sigma
Anti-eGFP	Kaninchen anti eGFP	1:500	Immunfluoreszenz Primär	Invitrogen (MP)
Anti-eGFP	Kaninchen anti eGFP	1:1000	Immunoblot Primär	Invitrogen
Anti-Cx53.8	Kaninchen anti Cx53.8	1:750	Immunfluoreszenz Primär	Janssen-Bienhold et al., eingereicht
Anti-Calbindin	Kaninchen anti Calbindin	1:2000	Immunfluoreszenz Primär	Swant
Anti-PKC (MC5)	Maus anti PKC	1:1000	Immunfluoreszenz Primär	DPC Biermann
Anti-CaMKII 6G9(2)	Maus anti CaMKII	1:100	Immunfluoreszenz Primär	Chemicon
Anti-Chicken	Ziege anti Huhn	1:2000	Immunfluoreszenz Sekundär	Dianova
Anti-Rabbit-Alexa488	Ziege anti Kaninchen	1:1000	Immunfluoreszenz Sekundär	MoBiTec
Anti-Mouse-Alexa488	Ziege anti Maus	1:2000	Immunfluoreszenz Sekundär	MoBiTec
Anti-Rabbit-Alexa594	Ziege anti Kaninchen	1:2000	Immunfluoreszenz Sekundär	MoBiTec
Anti-Mouse-HRP	Esel anti Maus	1:20000	Immunoblot Sekundär	Dianova
Anti-Rabbit-HRP	Ziege anti Kaninchen	1:20000	Immunoblot Sekundär	Dianova

## 2.7 Bakterienstämme

Name	Beschreibung	Referenz
XL1-blue MRF'	$\Delta(mcrA) 183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ\Delta M15 Tn 10 (Tetr)]$	Bullock et al. 1987
BL21 Rosetta	$F' ompT hsdSB (rB- mB-)gal dcm lacY1 (DE3) pLysS(CmR)$	Invitrogen

## 2.8 Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz
HeLa Wildtyp Zellen, kopplungsdefizient	Etablierte Zelllinie aus humanem Zervix-Karzinom; auf Kopplungsdefizienz selektioniert	Jones et al., 1971; Eifgang et al., 1995
Neuro-2A Zellen (N2A)	Tumorzelllinie aus einem spontanen Maustumor neuronalen Ursprungs	Olmsted et al., 1970
HM1 embryonale Stammzellen	Embryonale Stammzelllinie aus dem Mausstamm Sv129P2/OlaHSD	Magin et al., 1992

## 2.9 Mauslinien

Stamm	Beschreibung	Referenz
C57BL/6	Inzuchtstamm, Fellfarbe Schwarz, Blastozysten Spendertiere und Mausstamm für Rückkreuzungen	Charles River
NMRI	Inzuchtstamm, Albino, Weibchen als Empfängertiere für Blastozysten nach Erzeugung von Scheinschwangerschaft mithilfe vasektomierter Männchen	Charles River
Deleter-FLP	Transgene Mauslinie, welche die FLP-Rekombinase unter der Kontrolle des menschlichen $\beta$ -Aktin Promotors exprimiert	Rodriguez et al., 2000
Cx57lacZ	Transgene Mauslinie, welche die $\beta$ -Galactosidase statt Cx57 unter dem entsprechenden Promotor exprimiert	Hombach et al., 2004
ROSA26-STOP floxYFP	Transgene Mauslinie, welche eine gefloخته Stopp-Kassette vor der kodierenden Region des eYFP unter Kontrolle des ROSA26 Promotors enthält	Srinivas et al., 2001



### 3. Methoden

Grundtechniken der Molekularbiologie wie Isolation von genomischer DNA, Plasmid DNA oder RNA, die Manipulation von DNA über Restriktionsendonukleasen, Ligasen und andere Enzyme, sowie Southern- und Northernblot-Analysen mithilfe radioaktiv markierter Sonden wurden entsprechend den Angaben in der Protokollsammlung „Current Protocols im Molekular Biology“ (Ausubel et al., 1989) durchgeführt. Isolation von Plasmid DNA im größeren Maßstab wurde mithilfe des Jetstar Plasmid Midi Kits 50 (Genomed, Löhne) bzw. EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben der Hersteller durchgeführt. RNA wurde mithilfe des TRIzol®-Reagenz (Invitrogen, Carlsbad Kalifornien) isoliert und cDNA wurde mithilfe der Superskript™ reverse Transcriptase II (Invitrogen, Carlsbad Kalifornien) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Methoden zur Proteinanalytik entsprachen ebenfalls den Angaben in Ausubel et al. (1989).

#### 3.1 Erzeugung der Cx57-DTRfrtCre Mauslinie

Die Erzeugung der Cx57-DTRfrtCre Mauslinie über homologe Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen entsprach den Angaben in Theis et al., 2000. Der dabei verwendete Austauschvektor pKW-DTRfrtCre ist in der Dissertation von K. Wellershaus (2006) genau beschrieben. Die Blastozysteninjektion von Cx57-DTRfrtCre ES-Zellen wurde von Christine Siegmund durchgeführt. Die entstandenen chimären Mäuse wurden fortwährend mit C57BL/6 rückgekreuzt, so dass die Tiere für die hier beschriebenen Analysen einen gemischten Hintergrund aus C57BL/6 und Sv129P2/OlaHSD (zwischen 75 % und 87,5 % C57BL/6) darstellten. Alle Mäuse wurden in einem 12h:12h hell-dunkel Rhythmus mit unbeschränktem Zugang zu Futter und Wasser bei konstanter Temperatur von 23°C gehalten. Die durchgeführten Tierversuche entsprachen den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und wurden von der Bezirksregierung Köln genehmigt (Aktenzeichen 50.203.2-Bn 49, 2/07).

#### 3.2 Analyse der Genotypen von Cx57-DTRfrtCre ES-Zellen und Mäusen

Zur Analyse der Genotypen von veränderten embryonalen Stammzellen sowie der entstandenen Cx57-DTRfrtCre Mauslinie wurden verschiedene PCR-Analysen verwendet. Die erfolgreiche Rekombination des pKW-DTRfrtCre Austauschvektors mit dem Cx57 Locus wurde entsprechend den Angaben in der Dissertation von K. Wellershaus (2006) nachgewiesen.

Zur Unterscheidung der verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Allele von Cx57 wurde eine PCR auf Grundlage der Genotypisierungs-PCR der Cx57-lacZ Mauslinie (Dissertation S. Hombach, 2004) entwickelt. Es handelt sich dabei um eine angepasste drei-Starter PCR, bei der ein gemeinsamer Starter im 5'-Bereich von Cx57 bindet und

### 3. Methoden

jeweils ein Cx57-spezifischer, ein lacZ-spezifischer, ein DT-Rezeptor spezifischer und ein Cre-spezifischer Starter in der jeweiligen kodierenden Region eingesetzt wird.

#### Cx57GT-PCR

Reaktionsgemisch je Ansatz		PCR-Programm		
16,1 µl	H <sub>2</sub> O	94°C	5 min	1x
5 µl	5 x GO-Taq Puffer	94°C	45 sec	} 25x
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	63°C	1 min	
0,5 µl	dNTP's (2,5 mM jeweils)	72°C	1 min	
0,2 µl	Cx57-for (100 pmol/µl)	72°C	7 min	
0,1 µl	Cx57-rev (100 pmol/µl)	8°C	∞	1x
0,1 µl	lacZ-rev, DTR-rev oder intCre-rev (100 pmol/µl)			
1 µl	genomische DNA			
1 µl	GoTaq Flexi DNA Polymerase + 50 µl Mineralöl			

So entsteht für das Cx57-wt Allel ein 720 bp großes Amplikon, für Cx57-lacZ eines von 500 bp, für Cx57-DTR eines von 560 bp und für das Cx57-Cre Allel ein 980 bp Amplikon. Die Kombination der Starter für Cx57-wt, Cx57-DTR und Cx57-Cre kann man dabei in einem Ansatz verwenden, während Cx57-lacZ (vergl. Dissertation S. Hombach, 2004) separat getestet werden muss.

Zur Überprüfung der korrekten Rekombination in ES-Zellen und in der hergestellten Cx57-DTRfrtCre Mauslinie wurden verschiedene Southernblot-Analysen durchgeführt. Ausgangsmoleküle zur Herstellung von radioaktiven Sonden für Southernblot-Hybridisierungen wurden über folgende PCR-Ansätze erzeugt:

#### Cx57 3'-Sonden-PCR

Reaktionsgemisch je Ansatz		PCR-Programm		
23,7 µl	H <sub>2</sub> O	94°C	10 min	1x
25 µl	RedTaq-Mix	94°C	45 sec	} 35x
0,4 µl	Intron2-for (100 pmol/µl)	57°C	45 sec	
0,4 µl	Exon3-rev (100 pmol/µl)	72°C	1 min	
1 µl	genomische DNA	72°C	7 min	
+ 50 µl	Mineralöl	4°C	∞	1x

Ein Amplikon von 741 bp wurde zur Herstellung einer Sonde verwendet, die anschließend radioaktiv markiert wurde.

#### Cx57 3'-Sonden Scal-PCR

Reaktionsgemisch je Ansatz		PCR-Programm		
16,1 µl	H <sub>2</sub> O	94°C	10 min	1x
5 µl	5 x GO-Taq Puffer	94°C	45 sec	} 35x
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	57°C	45 sec	
1 µl	dNTP's (2,5 mM jeweils)	72°C	1 min	
0,2 µl	Scal-for (100 pmol/µl)	72°C	7 min	
0,2 µl	Scal-rev (100 pmol/µl)	8°C	∞	1x
1 µl	genomische DNA			
1 µl	GoTaq Flexi DNA Polymerase + 50 µl Mineralöl			

Ein Amplikon von 508 bp wurde zur Herstellung einer Sonde verwendet, die anschließend radioaktiv markiert wurde.

Zur Herstellung einer 5'-externen Sonde für den Cx57-Lokus wurde ein 622 bp großes *AflIII/HindIII*-Fragment aus dem Vektor *Clal*-Subklon (Dissertation S. Hombach, 2004) verwendet. Als interne Sonde diente ein 768 bp großes *XbaI/BamHI* Fragment der

kodierenden Region der Cre-Rekombinase aus pBSK-Cx57-Cre (Dissertation K. Wellershaus 2006). Die Analyse der ES-Zellklone bzw. der verschiedenen Genotypen der Maus mittels Southernblot-Hybridisierung erfolgte nach den Angaben in Ausubel et al. (1989).

#### **3.3 Behandlung von Cx57-DTR<sup>fl</sup>Cre Mäusen mit Diphtherie Toxin**

Um DT-Rezeptor exprimierende Zellen in der lebenden Maus zu ablatieren, wurden Mäuse im Alter zwischen 6 Wochen und 6 Monaten mit unterschiedlichen Dosen DT behandelt. Dazu wurde eine Ausgangslösung des Diphtherie-Toxins (Sigma-Aldrich, München) mit einer Konzentration von 1 mg/ml in sterilem PBS<sup>-</sup> hergestellt und zur Injektion in transgene Mäuse verschiedener Genotypen auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt. Von dieser Lösung wurden bei Behandlung mit 100 ng pro Injektion je 100 µl pro Tier und Tag intraperitoneal über verschiedene Zeiträume (zwischen drei und zehn Tagen) injiziert. Für eine Versuchsreihe mit einmaliger Injektion von 1 µg pro Tier wurden 100 µl einer Verdünnung von 10 µg/ml verwendet. Als Kontrolle dienten je 100 µl PBS. Die Tiere wurden im Zeitraum während und nach der Injektion beobachtet, bei Anzeichen von Krankheit getötet und anschließend verschiedene Gewebe für weitere Analysen eingesetzt. Zum Schutz bei Umgang mit dem Toxin sollten alle Beteiligten über eine aktuelle entsprechende Toxoidimpfung verfügen, welche jedoch zusammen mit Tetanus auch für Erwachsene zu den Standard-Impfungen in Deutschland zählt.

#### **3.4 Präparation und Analyse von Geweben**

Zur Analyse der Auswirkungen der DT-Behandlung wurden Tiere verschiedener Genotypen drei bis sieben Tage nach der letzten Injektion mit DT durch zervikale Dislokation getötet und die Augen entnommen. Die Analyse des gesamten Auges mittels X-Gal Färbung wurde an direkt in Tissue-Tec (Sankura Finetek, Zoeterwoude, NL) eingebetteten und bei -20 °C eingefrorenen Augen durchgeführt, von denen 20 µm dicke sagittale Schnitte angefertigt wurden. Es wurden jeweils Schnitte aller in einer Versuchsreihe verwendeten Genotypen auf einen Objektträger aufgenommen.

Bei immunologischen Untersuchungen der Retina ist eine schnelle und gründliche Fixierung wichtig. Daher wurden für diese Untersuchungen die entnommenen Augen etwa am Äquator des Auges geöffnet, so dass ein sog. Augenbecher mit dem größten Teil der Retina und dem Sehnerv in der Mitte entsteht. Dieser wurde in 4 % Paraformaldehyd in PBS (Roth, Karlsruhe) für zweimal zehn Minuten fixiert. Die Entfernung der lichtbrechenden Teile des Auges ermöglicht dabei den direkten Zugang des Fixierungsreagenzes zur Retina. Zusätzlich wurden die Augenbecher nach dreimaligem Waschen in PBS zum Schutz vor Gefrierschäden über Nacht in 30 % Succrose in PBS inkubiert. Anschließend wurden 14 µm dicke horizontale Kryoschnitte angefertigt.

Zur Gewinnung von RNA aus Mäusen verschiedener Genotypen wurde je ein Tier pro Genotyp durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die Augen entnommen, die Retina aus dem Auge heraus präpariert, von Pigmentepithel und Glaskörper befreit und die Gesamt-RNA aus der Retina isoliert.

Neben der Retina wurde zusätzlich der Thymus von verschiedenen DT behandelten Tieren untersucht. Dazu wurden Tiere unterschiedlicher Genotypen drei bis sieben Tage nach der letzten Injektion mit DT durch zervikale Dislokation getötet, der Brustkorb geöffnet und der Thymus entnommen. Zur Bestimmung des Gewichtes wurde der komplette Thymus kurz in PBS gewaschen, um Reste von Blut zu entfernen. Anschließend wurden Reste von PBS mithilfe eines Papiertuches entfernt. Das Gewicht wurde mithilfe einer Feinwaage (Kern ABS, Balingen-Frommern) bestimmt.

Histologische Analysen ( $\beta$ -Galaktosidase Nachweis, Eosin-Färbung) wurden nach den Angaben in Güldenagel et al. (2000) durchgeführt. Für Immunfluoreszenzanalysen wurden 14  $\mu$ m Retina-Kryoschnitte nach der Kryoprotektion über Nacht zunächst drei Minuten in 4 % Paraformaldehyd in PBS (Roth, Karlsruhe) nachfixiert und anschließend dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Blockierung erfolgte für ein bis zwei Stunden in 0,1 % Triton-X100, 1 % Ziegen Serum und 4 % Rinderserumalbumin (BSA) in PBS für anti-eGFP (Huhn), anti-Calbindin, anti-PKC und anti-CaMKII bzw. in 0,1 % Triton-X100 und 5 % Ziegen Serum für anti-eGFP (Kaninchen). Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C nach den Angaben in Kap. 2.6 in der jeweiligen Blockierungslösung. Anschließend wurde die Retina erneut für dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Verdünnung siehe Kap. 2.6) ebenfalls in der entsprechenden Blockierung inkubiert. Zum Abschluss wurde erneut dreimal fünf Minuten mit PBS und kurz in destilliertem Wasser gewaschen. Die Präparate wurden in PermaFluor (Beckman Coulter, Fullerton Kalifornien) konserviert und mithilfe eines Laser Scan Mikroskops (Zeiss, Göttingen) analysiert.

### 3.5 Analyse der Expression von DTR und Cre-Rekombinase in der Retina

Die Expression von DT-Rezeptor und Cre-Rekombinase wurde mithilfe von RT-PCR Analysen untersucht. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus der Retina verschiedener Tiere isoliert und in cDNA umgeschrieben, welche für folgende PCR-Analysen eingesetzt wurde:

<u>DTR RT-PCR</u>	<b>Reaktionsgemisch je Ansatz</b>	<b>PCR-Programm</b>		
	31,6 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	94°C	5 min	1x
	10 $\mu$ l 5 x GO-Taq Puffer	94°C	45 sec	} 25x
	3 $\mu$ l MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	63°C	1 min	
	2 $\mu$ l dNTP's (2,5 mM jeweils)	72°C	1 min	
	0,2 $\mu$ l DTR-for (100 pmol/ $\mu$ l)	72°C	7 min	1x
	0,2 $\mu$ l DTR-rev (100 pmol/ $\mu$ l)	8°C	$\infty$	1x
	2 $\mu$ l cDNA			
	1 $\mu$ l GoTaq Flexi DNA Polymerase + 50 $\mu$ l Mineralöl			

Diese PCR weist anhand eines 320 bp großen Amplikons die Anwesenheit des ersten Teils der kodierenden Region des DT-Rezeptors in einer cDNA-Probe nach.

Cre-JD

Reaktionsgemisch je Ansatz		PCR-Programm		
31,6 µl	H <sub>2</sub> O	94°C	5 min	1x
10 µl	5 x GO-Taq Puffer	94°C	1 min	} 40x
3 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	60°C	1 min	
2 µl	dNTP's (2,5 mM jeweils)	72°C	2 min	
0,2 µl	DTR-for (100 pmol/µl)	72°C	10 min	
0,2 µl	DTR-rev (100 pmol/µl)	8°C	∞	1x
2 µl	cDNA			
1 µl	GoTaq Flexi DNA Polymerase			
	+ 50 µl Mineralöl			

Diese PCR weist anhand eines 420 bp großen Fragmentes das Vorhandensein von cDNA der Cre-Rekombinase nach.

Aktin

RT-PCR

Reaktionsgemisch je Ansatz		PCR-Programm		
22 µl	H <sub>2</sub> O	94 °C	3 min	1x
10 µl	5 x GO-Taq Puffer	94 °C	1 min	} 10x
3 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	65 °C -1 °C/ Zyklus	1 min	
2 µl	dNTP's (2,5 mM jeweils)	72 °C	2 min	
5 µl	Aktin-USP (10 pmol/µl)	94 °C	1 min	} 25x
5 µl	Aktin-DSP (10 pmol/µl)	55 °C	1 min	
2 µl	cDNA	72 °C	2 min	} 1x
1 µl	GoTaq Flexi DNA Polymerase	72 °C	7 min	
	+ 50 µl Mineralöl	8°C	∞	

Eine Intron-überspannende PCR mit Startern spezifisch für β-Aktin wird verwendet, um die Qualität einer cDNA zu prüfen. Kontaminationen mit genomischer DNA können so ebenfalls identifiziert werden. Ein 243 bp großes Amplikon weist die cDNA von β-Aktin nach, während die genomische Sequenz aufgrund des 87 bp großen Introns im Bereich zwischen beiden Startern ein 330 bp großes Amplikon ergibt.

**3.6 Herstellung und Analyse von stabilen HeLa Transfektanten**

Die Kultur und stabile Transfektion von HeLa-Zellen mit Expressionsvektoren für Cx57eGFP, Cx23eGFP und Cx23IRESeGFP wurden nach den Angaben in Elfgang et al. (1995) durchgeführt. Die verwendeten Vektoren wurden wie folgt erzeugt:

**3.6.1 Neuklonierung von Connexin57 Expressionsvektoren**

Zur Überprüfung der bisher verwendeten Sequenz von Cx57 wurde die auf Exon 2 kodierte Sequenz von Cx57 aus genomischer DNA sowie der cDNA aus der Retina mittels der Cx57-Exon2 PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mithilfe des PCR-Purification Kits (Quiagen, Hilden) aufgereinigt und anschließend sequenziert (Agowa, Berlin). Ein Sequenzvergleich zeigte drei verschiedene Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führten (vergl. Kap. 4.2.1).

Cx57-Exon 2

Reaktionsgemisch je Ansatz		PCR-Programm		
26,5 µl	H <sub>2</sub> O	98°C	5 min	1x
10 µl	5 x Puffer HF	98°C	10 sec	} 35x
1 µl	dNTP's (2,5 mM jeweils)	55°C	30 sec	
5 µl	Cx57USP-1 (10 pmol/µl)	72°C	1 min	
5 µl	Cx57DSP-1 (10 pmol/µl)	72°C	10 min	1x
2 µl	genomische DNA	8°C	∞	1x
0,5 µl	Phusion Polymerase			
	+ 50 µl Mineralöl			

Da sich diese alle auf Exon 2 von Cx57 befanden, wurde mithilfe der Cx57-USP-1 und Cx57DSP-1 Starter (Hombach et al., 2004), welche den Großteil von Exon 2 umfassen, zunächst dieser Bereich amplifiziert. Als Grundlage diente genomische DNA aus einer C57BL/6 Maus. Über die in diesem Amplikon gelegenen *Bgl*II Erkennungsstellen und entsprechende Erkennungsstellen in einem bereits vorhandenen Cx57-cDNA Vektor (Abb. 4.23 D, Dissertation S. Hombach, 2004) wurde der dazwischen liegende Bereich (1121 bp) ausgetauscht (vergl. pCx57cDNA-neu im Anhang). Die komplette Cx57cDNA Sequenz wurde anschließend erneut sequenziert (Agowa, Berlin), und es wurden keine Abweichungen von der als korrekt identifizierten Sequenz gefunden. Über *Eco*RI kann man den pCx57cDNA-neu Vektor so spalten, dass der Großteil der Cx57-Sequenz in dem entstandenen Fragment (1045 bp) enthalten ist. Dieses Fragment wurde in den bereits vorhandenen pMJ-Cx57GO und pMJ-Cx57STOP (Diplomarbeit S. Latt, 2003) Vektoren über dort ebenfalls vorhandene *Eco*RI-Erkennungsstellen ausgetauscht und damit die Mutationen behoben.

Um für stabile Transfektanten von Cx57 ohne C-terminale eGFP-Markierung die Analyse der Klone nach der Transfektion zu erleichtern, wurde zusätzlich der Vektor pM-Cx57IRESeGFP hergestellt. Dazu wurde ein 1,4 kb *Eco*RI/*Not*I Fragment aus pIRESeGFP-Zeo (Dobrowolski et al., 2007) mit aufgefülltem Überhang von *Eco*RI in den über *Bam*HI (ebenfalls aufgefüllt) und *Not*I geöffneten Vektor pMJ-Cx57STOPneu (6,9 kb Fragment ohne eGFP) eingefügt. Das so erlangte Konstrukt pMJ-Cx57IRESeGFP (Vektorkarten siehe Anhang) ermöglicht über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES-Sequenz) den Translationstart von Cx57 und eGFP von derselben mRNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Attal et al., 1999).

**3.6.2 Klonierung von Cx23-Expressionsvektoren**

Zunächst wurde die cDNA-Sequenz für Cx23 mittels der Startermoleküle Cx23KXho-USP und Cx23-revGO bzw. Cx23-revSTOP auf Grundlage genomischer Maus-DNA amplifiziert. Diese Starter enthalten neben den Sequenz-spezifischen Bereichen zusätzlich an ihren Enden die Erkennungsstellen für die Restriktionsendonuklease *Xho*I für den vorwärts gerichteten Starter und *Eco*RI für den rückwärts gerichteten Starter. Zur verbesserten Initiation der Translation enthielt der vordere Starter zusätzlich zwischen der Erkennungsstelle für *Xho*I und dem Startkodon von Cx23 eine optimierte *Kozak*-

Konsensussequenz (Iida und Masuda, 1996). Zur Transfektion von HeLa-Zellen wurden zwei unterschiedliche Vektoren hergestellt. Einer kodiert für ein Fusionsprotein aus Cx23 und eGFP. Zur Erzeugung dieses Fusionsproteins wurde im rückwärts gerichteten Starter für die Cx23 cDNA das Stoppkodon deletiert (Cx23-revGO).

23Phusion-PCR

Reaktionsgemisch je Ansatz		PCR-Programm		
14,4 µl	H <sub>2</sub> O	98°C	5 min	1x
5 µl	5 x Puffer HF	98°C	10 sec	} 35x
1 µl	dNTP's (2,5 mM jeweils)	57°C	20 sec	
2 µl	Cx23-rev-GO (10 pmol/µl)	72°C	20 sec	
2 µl	Cx23KXhoI-USP (10 pmol/µl)	72°C	10 min	1x
0,1 µl	genomische DNA	8°C	∞	1x
0,5 µl	Phusion Polymerase			
	+ 50 µl Mineralöl			

Dieses Amplicon (620 bp) wurde über die entsprechenden Restriktionsendonukleasen in pMJ-Green (Maxeiner et al., 2003) eingefügt, wodurch der Vektor pMJ-Cx23eGFP entstand. Zusätzlich wurde ein Vektor hergestellt, welcher für Cx23wt gefolgt von einer IRES Sequenz und eGFP kodiert. Wie für Cx57 bereits beschrieben, ermöglicht die IRES Sequenz die Translation von Cx23 und eGFP von einer gemeinsamen mRNA. Zur Herstellung des pMJ-Cx23IRESeGFP Vektors wurde eine Zwei-Insert Ligation verwendet, bei der ein 620 bp großes *EcoRI/XhoI* Fragment von pGEM-T-easy-Cx23STOP (Dr. G. Söhl, unveröffentlicht), ein 1,4 kb *EcoRI/NotI* Fragment mit der IRES-eGFP aus p-IRESeGFPzeo<sup>+</sup> (Dobrowolski et al., 2007) in den mit *XhoI/NotI* geöffneten Vektor pMJ-Green (Maxeiner et al., 2003) (5,4 kb) eingefügt wurden. Alle Fragmente ergaben zusammen den Vektor pMJ-Cx23IRESeGFP (Vektorkarte siehe Anhang).

**3.6.3 Analyse stabiler HeLa-Transfektanten**

Der Nachweis der Cx57 mRNA erfolgte über eine Northernblot-Analyse (vergl. Ausubel et al., 1989) mit einer Sonde spezifisch für die Cx57 kodierende Region. Dazu wurde ein 777 bp großes *BglII/XhoI* Fragment aus pCx57cDNA-neu verwendet. Der Nachweis der Cx23 mRNA erfolgte mithilfe einer 620 bp großen Sonde aus pGEM-T-easy-Cx23-STOP (Dr. G. Söhl, unveröffentlicht). Zur Analyse der Cx57 bzw. Cx23 eGFP-Fusionsproteine wurde eine Immunoblot-Analyse mithilfe eGFP spezifischer Antikörper (vergl. Kap. 2.6) durchgeführt. Die Kopplung zwischen stabil Cx57 bzw. Cx23 exprimierenden HeLa-Zelllinien wurde durch die Mikroinjektion verschiedener Farbstoffe sowie Neurobiotin wie in Manthey et al. (1999) beschrieben analysiert. Der Nachweis von Neurobiotin erfolgte dabei einmal mittels Diaminobenzidin (vergl. Manthey et al., 1999) zum anderen mithilfe des Histogreen-Kit (Linaris, Wertheim-Bettingen).

**3.7 Klonierung verschiedener GST-Cx36 Fusionsproteine**

Zur Expression eines Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteins von Cx36-zytoplasmatischer Schleife (Cx36CL) mit einer Mutation von Threonin111 zu Alanin

wurde ein entsprechender Vektor für die induzierbare Überexpression in *E.coli* hergestellt. Dabei wurde die T111A Mutation über einen entsprechenden vorwärts gerichteten Starter (Cx36-T111A) eingebracht.

Cx36-loop-PCR

Reaktionsgemisch je Ansatz	PCR-Programm		
18 µl H <sub>2</sub> O	94°C	10 min	1x
2 µl Cx36loop-DSP-EcoRI (10 pmol/µl)	94°C	45 sec	} 35x
2 µl Cx36T111A-for (10 pmol/µl)	62°C	45 sec	
1 µl pMJ-Cx36 (1 ng/µl)	72°C	45 sec	
25 µl RedTaq-Mix	72°C	10 min	1x
	8°C	∞	1x

Zusammen mit einem unveränderten rückwärtigen Starter spezifisch für Cx36 zytoplasmatische Schleife mit Stopp-Kodon (Cx36loop-DSP-EcoRI) wurde so ein 285 bp großes PCR-Fragment der zytoplasmatischen Schleife von Cx36 auf Grundlage von pMJ-Cx36 (Dr. J. Degen, unveröffentlicht) synthetisiert. Mithilfe der über die Starter eingebrachten Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* wurde das PCR-Produkt gespalten und in den ebenso behandelten Vektor pGEX-6P (GE Healthcare, Freiburg) eingefügt. Die Richtigkeit der Sequenz des entstanden Produktes wurde mittels Sequenzierung (Agowa, Berlin) bestätigt.

Ein Vektor zur Expression eines GST-Fusionsproteins von Cx36 C-Terminus mit einer Deletion der CaMKII-Bindestelle wurde mithilfe einer „Overlap-Extension“-PCR hergestellt. Dazu wurde in einem ersten Schritt die gesamte Cx36 Sequenz zwischen dem Beginn der zytoplasmatischen Schleife und dem Bereich hinter der Deletion über die Starter Cx36CL-USP und Cx36CT-DCaMKB-rev auf Grundlage von pMJ-Cx36 (Dr. J. Degen, unveröffentlicht) amplifiziert (430 bp). Der zu deletierende Bereich fehlte dabei im rückwärtigen Starter.

Cx36CT-vorne

Reaktionsgemisch je Ansatz	PCR-Programm		
12 µl H <sub>2</sub> O	94°C	10 min	1x
5 µl Cx36CT-DCaMKB-rev (10 pmol/µl)	94°C	45 sec	} 35x
5 µl Cx36CL-USP (10 pmol/µl)	50°C	45 sec	
1 µl pMJ-Cx36 (1 ng/µl)	72°C	45 sec	
25 µl RedTaq-Mix	72°C	10 min	1x
	8°C	∞	1x

Der hinter der zu deletierenden Region gelegene Teil des Cx36 C-Terminus wurde über die Starter Cx36CTDCaMKB-for und Cx36CT-DSP amplifiziert (100 bp), wobei etwa 15 bp der Sequenz direkt vor dem zu deletierenden Bereich im vorderen Starter enthalten waren.

Cx36CT-hinten

Reaktionsgemisch je Ansatz	PCR-Programm		
12 µl H <sub>2</sub> O	94°C	10 min	1x
5 µl Cx36CT-DCaMKB-for (10 pmol/µl)	94°C	45 sec	} 35x
5 µl Cx36CT-DSP (10 pmol/µl)	55°C	45 sec	
1 µl pMJ-Cx36 (1 ng/µl)	72°C	45 sec	
25 µl RedTaq-Mix	72°C	10 min	1x
	8°C	∞	1x



### 3. Methoden

Beide Produkte wurden anschließend mittels „PCR-Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und zusammen mit den Startern Cx36CT-USP und Cx36CT-DSP in einen Ansatz zur Fusions-PCR gegeben. Dabei lagern sich die gemeinsamen Abschnitte, die in beiden PCR-Produkten enthalten sind, aneinander an (Overlap) und werden von der Polymerase jeweils bis zum Beginn bzw. Ende der Sequenz verlängert (Extension). Über die beiden außen ansetzenden Starter wird in weiteren Zyklen die komplette Sequenz amplifiziert. Auf diese Art und Weise ist es möglich eine Veränderung in der Mitte einer PCR-amplifizierten Sequenz einzubringen.

#### Fusions-PCR

Reaktionsgemisch je Ansatz		PCR-Programm		
6,5 µl	H <sub>2</sub> O	98°C	30 sec	1x
5 µl	5xPhusion HF	98°C	10 sec	} 35x
1 µl	dNTP's (2,5 mM jeweils)	52°C	20 sec	
5 µl	Cx36CT-DSP (10 pmol/µl)	72°C	15 sec	
5 µl	Cx36CT-USP (10 pmol/µl)	72°C	10 min	
1 µl	Produkt 1	8°C	∞	1x
1 µl	Produkt 2			
0,5 µl	Phusion-Taq			

Das Produkt der Fusions-PCR (125 bp) wurde anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *Sma*I und *Not*I gespalten und über entsprechende Stellen in den Vektor pGEX-5P (GE Healthcare, Freiburg) eingefügt. Auch dieser wurden anschließend durch Sequenzierung (Agowa, Berlin) auf seine Richtigkeit hin überprüft.

Zur Klonierung eines entsprechenden GST-Fusionsproteins der zytoplasmatischen Schleife von Cx36 mit einer Deletion der Bindedomäne für die CaMKII konnte dagegen die mutierte Cx36-Sequenz direkt in einer PCR-Reaktion erzeugt werden, da der zu deletierende Bereich direkt am Ende der Cx36 zytoplasmatischen Schleife liegt. So wurde ein rückwärts gerichteter Starter (Cx36loopDCaMKB-rev) verwendet, welcher 60 bp vor Ende der zytoplasmatischen Schleife bindet und ein Stopp-Kodon an die entsprechende Stelle einführt. Zusammen mit dem Starter Cx36loop-UP-BamHI, spezifisch für den Beginn der zytoplasmatischen Schleife, wurde so auf Grundlage von pMJ-Cx36 (Dr. J. Degen, unveröffentlicht) eine 256 bp große Sequenz amplifiziert.

#### Cx36-loop-DEL

Reaktionsgemisch je Ansatz		PCR-Programm		
20 µl	H <sub>2</sub> O	94°C	10 min	1x
2 µl	Cx36loop-DCaMKB-for (10 pmol/µl)	94°C	45 sec	} 35x
2 µl	Cx36CT-DSP (10 pmol/µl)	56°C	45 sec	
1 µl	pMJ-Cx36	72°C	45 sec	
25 µl	RedTaq-Mix	72°C	10 min	
		8°C	∞	1x

Mithilfe der Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI im PCR-Produkt sowie im Vektor pGEX-6P (GE Healthcare, Freiburg) wurde das Fragment der verkürzten Cx36 zytoplasmatischen Schleife in den Vektor eingefügt. Auch dieser wurde anschließend durch Sequenzierung (AGOWA, Berlin) überprüft.

#### 3.8 *in vitro* Bindeexperimente

Um die Bindung zweier Proteine zueinander zu untersuchen, kann eines der Proteine immobilisiert werden. In dieser Arbeit wurde dies mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen für unterschiedliche Domänen von Cx36 erreicht, die über ihren GST-Anteil an Glutathion gebunden werden, welches wiederum an Agarose gebunden ist. Das zweite Protein wird über *in vitro*-Translation mit radioaktiv markiertem Methionin ( $[^{35}\text{S}]$ -Methionin; GE Healthcare, Freiburg) markiert und anschließend mit dem immobilisierten Protein inkubiert. Nach Abwaschen ungebundener Proteine kann das gebundene Protein über Detergenzien eluiert und nach diskontinuierlicher SDS-PAGE über Autoradiographie nachgewiesen werden.

Zur *in vitro*-Translation wurde in dieser Arbeit das „TNT T7 quick transcription-translation kit“ (Promega, Madison Wisconsin, USA) und der Vektor pCMV-SPORT6-CaMKII (RZPD, Berlin), der für die CaMKII unter der Kontrolle eines T7-Promotor kodiert, nach Angaben des Herstellers verwendet. GST-Fusionsproteine von Cx36 zytoplasmatischer Schleife (Cx36CL) und C-Terminus (Cx36CT) wurden zuvor mithilfe des Expressionsvektors pGEX-6P in einem für bestimmte Proteasen defizienten Bakterienstamm (*E. coli* BL21 Rosetta) nach Induktion mit 1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid (IPTG) für drei Stunden exprimiert. Nach Lyse der Bakterien wurden mittels Affinitätsaufreinigung über GST-Trap<sup>TM</sup>-FF Säulen (GE Healthcare, Freiburg) die verschiedenen GST-Fusionsproteine aufgereinigt. Für ein Bindeexperiment wurden 50  $\mu\text{g}$  dieser Fusionsproteine an jeweils 30  $\mu\text{l}$  Glutathion-Agarose Beads (Pierce, Rockford Illinois, USA) immobilisiert und zweimal mit PBS<sup>+</sup> mit 1 % Rinderserumalbumin (BSA) und 1 % Fischgelatine (FG) sowie einmal mit PBS<sup>-</sup> mit 1 % BSA und 1 % FG gewaschen. Die gebundenen Fusionsproteine wurden anschließend mit je 2  $\mu\text{l}$  des Translationsansatzes der CaMKII in CaMKII-Puffer (NEB, Ipswich, Massachusetts, USA) ohne Calcium und Calmodulin, mit Calcium sowie mit Calcium und Calmodulin inkubiert. Um die CaMKII zuvor durch Autophosphorylierung zu aktivieren, wurde der Ansatz in einigen Fällen in Gegenwart von 150  $\mu\text{M}$  ATP für 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die eigentliche Bindung der CaMKII an Cx36 erfolgte für zwei Stunden bei 4°C unter ständigem Invertieren (Sonnenrad) in Gegenwart von 1 % BSA und 1 % FG. Nach dem Binden wurden die Agarosebeads mit entsprechenden CaMKII-Pufferansätzen (mit und ohne Calcium und Calmodulin) auf Eis gewaschen und schließlich mithilfe des Lämmli-Probenpuffers von den Agarose-Beads bei 65 °C für 10 Minuten eluiert. Mittels SDS-PAGE wurden die gebundenen Proteine nach Größe aufgetrennt, das Gel anschließend mit 50 % Methanol, 20 % Essigsäure in Wasser fixiert, mit einer Verstärkungslösung behandelt (Amplify Solution, GE Healthcare, Freiburg) und schließlich getrocknet. Über Autoradiographie wurde jeweils die gebundene CaMKII nachgewiesen.

### 3.9 *in vitro* Phosphorylierung

Zur Phosphorylierung von Cx36CT und Cx36CL *in vitro* wurden jeweils 50 µg der GST-Fusionsproteine auf 30 µl Glutathion-Agarosebeads (Pierce, Rockford Illinois, USA) immobilisiert und viermal mit PBS<sup>-</sup> mit 1% BSA und 1% FG gewaschen. Anschließend wurden 150 U CaMKII (NEB, Ipswich, Massachusetts, USA) im entsprechenden Puffer mit Calcium bzw. mit Calcium und Calmodulin nach Angaben des Herstellers auf die immobilisierten Fusionsproteine gegeben. Zur Autoaktivierung der CaMKII wurde zu einem Teil der Ansätze 150 µM ATP zugegeben und für 15 Minuten bei 30 °C inkubiert. Ansätze ohne Autoaktivierung wurden ebenfalls für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert, ATP jedoch erst nach den 15 Minuten zugegeben. Die Phosphorylierung erfolgte anschließend bei 30 °C für 30 Minuten in Gegenwart von  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (GE Healthcare, Freiburg). Zur Inhibition der Interaktion von CaMKII mit Cx36 wurden in einigen Ansätzen 100 µg von Peptiden der korrespondierenden Binde- und Phosphorylierungsstellen zugegeben (zur Verfügung gestellt von Prof. D. Spray, New York). Die Beads wurden nach der Phosphorylierung fünfmal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, die gebundenen Proteine mittels Lämmli-Probenpuffer für 10 min bei 65 °C eluiert und über SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

### 3.10 Analyse der Cx23 Expression

Zur Analyse der Cx23 Expression in der Entwicklung der Maus wurden an Tag 10.5, 11.5 und 12.5 der Embryonalentwicklung jeweils die Embryonen aus einer schwangeren Maus entnommen, die zuvor durch zervikale Dislokation getötet wurde. Aus diesen wurde die Gesamt-RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und zur RT-PCR Analyse der Cx23 Expression in folgende PCR-Reaktion eingesetzt:

#### Cx23RT-PCR

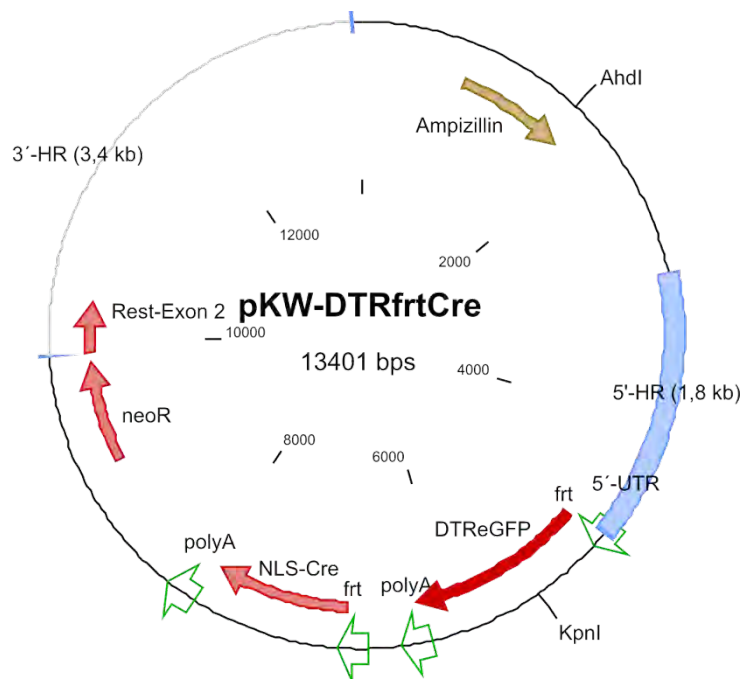
Reaktionsgemisch je Ansatz		PCR-Programm		
29,5 µl	H <sub>2</sub> O	94°C	5 min	1x
10 µl	5 x GO-Taq Puffer	94°C	30 sec	} 35x
2,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	60°C	45 sec	
2 µl	dNTP's (2,5 mM jeweils)	72°C	1 min	
2 µl	Cx23KXhol-USP (10 pmol/µl)	72°C	10 min	1x
2 µl	Cx23-rev-STOP (10 pmol/µl)	8°C	∞	1x
1 µl	cDNA			
1 µl	GoTaq Flexi DNA Polymerase			
+ 50 µl Mineralöl				

Über ein 620 bp großes Amplikon wurde die Anwesenheit der Cx23 cDNA nachgewiesen. Zur Überprüfung der Qualität der verwendeten cDNA wurde eine Aktin-spezifische RT-PCR verwendet (Kap. 3.5).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Erzeugung und Analyse einer Connexin57-DTRfrtCre Mauslinie

Zur genaueren Untersuchung der Funktion von Horizontalzellen in der Retina wurde in dieser Arbeit eine Mauslinie erzeugt, mit deren Hilfe entweder eine Expression des menschlichen Diphtherie Toxin-Rezeptors (DT-Rezeptor) als Fusionsprotein mit dem verstärkt grün fluoreszierenden Protein (eGFP) oder der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Promotors von Connexin57 (Cx57) in Horizontalzellen ermöglicht werden soll. Über den DT-Rezeptor sollen in diesen Tieren durch Injektion des Diphtherie Toxins (DT) gezielt die Zellen ablatiert werden, in denen der Cx57-Promotor aktiv ist. Dies ist in der adulten Maus neben den Horizontalzellen nur in einem noch nicht genauer beschriebenen, seltenen Zelltyp im Thymus der Fall (Hombach et al., 2004). Die Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Cx57-Promotors soll dazu genutzt werden, mithilfe von loxP Stellen gezielt Gene in Horizontalzellen auszuschalten.



**Abbildung 4.1: Der Austauschvektor pKW-DTRfrtCre.** Der Vektor enthält die von frt-Stellen umgebene kodierende Region des DT-Rezeptors als Fusionsprotein mit dem grün fluoreszierenden Protein (eGFP), gefolgt von einem Polyadenylierungssignal (polyA) und der kodierenden Region der Cre-Rekombinase (NLS-Cre), ebenfalls mit einem polyA-Signal. Umgeben sind diese von homologen Bereichen 3' (3'-HR) und 5' (5'-HR) des ausgetauschten Bereichs im Cx57-Gen (ca. 1 kb), welche den 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) sowie einen Rest von Exon2 (Rest-Exon 2) enthalten. Zur Selektion von transfizierten murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) ist eine Neomycin-Resistenzkassette (neoR) enthalten.

#### **4.1.1 Herstellung einer murinen embryonalen Cx57-DTRfrtCre Stammzelllinie**

In Vorarbeiten wurde von Dr. K. Wellershaus ein Austauschvektor zur homologen Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen hergestellt (pKW-DTRfrtCre; siehe Abb. 4.1). In diesem Vektor (genauer beschrieben in: Dissertation K. Wellershaus, 2006) wurde ca. 1 kb der kodierenden Region von Cx57 auf Exon 2 gegen die zwei einzubringenden Gene ausgetauscht. Dies ist ein Fusionsprotein aus dem menschlichen DT-Rezeptor und eGFP (DTReGFP), welches so eingefügt wurde, dass das Start-Kodon des DTReGFP genau das von Cx57 ersetzt. Dies ermöglicht die Expression des DT-Rezeptors unter der Kontrolle des Cx57-Promotors. Die kodierende Region des DTReGFP ist gefolgt von einem Polyadenylierungssignal (polyA) und umgeben von frt-Stellen, den Erkennungssequenzen für die Flp-Rekombinase.

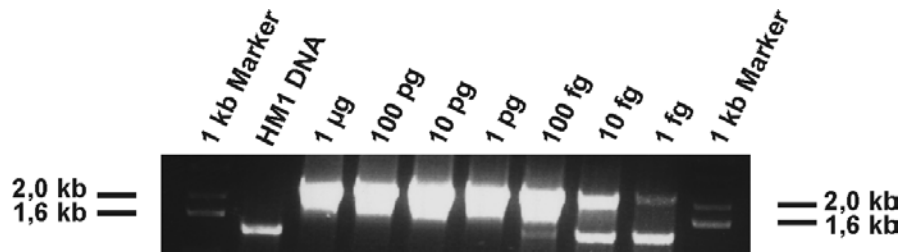
Es folgt hinter der 3' frt-Stelle ein Teil des 5'-untranslatierten Bereichs von Cx57 mit der kodierenden Region der kernlokalisierten Cre-Rekombinase (NLS-Cre), deren Start-Kodon dort ebenfalls genau das von Cx57 ersetzt. Dadurch steht nach Entfernen des DT-Rezeptors über eine Flp-Rekombinase die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Cx57-Promotors. Für die homologe Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) enthält der Vektor einen 3,4 kb großen 3'-Homologie-Bereich sowie einen mit 1,8 kb deutlich kürzeren 5'-Homologie-Bereich. Zur Selektion homolog rekombinierter ES-Zellen dient eine Neomycin-Resistenzkassette (neoR), welche unter der Kontrolle des Promotors der ubiquitär exprimierten Phosphoglycerat-Kinase steht (vergl. Abb. 4.1).

Dieses Konstrukt wurde in enger Anlehnung an den Cx57-lacZ Austauschvektor (pCx57-KO) hergestellt, aus dem die Cx57-lacZ Mauslinie hervorgegangen ist (Hombach et al., 2004), um eine möglichst hohe Übereinstimmung der Expression des DT-Rezeptors bzw. der Cre-Rekombinase mit der Expression des lacZ-Reporter Gens in der Cx57-lacZ Mauslinie zu erreichen.

##### **4.1.1.1 Etablierung einer Test-PCR zum Nachweis homolog rekombinierter Cx57-DTRfrtCre embryonaler Stammzellen**

Zum Nachweis der homologen Rekombination des Austauschvektors pKW-DTRfrtCre in den Cx57-Lokus des Genoms von embryonalen Stammzellen der Maus wurde eine PCR verwendet, die über Oligonukleotidstartermoleküle (kurz Starter) spezifisch für die kodierende Region des DT-Rezeptors und den nicht mehr im Austauschvektor enthaltenen 5'-Bereich des Cx57-Lokus die erfolgreiche homologe Rekombination nachweist. Hierzu wurde mithilfe des PCR-Testvektors pKW-DTRfrtCre PCR-Test (Dissertation K. Wellershaus 2006), der einen im Vergleich zum Austauschvektor verlängerten 5'-Bereich enthält, und verschiedenen Starterkombinationen eine PCR ausgetestet. Eine Kombination der Starter UP-ES-DTR4 und DOWN-ES-DTR4 stellte sich als am besten geeignet heraus, die homologe Rekombination im 5'-Bereich des

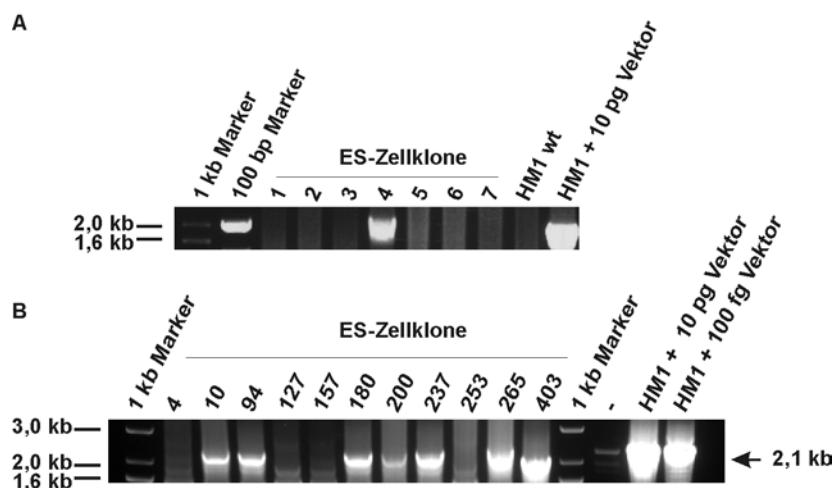
Cx57-Lokus nachzuweisen. Die Kombination der ES-DTR3 Starter kann ebenfalls verwendet werden (nicht gezeigt). Beide Starterkombinationen ergeben im Fall einer korrekten homologen Rekombination im 5'-Bereich des Cx57-Lokus ein Amplikon von ca. 2,1 kb. Eine PCR mit ES-DTR4-Startern konnte eine Konzentration von bis zu 1 fg des PCR-Testvektors in einer Probe mit genomischer DNA aus ES-Zellen nachweisen (siehe Abb. 4.2) und wurde daher zur Analyse der transfizierten ES-Zellklone verwendet.



**Abbildung 4.2: Test-PCR für die Analyse rekombinierter ES-Zellen.** Mit den verwendeten DTR4-Startern wird ein 2,1 kb großer Bereich zwischen dem DT-Rezeptor und dem 5'-Bereich von Cx57 aus dem Vektor pKW-DTRfrtCre PCR-Test in einer Probe mit genomischer DNA amplifiziert. Dieser kann bis zu einer Konzentration von 1 fg nachgewiesen werden.

#### 4.1.1.2 Elektroporation und Analyse der entstandenen ES-Zellklone

Der Vektor pKW-DTRfrtCre wurde nach Linearisierung über die Restriktionsendonuklease *AhdI* zur Elektroporation von murinen embryonalen Stammzellen der Linie HM1 (Magin et al., 1992) mit der Passagenzahl 19 verwendet. Nach achttägiger Selektion der transfizierten Stammzellen in Gentamycin418 (G418) haltigem Medium wurden aus weit über 1000 Klonen etwa 450 isoliert, von denen ca. 200 über PCR analysiert wurden. Abbildung 4.3 A zeigt als Beispiel das Ergebnis der Test-PCR mit DTR4 Startern für die ersten sieben analysierten Klone.



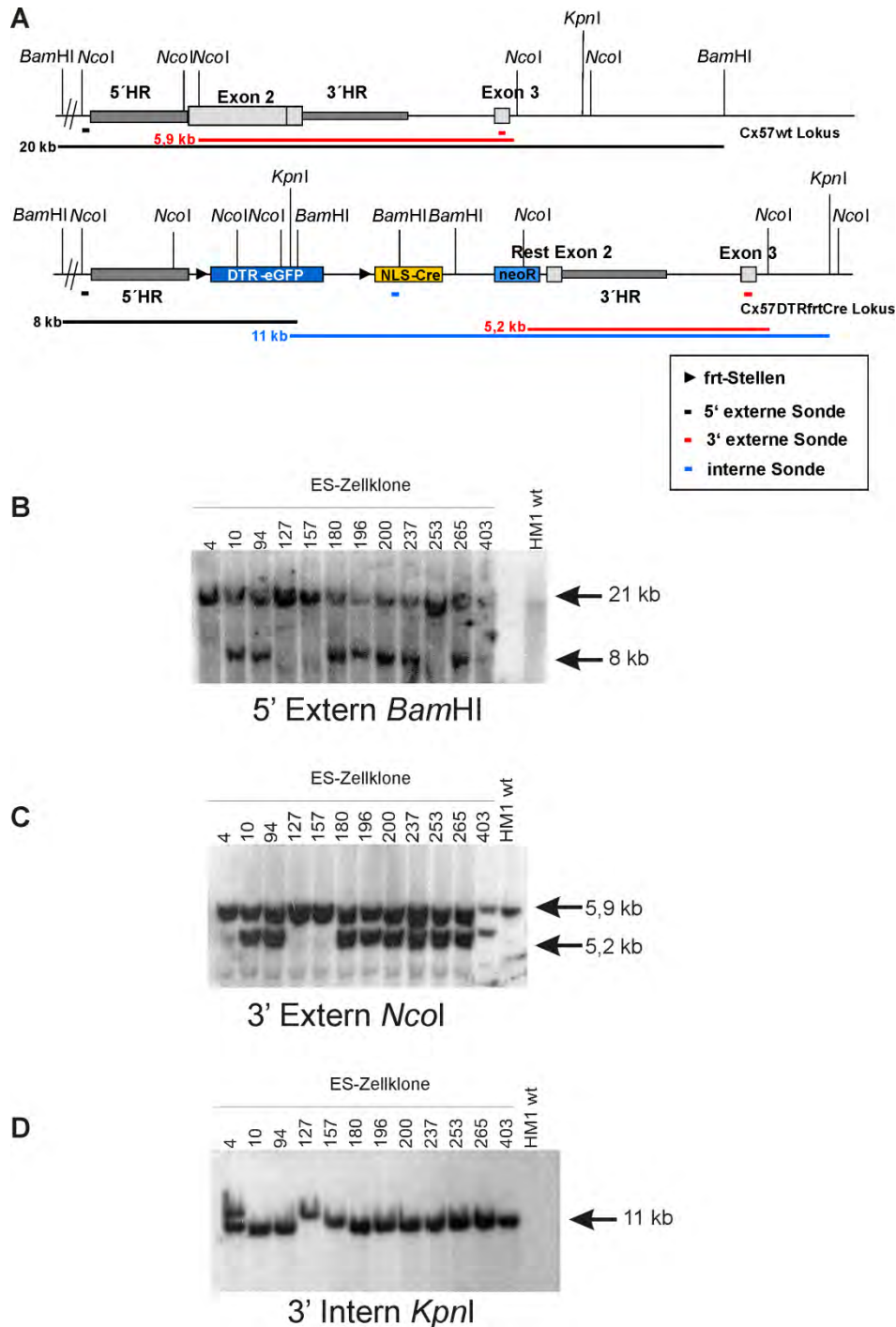
**Abbildung 4.3: PCR Analysen von pKW-DTRfrtCre transfizierten ES-Zellklonen.** Anhand von genomischer DNA verschiedener ES-Zellklone wurde mittels zweier Starterkombination jeweils spezifisch für einen Bereich vor der 5'-Homologie sowie einer Sequenz im DT-Rezeptor (ES-DTR4 bzw. ES-DTR3) in einer PCR-Analyse die homologe Rekombination in diesem Bereich nachgewiesen. Als Positivkontrolle diente der Vektor pKW-DTRfrtCre PCR-Test. **(A)** Unter den ersten sieben untersuchten Klonen zeigte Klon 4 das erwartete Amplikon von 2,1 kb (ES-DTR4 Starter). **(B)** Elf der in der ersten PCR positiven Klone wurden zusätzlich mit einer anderen Starterkombination (ES-DTR3) getestet. Die korrekte Rekombination konnte für sieben Klone bestätigt werden.

Wie am Beispiel von Klon 4 gezeigt, deutet ein Amplikon von 2,1 kb, auf eine erfolgreiche Rekombination hin. Die Analyse aller 200 getesteten Klone lieferte mit dieser Starterkombination insgesamt zwölf PCR-positive Klone. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde zusätzlich eine Test-PCR mit DTR3-Startermolekülen an elf der vorher positiv getesteten Klone durchgeführt (Abb. 4.3 B). Hierin wurde die erfolgreiche homologe Rekombination für sieben Klone bestätigt.

Von allen zwölf in der ersten PCR-Analyse positiven ES-Zellklonen wurde genomische DNA für verschiedene Southernblot-Analysen eingesetzt. Über Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI und Hybridisierung mit einer externen Sonde aus dem 5'-Bereich des Cx57-Lokus wurde die korrekte Rekombination in diesem Bereich untersucht, mithilfe der Restriktionsendonuklease *Nco*I und einer 3'-externen Sonde die Rekombination im 3'-Bereich. Durch Restriktionsspaltung mit *Kpn*I und einen Nachweis mit einer Cre-spezifischen Sonde sollte eine mehrfache Integration des Austauschvektors in das Genom der ES-Zellen ausgeschlossen werden.

Wie in Abbildung 4.4 zu sehen, zeigten die Analysen bei acht Klonen die erwarteten Bandengrößen. Dies entspricht einem Anteil von etwa 4 % der rund 200 analysierten G418-resistenten Klone.

## 4. Ergebnisse



**Abbildung 4.4: Southernblot-Analyse zum Nachweis der korrekten homologen Rekombination des Austauschvektors pKW-DTRfrtCre in den Cx57-Lokus der ES-Zellenklone.** (A) zeigt schematisch die Lage der Restriktionsschnittstellen und Sonden für den wildtyp und den homolog rekombinierten Cx57-Lokus. Zum Nachweis der korrekten Rekombination des Austauschvektors mit dem genomischen Bereich von Connexin57 wurden drei verschiedene Southernblot-Analysen verwendet. Durch *Bam*HI-Spaltung und Hybridisierung mit einer externen Sonde im 5'-Bereich von Cx57 konnte über ein 8 kb großes Fragment die korrekte Insertion in diesem Bereich nachgewiesen werden (B). Im 3'-Bereich erfolgte dies mithilfe einer *Nco*I Restriktionsspaltung und einer Sonde komplementär zu Exon 3 von Cx57. Die korrekte Insertion zeigt ein Signal bei 5,2 kb (C). Um eine mehrfache Insertion des Austauschvektors im Genom auszuschließen, wurden eine *Kpn*I Restriktionsspaltung und ein Nachweis mit einer Sonde gegen die Cre-Rekombinase durchgeführt, was eine Bande von 11 kb ergibt (D). Acht der zwölf analysierten Klone zeigten die erwarteten Größen. Klone Nr. 4, 127 und 157 sind weder im 5'- noch im 3'-Bereich korrekt rekombiniert. Bei Klon 4 handelt es sich zusätzlich um eine mehrfache Integration in das Genom des ES-Zellklons (D). Klon 253 ist im 3'-, jedoch nicht im 5'-Bereich korrekt integriert.



Nach der Analyse der Genotypen wurden sieben ES-Zellklone, die sowohl in der PCR als auch in allen Southernblot-Analysen als korrekt rekombiniert identifiziert wurden, einer Karyotypanalyse unterzogen. Drei Klone (Klon 10, Klon 196 und Klon 200) zeigten die korrekte Anzahl von 40 akrozentrischen Chromosomen in mehr als 75 % der untersuchten Zellen (vergl. Tab. 4.1). Diese wurden zur Blastozysteninjektion weiterverwendet.

Klon	Anteil ES-Zellen mit korrektem Karyotypen
10	80 %
94	70 %
180	50 %
196	75 %
200	80 %
237	50 %
265	30 %

**Tabelle 4.1: Karyotypen der korrekt homolog rekombinierten Cx57-DTRfrtCre ES-Zellklone.** Für sieben verschiedene Klone ist der Anteil an korrekten Karyotypen mit 40 akrozentrischen Chromosomen angegeben. Klon 10, 196 und 200 wurden im Folgenden für die Erzeugung einer transgenen Mauslinie mittels Blastozysteninjektion verwendet.

### 4.1.2 Erzeugung einer Cx57-DTRfrtCre Mauslinie



**Abbildung 4.5: Chimären nach der Blastozysteninjektion von Cx57-DTRfrtCre ES-Zellen.** Es wurden vier männliche und eine weibliche Chimäre geboren, die alle einen hohen Grad an Chimarismus aufwiesen.

Aus der Blastozysteninjektion von Klon 10 gingen fünf hochchimäre Tiere hervor (Abb. 4.5), während die Injektion der Klone 196 und 200 keine Chimären ergab. Diese fünf Chimären wurden mit C57BL/6 Tieren verpaart, und drei zeugten agouti-farbenen Nachwuchs, was die Keimbahntransmission der ES-Zellen demonstriert.

### 4.1.3 Analyse der Cx57-DTRfrtCre Mauslinie

#### 4.1.3.1 Bestimmung der verschiedenen Genotypen mittels PCR Analyse

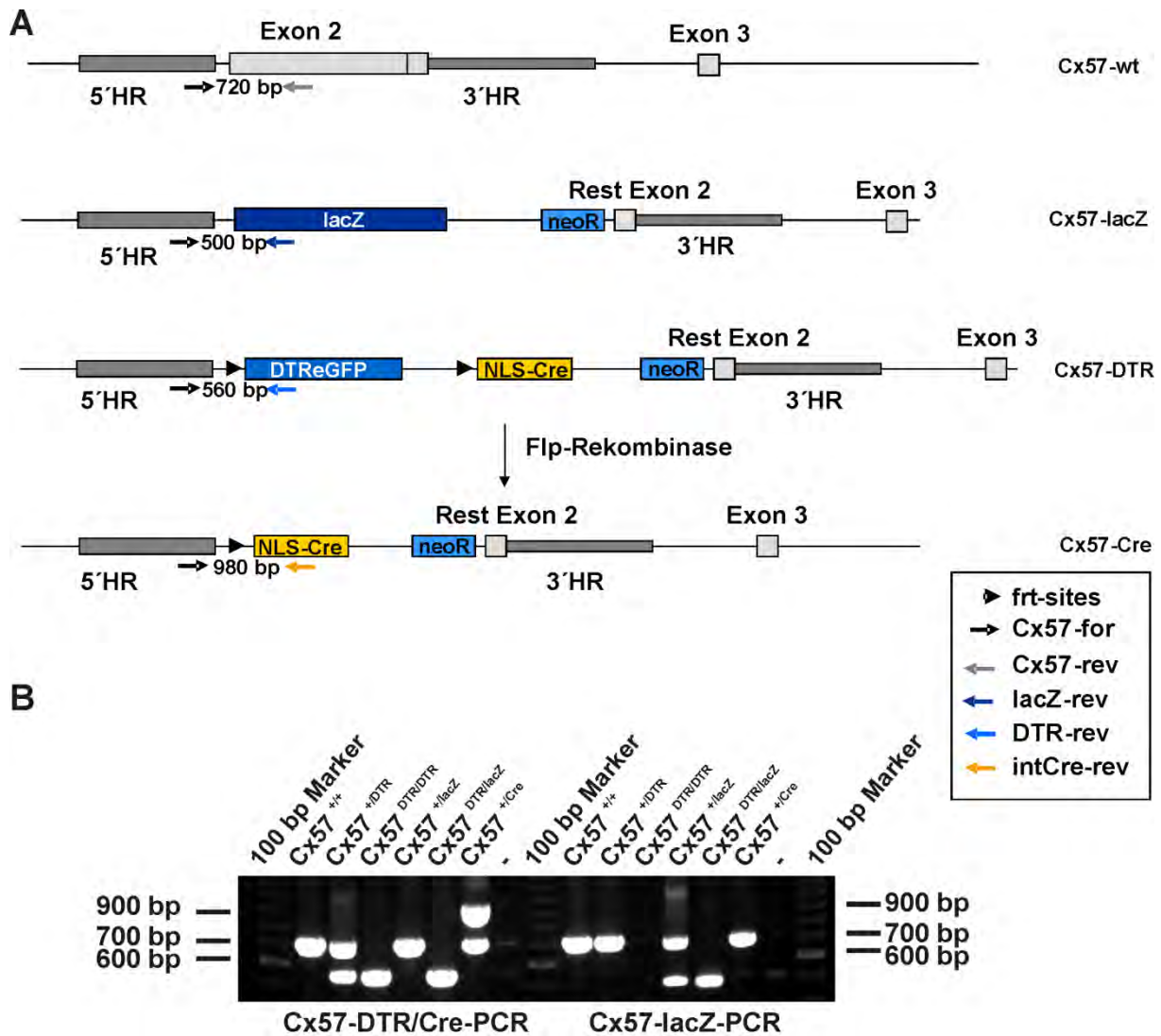
Zur Bestimmung der Genotypen der agouti-farbenen Chimärennachkommen und aller weiterer Nachkommen der Cx57-DTRfrtCre Mauslinie wurde eine PCR-Strategie basierend auf der Genotypisierungs-PCR der Cx57-lacZ Mauslinie entwickelt. Diese beruht auf einer drei Starter-PCR mit einem gemeinsamen Starter in der 5'-Region (Cx57-for) und einem Starter spezifisch für Exon 2 von Cx57 (Cx57-rev) sowie einem Starter spezifisch für die kodierende Region der  $\beta$ -Galaktosidase (lacZ-rev) (Dissertation S. Hombach, 2004). Durch die Wahl der Startermoleküle ergibt sich für das Cx57-Wildtypallel ein 720 bp und für das Cx57-LacZ Allel ein 500 bp großes Amplikon.

Durch Verwendung eines Startermoleküls spezifisch für den DT-Rezeptor (DTR-rev) in Kombination mit dem Cx57-for Starter entsteht in der hier entwickelten Cx57-DTR/Cre-PCR ein 560 bp großes Amplikon, wodurch sich das Cx57-DTR Allel nachweisen lässt. Setzt man zusätzlich einen Starter spezifisch für die kodierende Region der Cre-Rekombinase (intCre-rev) in Kombination mit Cx57-for ein, lässt sich das Cx57-Cre Allel über ein 980 bp großen Fragment nachweisen. Beide Möglichkeiten kann man miteinander und mit den Startermolekülen für das Cx57-Wildtypallel (Cx57-for, Cx57-rev) kombinieren (vergl. Abb. 4.6 A).

Die ersten heterozygoten Cx57<sup>+DTR</sup> Nachkommen der Chimären wurden kontinuierlich mit C57BL/6 Mäusen verpaart, um einen entsprechenden Linienhintergrund zu erhalten. Zusätzlich wurden durch Verpaarungen mit Cx57<sup>lacZ/lacZ</sup> aus der Cx57-lacZ Mauslinie Tiere mit dem Genotypen Cx57<sup>DTR/lacZ</sup> erzeugt. Durch Verpaarung von Cx57<sup>+DTR</sup> Mäusen untereinander entstand unter anderem der Cx57<sup>DTR/DTR</sup> Genotyp. Um die von frt-Stellen umgebene Sequenz des DT-Rezeptors mithilfe der FLP-Rekombinase zu entfernen, wurden durch Verpaarung mit deleter-FLP Mäusen (Rodriguez et al., 2000) Tiere mit dem Genotypen Cx57<sup>+Cre</sup> : Flp erzeugt. In diesen Tieren wurde durch die ubiquitär exprimierte FLP-Rekombinase der Bereich zwischen den frt-Stellen entfernt und statt des DT-Rezeptors (Cx57-DTRfrtCre) gelangt die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Cx57-Promotors (Cx57-Cre). Das Gen für die Flp-Rekombinase wird anschließend durch Verpaarung mit C57BL/6 Mäusen wieder heraus gekreuzt.

Mit DNA aus Schwanzspitzenbiopsien der hier beschriebenen Genotypen wurde die Cx57-DTR/Cre Genotypisierungs-PCR getestet (Abb. 4.6 B). Mithilfe dieser PCR ließen sich folgende Allele in einem gemeinsamen Ansatz nachweisen: Cx57-wt, Cx57-DTR und Cx57-Cre. Eine zusätzliche Kombination mit den Startern für das Cx57-lacZ Allel (lacZ-rev, Cx57-for) in einer gemeinsamen PCR war nicht möglich (nicht gezeigt). Daher sind zur Identifizierung von Cx57<sup>DTR/lacZ</sup> Genotypen zwei separate PCR Ansätze notwendig (Abb. 4.6 B).

## 4. Ergebnisse



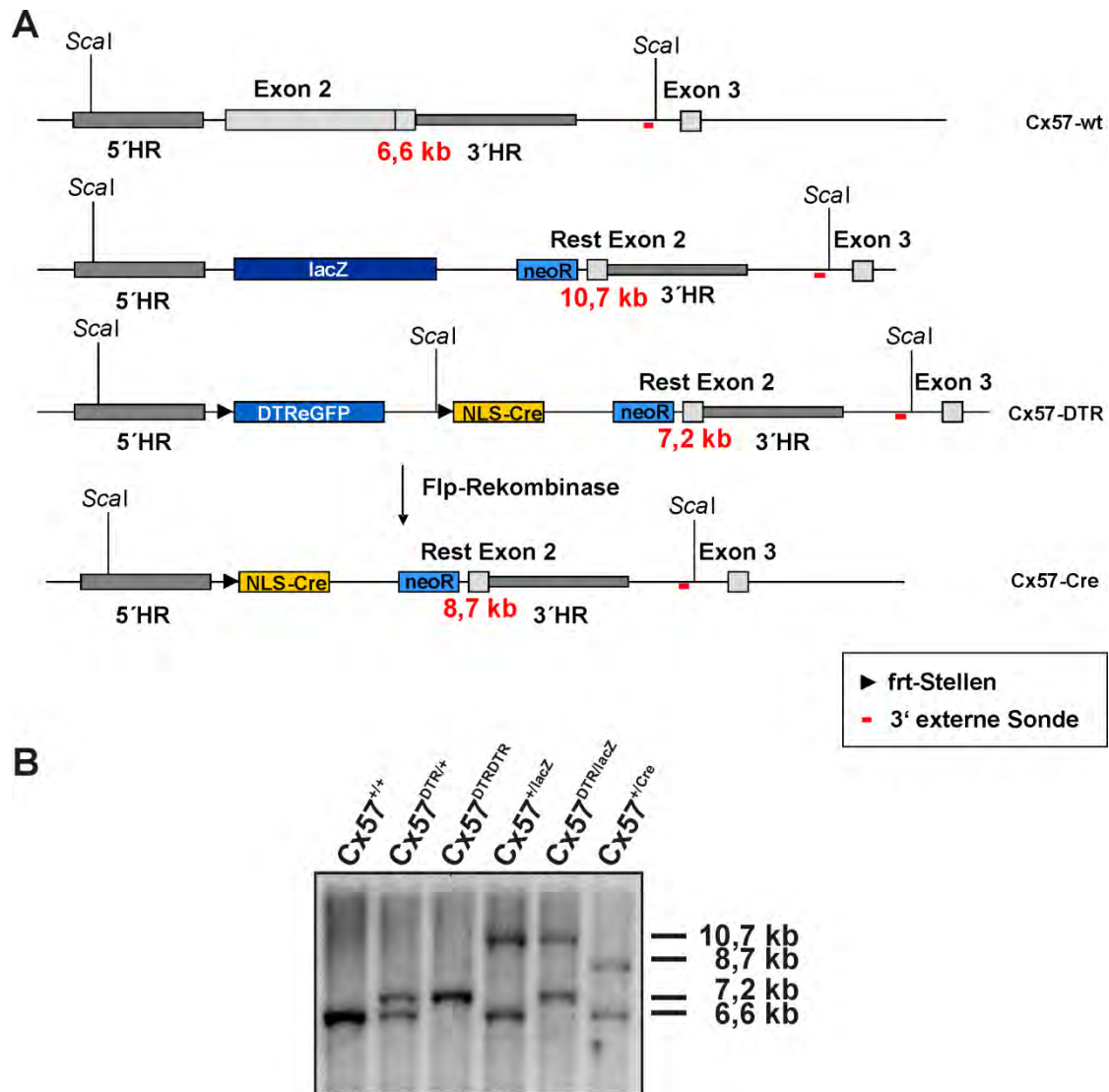
**Abbildung 4.6: Genotypisierung von Cx57-DTR<sup>frt</sup>Cre Mäusen.** Wie in der PCR zum Nachweis des Cx57-lacZ Allels wird zur Analyse der Cx57-DTR und Cx57-Cre Allele ein gemeinsamer Starter im 5'-Bereich von Cx57 in Kombination mit einem jeweils reversen Starter für den DT-Rezeptor bzw. die Cre-Rekombinase verwendet. Durch die Wahl der entsprechenden Starter ergeben sich jeweils unterschiedliche Amplikongrößen (A). Starter spezifisch für Cx57, den DT-Rezeptor und die Cre-Rekombinase können in einem gemeinsamen Ansatz verwendet werden, während auf das Vorhandensein des Cx57-lacZ Allels in einem separaten Ansatz getestet wird. Ein Beispiel für eine Genotypisierung ist in (B) dargestellt. Abkürzungen: Neomycinresistenzkassette neoR; kodierende Region der  $\beta$ -Galaktosidase lacZ; Fusionsprotein aus DT-Rezeptor und eGFP DTReGFP; kernlokalisierte Cre-Rekombinase NLS-Cre.

### 4.1.3.2 Nachweis verschiedener Genotypen mittels Southernblot-Hybridisierung

Zum Ende dieser Arbeit stand zur genauen Analyse der Großteil der möglichen Genotypen zur Verfügung. Diese Genotypen einschließlich der in weiteren Versuchen verwendeten Kombination mit dem Cx57-lacZ Allel wurden per Southernblot Analyse untersucht. Dazu wurde genomische DNA aus je einem Leberlappen der verschiedenen Tiere isoliert und mithilfe der Restriktionsendonuklease *ScaI* gespalten. Eine über PCR amplifizierte Sonde aus einem ca. 500bp großen Bereich direkt 3' des integrierten Konstruktes wurde radioaktiv markiert und mit den gelelektrophoretisch aufgetrennten

## 4. Ergebnisse

Fragmenten der genomischen DNA hybridisiert. Die entstandenen Signale der hybridisierten Sonde zeigten die erwarteten Größen (Abb. 4.7).



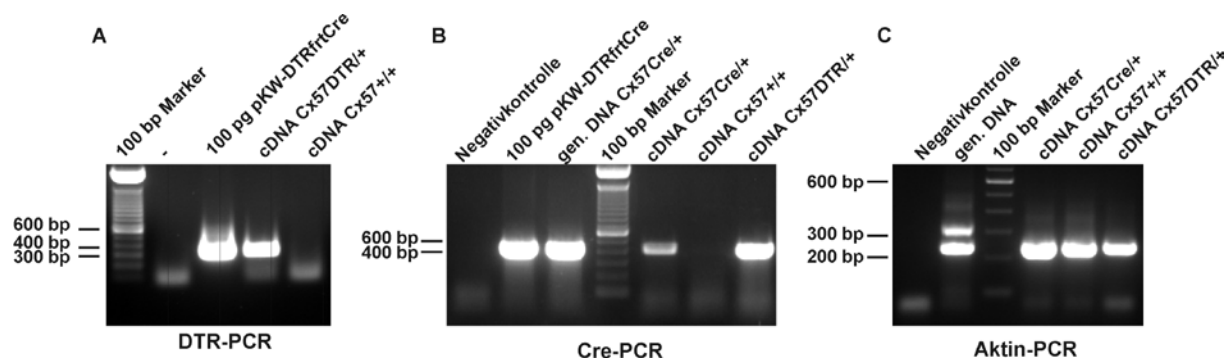
**Abbildung 4.7: Southernblot-Analyse der unterschiedlichen Genotypen.** Mit *ScalI* gesplante genomische DNA der verschiedenen Genotypen wurde mit einer Sonde gegen eine Sequenz direkt außerhalb des 3'-Bereichs des Austauschvektors im Cx57-Lokus hybridisiert. **(A)** zeigt die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsendonuklease und die erwarteten Größen bei Verwendung dieser Sonde. Ein Signal im Autoradiogramm **(B)** bei 7,2 kb zeigt das erfolgreiche Einbringen des Cx57-DTR<sup>frt</sup>Cre Konstruktes in den Cx57-Lokus homozygot, heterozygot und in Kombination mit dem Cx57-lacZ Allel (10,7 kb). Eine Bande bei 8,7 kb für das Cx57-Cre Allel beweist die Funktion der *frt*-Stellen und das erfolgreiche Entfernen des DT-Rezeptors mittels FLP-Rekombinase. Das Cx57-wt Allel wird durch ein 6,6 kb großes Fragment nachgewiesen. Abkürzungen: neoR: Neomycin-resistenzkassette; lacZ: kodierende Region der  $\beta$ -Galaktosidase; DTReGFP: Fusionsprotein aus DT-Rezeptor und eGFP; NLS-Cre: kernlokalisierte Cre-Rekombinase.

### 4.1.3.3 Analysen zur Expression von DT-Rezeptor und Cre-Rekombinase in der Retina

Um zu überprüfen, ob das Einbringen der Sequenzen für den DT-Rezeptor bzw. die Cre-Rekombinase in den Cx57-Lokus zu der erwarteten Expression der jeweiligen Gene über den Cx57-Promotor führt, wurde zunächst in den erzeugten Cx57-DTR bzw. Cx57-Cre

Mauslinien die Transkription von DT-Rezeptor und Cre-Rekombinase untersucht. Dazu wurde Gesamt-RNA aus der Retina von  $Cx57^{+/+}$ ,  $Cx57^{DTR/+}$  und  $Cx57^{Cre/+}$  Tieren gewonnen. Diese wurde mittels der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Über eine PCR mit Startern spezifisch für den DT-Rezeptor (DTR-for, DTR-rev) bzw. die Cre-Rekombinase (intCre-for, intCre-rev) wurde das jeweilige Transkript nachgewiesen. Das Transkript für den DT-Rezeptor wurde wie erwartet ausschließlich in cDNA aus Tieren des Genotypen  $Cx57^{DTR/+}$  gefunden (Abb. 4.8 A). Eine Cre-spezifische Bande (420 bp, Abb.4.8 B) ergab sich mit cDNA aus  $Cx57^{Cre/+}$  und  $Cx57^{DTR/+}$  Mäusen, jedoch nicht aus  $Cx57^{+/+}$  Tieren.

Da keine der zuvor verwendeten PCRs Intron-überspannend ist, wurde die Qualität der eingesetzten cDNA mittels einer Intron-überspannenden Aktin-PCR überprüft. Alle cDNA-Proben zeigten ein cDNA-spezifisches Signal von 243 bp und keinen Hinweis auf eine Kontamination mit genomischer DNA (330 bp Amplikon) (4.8 C). Neben der Aktin-Kontrolle wurde die RNA zusätzlich auf Spuren von genomischer DNA über RT-PCR Analyse mit Startern spezifisch für das nur im Hoden der Maus exprimierte Connexin33 (vergl. Haefliger et al., 1992) überprüft. Hierbei zeigte sich in keiner der cDNA Proben ein Amplikon für Connexin33, ein weiteres Indiz, dass keine Verunreinigung der cDNA mit genomischer DNA vorlag (Daten nicht gezeigt). Somit wurde gezeigt, dass sowohl der DT-Rezeptor als auch die Cre-Rekombinase auf Transkriptebeine in der Retina von  $Cx57^{DTR/+}$  bzw.  $Cx57^{Cre/+}$  Mäusen vorhanden sind. In  $Cx57^{DTR/+}$  Tieren wird sowohl der DT-Rezeptor als auch die Cre-Rekombinase transkribiert.



**Abbildung 4.8: Expressionsanalyse von DT-Rezeptor und Cre-Rekombinase mittels RT-PCR.** Aus der Retina von  $Cx57^{+/+}$ ,  $Cx57^{DTR/+}$  und  $Cx57^{Cre/+}$  Tieren wurde jeweils die Gesamt-RNA isoliert und mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Über spezifische Starter für den DT-Rezeptor bzw. die Cre-Rekombinase wurde die Expression des jeweiligen Gens nachgewiesen (DTR-PCR, Cre-PCR). **(A)** Ein 320 bp großes Amplikon aus cDNA des Genotyps  $Cx57^{DTR/+}$  zeigte die Anwesenheit der mRNA des DT-Rezeptors in der Retina. Als Positivkontrolle diente der Austauschvektor pKW-DTRfritCre. **(B)** Für die Cre-Rekombinase ergibt sich ein Amplikon von 420 bp, das sowohl in cDNA von  $Cx57^{Cre/+}$  als auch von  $Cx57^{DTR/+}$  Tieren das Transkript der Cre-Rekombinase nachweist. Neben dem Austauschvektor diente zusätzlich genomische (gen.) DNA einer  $Cx57^{Cre/+}$  Maus als Positivkontrolle. **(C)** Die cDNA wurde mittels einer PCR mit Intron-überspannenden Aktin-spezifischen Startern auf Verunreinigungen mit genomischer DNA untersucht. Ein 243 bp großes Amplikon zeigt ausschließlich die Anwesenheit der Aktin cDNA und die Abwesenheit von genomischer DNA in allen cDNA Proben (vergl. 330 bp Bande in der Positivkontrolle mit genomischer Schwanzspitzen DNA).

Ein Nachweis der genauen Lokalisation des Fusionsproteins aus DT-Rezeptor und eGFP innerhalb der Retina über die Eigenfluoreszenz des DTReGFP oder verschiedene eGFP-spezifische Antikörper war aufgrund eines zu schwachen Signals nicht möglich (nicht gezeigt).

### 4.1.4 Ablation von Horizontalzellen in Cx57-DTR<sup>frt</sup>Cre Mäusen mittels Injektion von Diphtherie Toxin

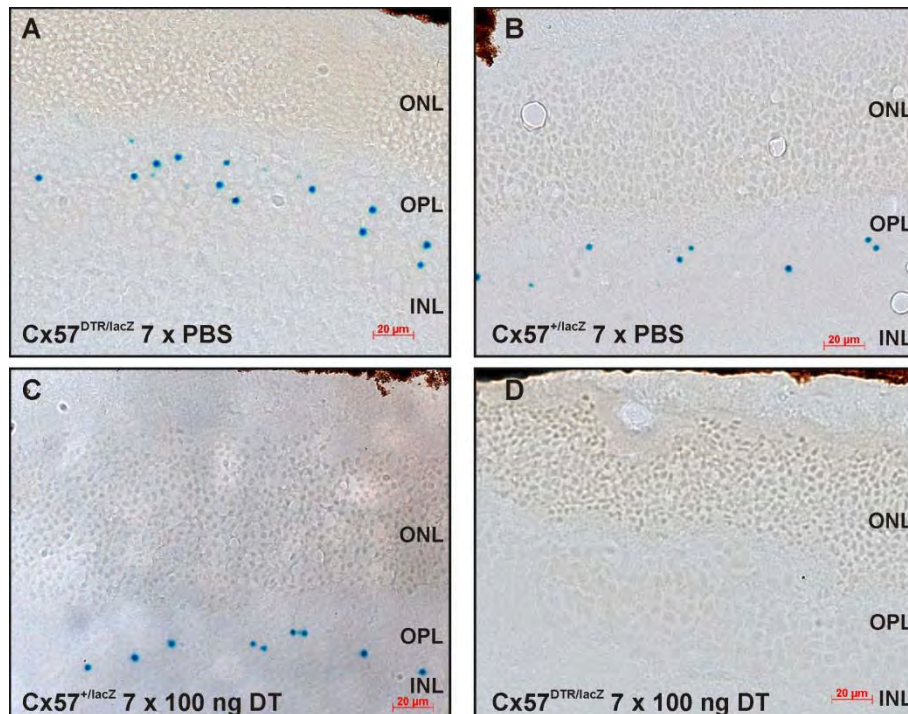
Die hier erzeugte und analysierte Cx57-DTR<sup>frt</sup>Cre Mauslinie wurde verwendet, um gezielt die Horizontalzellen der Retina zu ablatieren. Nager sind aufgrund einer sehr geringen Affinität des für die Aufnahme des DT in die Zelle notwendigen Rezeptors (HB-EGF) resistent gegen DT (Mitamura et al., 1995). Durch die Expression des humanen DT-Rezeptors unter der Kontrolle des Cx57-Promotors werden jedoch alle Zellen, in denen diese Form des DT-Rezeptors exprimiert wird, in die Lage versetzt das Toxin aufzunehmen, was schließlich zur Apoptose dieser Zellen führt (Morimoto und Bonavida, 1992). In der Literatur ist dazu die intraperitoneale Injektion von 100 ng DT pro Tag über einen Zeitraum von einer Woche beschrieben (vergl. Buch et al., 2005). In einem ersten Versuch wurden daher 100 ng DT pro Tag über sieben Tag hinweg in insgesamt drei Cx57<sup>DTR/lacZ</sup> Mäuse injiziert. Dabei wurde das  $\beta$ -Galaktosidase Reporter gen (Cx57-lacZ) auf dem zweiten Cx57 Allel verwendet, um die An- oder Abwesenheit Cx57-exprimierender Zellen nachzuweisen. Als Kontrollen dienten drei ebenfalls mit DT behandelte Cx57<sup>+ / lacZ</sup>-Geschwister sowie je ein mit PBS behandeltes Cx57<sup>DTR/lacZ</sup> und Cx57<sup>lacZ/+</sup> Tier. Drei Tage bzw. eine Woche nach der Behandlung wurden die Tiere getötet und 20  $\mu$ m dicke Kryoschnitte der Augen angefertigt. Diese wurden fixiert und mittels des Substrates 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal) wurde über ein blaues Produkt die Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase nachgewiesen.

Die Blaufärbung durch lacZ-Aktivität in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) ist bei beiden mit PBS behandelten Kontrolltieren deutlich zu erkennen (Abb. 4.9). Ebenso sind lacZ-Signale in der äußeren plexiformen Schicht der Retina der DT-behandelten Cx57<sup>+ / lacZ</sup> Mäuse vorhanden. Diese entsprechen der zuvor für die Cx57-lacZ Maus beschriebenen Lokalisation in Horizontalzellen (Hombach et al., 2004). In den Cx57<sup>lacZ/DTR</sup> Versuchstieren allerdings sind nach siebentägiger Behandlung mit 100 ng DT pro Tag keine LacZ-Signale mehr sichtbar (Abb.4.9 D), was auf eine vollständige Ablation der Horizontalzellen hindeutet.

Von den ersten drei mit DT behandelten Cx57<sup>DTR/lacZ</sup> Tieren wurde eines drei Tage nach der letzten Injektion krank. Es hatte an Gewicht verloren, war schwach und apathisch. Alle anderen in diesem Versuch mit DT injizierten Tiere waren dagegen äußerlich gesund. Im nächsten Versuch wurden Cx57<sup>DTR/+</sup> bzw. Cx57<sup>+ / +</sup> Tiere verwendet und ebenso über sieben Tage mit 100 ng DT pro Tag intraperitoneal injiziert. Zwei Drittel der Cx57<sup>DTR/+</sup> Tiere starben noch in den ersten Tagen nach der letzten Injektion. Das

restliche Drittel zeigte ähnliche Symptome wie das einzelne Tier in der vorhergehenden Versuchsreihe.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Folgenden die Dosis an DT verändert, um eine Injektionsmethode zu finden, die einerseits die vollständige Ablation der Horizontalzellen in der Retina gewährleistet, andererseits aber nicht zu Krankheitssymptomen oder Tod der Tiere führt.

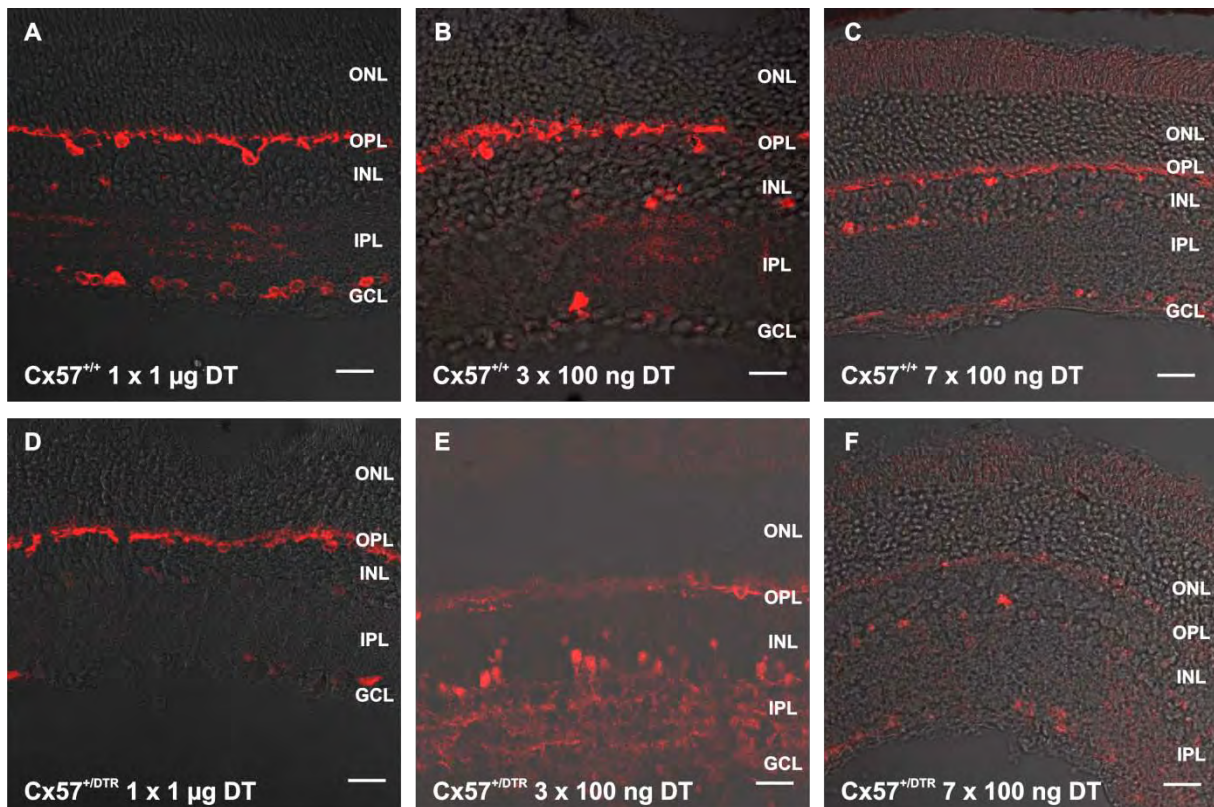


**Abbildung 4.9: Ablation von Horizontalzellen mittels DT-Injektion.**  $Cx57^{DTR/lacZ}$  sowie  $Cx57^{+/lacZ}$  Tiere wurden eine Woche mit 100 ng DT (C/D) bzw. PBS (A/B) pro Tag intraperitoneal injiziert. Das unter der Kontrolle des Cx57-Promotors stehende  $\beta$ -Galaktosidase Reportergen (lacZ) wurde verwendet, um mittels LacZ-Färbung die An- oder Abwesenheit der Horizontalzellen zu zeigen. In mit DT behandelten  $Cx57^{DTR/lacZ}$  Tieren sind eine Woche nach der letzten Injektion die in den Kontrollen sichtbaren LacZ-Signale in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) nicht mehr vorhanden (D). Dies deutet auf eine vollständige Ablation der Horizontalzellen in diesen Tieren hin. ONL äußere nukleäre Schicht, INL innere nukleäre Schicht. Der Maßstab entspricht 20  $\mu$ m.

#### 4.1.5 Effizienz der Ablation von Horizontalzellen bei unterschiedlichen Dosen von Diphtherie Toxin

Zur Ermittlung der kleinsten erforderlichen Dosis DT notwendig für eine komplette Ablation der Horizontalzellen wurden  $Cx57^{DTR/+}$  und  $Cx57^{DTR/lacZ}$  Tiere sowie entsprechende Kontrollen ohne den DT-Rezeptor einmalig mit 1  $\mu$ g (1 x 1  $\mu$ g), drei Tage mit 100 ng pro Tag (3 x 100 ng) sowie sieben Tage mit 100 ng pro Tag behandelt (7 x 100 ng). Eine Woche nach der letzten Injektion wurden diese Tiere getötet und der Augenkern präpariert. Nach PFA-Fixierung wurden 20  $\mu$ m dicke Kroyschnitte für Immunfluoreszenzanalysen eingesetzt. Abbildung 4.10 zeigt anhand des immunologischen Nachweises des in Horizontalzellen besonders stark exprimierten Proteins Calbindin (Haverkamp und Wässle, 2000) die Lage und Anzahl der Horizontalzellen in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) der jeweiligen Tiere. Nach

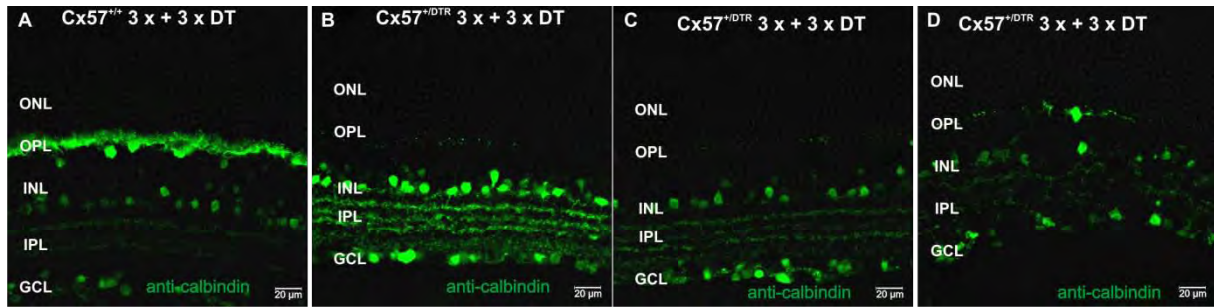
einmaliger Injektion einer hohen Dosis (1 x 1 µg) sind noch nahezu alle Horizontalzellen verblieben. Es ist kein Unterschied im Vergleich zu einem Wildtyp-Tier zu erkennen. Nach dreimaliger Injektion (3 x 100 ng) fehlt bereits ein Teil der Horizontalzellen, doch auch hier sind noch einige Calbindin-positive Zellen in der OPL zu sehen. Nach siebentägiger Injektion von 100 ng DT pro Tag (7 x 100 ng) dagegen sind alle Horizontalzellen ablatiert und keine Zellkörper mehr sichtbar. Alle so behandelten Cx57<sup>DTR/+</sup> Tiere wurden jedoch krank oder starben.



**Abbildung 4.10: Ablation von Horizontalzellen mit verschiedenen Dosen Diphtherie Toxin.** Mittels Immunfluoreszenzanalysen gegen das in Horizontalzellen stark exprimierte Protein Calbindin wurde der Effekt verschiedener Dosen von DT eine Woche nach der jeweils letzten Injektion getestet. Nach einmaliger Injektion von 1 µg DT sind sowohl in Cx57<sup>+/+</sup> als auch in Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren noch alle Horizontalzellen in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) mit ihren Zellkörpern und nach oben gerichteten axonalen und dendritischen Ausläufern zu erkennen (**A/D**). Nach drei Tagen Injektion mit 100 ng DT pro Tag sind bereits einige Horizontalzellen bei Cx57<sup>DTR/+</sup> ablatiert, aber noch Horizontalzellen vorhanden (**B/E**). Nach siebenmaliger Behandlung mit 100 ng DT pro Tag dagegen sind alle Horizontalzellen in Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren ablatiert (**C/F**). ONL äußere nukleäre Schicht, INL innere nukleäre Schicht, IPL innere plexiforme Schicht, GCL Ganglienzellschicht. Der Maßstab entspricht 20 µm.

Eine Verringerung der Dosis auf dreimal 100 ng oder eine einmalige Injektion mit einer hohen Dosis DT sind damit nicht ausreichend wirksam. Um dennoch eine vollständige Ablation der Horizontalzellen zu erreichen, wurden in einem weiteren Versuch Cx57<sup>DTR/+</sup> und Cx57<sup>DTR/lacZ</sup> Tiere drei Tage mit 100 ng pro Tag injiziert. Danach wurde die Behandlung für zwei Wochen ausgesetzt. Anschließend wurden erneut über drei Tage 100 ng DT pro Tag injiziert (3 x + 3 x). Die Ablation der Horizontalzellen wurde drei Tage bzw. eine Woche nach der letzten Injektion über lacZ-Färbung und Calbindin-Immunfluoreszenzanalyse untersucht.





**Abbildung 4.11: Ablation von Horizontalzellen mit über drei Wochen verteilter Dosis.** Nach je dreimaliger Behandlung mit 100 ng DT pro Tag im Abstand von zwei Wochen (3 x + 3 x) wurde eine Woche nach der letzten Injektion die Retina fixiert. In 20 µm dicken Schnitten wurden die Horizontalzellen mittels eines Antikörpers gegen Calbindin angefärbt. Die Horizontalzellen sind im Wildtyp in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) mit ihren Zellkörpern und nach oben gerichteten dendritischen und axonalen Ausläufern zu erkennen (A). In Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren sind diese nach DT-Behandlung nahezu vollständig eliminiert (drei unterschiedliche Tiere, B-D). Eine einzelne nicht ablatierte Horizontalzelle wurde in einem Schnitt gefunden (D). ONL äußere nukleäre Schicht, INL innere nukleäre Schicht, IPL innere plexiforme Schicht, GCL Ganglienzellschicht. Der Maßstab entspricht 20 µm.

Wie in der Immunfluoreszenzanalyse in Abbildung 4.11 zu erkennen, sind nach diesem Injektionsprotokoll nahezu keine Horizontalzellen mehr vorhanden. Eine Auszählung von drei unterschiedlichen DT-behandelten Cx57<sup>DTR/lacZ</sup> Tieren ergab eine deutlich reduzierte Zahl von lacZ-Signalen, die noch 0,1 – 1 % der Horizontalzellen in Cx57<sup>+lacZ</sup> ausmachen (Tabelle 4.2). Keines der 3 x + 3 x injizierten Tiere zeigte Zeichen von Krankheit oder starb (siehe auch Überlebenskurve Abb. 4.16). Damit ist dieses Protokoll geeignet, eine nahezu vollständige Ablation der Horizontalzellen in der Retina zu bewirken, ohne den Tod der Tiere zu verursachen.

Tier	1	2	3	4
Genotyp	Cx57 <sup>+lacZ</sup>	Cx57 <sup>DTR/lacZ</sup>	Cx57 <sup>DTR/lacZ</sup>	Cx57 <sup>DTR/lacZ</sup>
mittlere Anzahl Horizontalzellen/Schnitt	118	0,1	0,2	1,3
Anteil in % im Vergleich zu Cx57 <sup>+lacZ</sup>	100	0,08	0,13	1,09

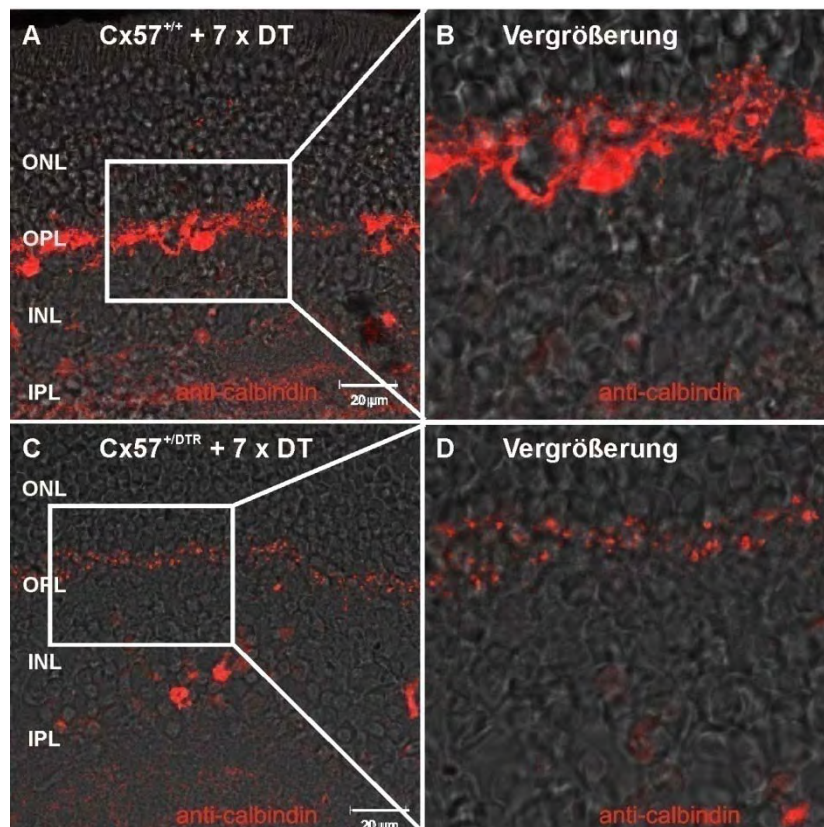
**Tabelle 4.2: Auszählung der noch vorhandenen Horizontalzellen in der Retina nach DT-Injektion.** Nach dreitägiger Injektion von 100 ng DT pro Tag gefolgt von einer zweiwöchigen Unterbrechung und einer erneuten dreitägigen Injektion (3 x + 3 x) in insgesamt vier Tieren wurden die Horizontalzellen in jeweils zehn 20 µm dicken Kryoschnitten pro Tier nach β-Galaktosidasenachweis anhand positiver LacZ-Signale in der äußeren plexiformen Schicht ausgezählt. Der Anteil der nach DT-Behandlung noch vorhandenen lacZ-Signale wurde im Vergleich zum Wildtyp (Tier 1, Cx57<sup>+lacZ</sup>) bestimmt.

#### 4.1.6 Morphologische Analysen der Retinae von Horizontalzell-ablatierten Mäusen

Vor einer physiologischen Analyse von Horizontalzell-ablatierten Mäusen wurde zunächst die Morphologie der Retina genauer untersucht. Dazu wurden einmal verschiedene Markerproteine für unterschiedliche neuronale Zelltypen der Retina in Immunfluoreszenzanalysen verwendet, zum anderen wurden über elektronen-

mikroskopische Aufnahmen mögliche Reste von Horizontalzellen sowie die Morphologie der benachbarten Zellen genauer betrachtet. Besonderes Interesse galt der gemeinsamen Synapse zwischen Photorezeptoren, Horizontalzellen und Bipolarzellen, die als erste Synapse in der Signalweiterleitung von Zapfen und Stäbchen von besonderer Bedeutung ist.

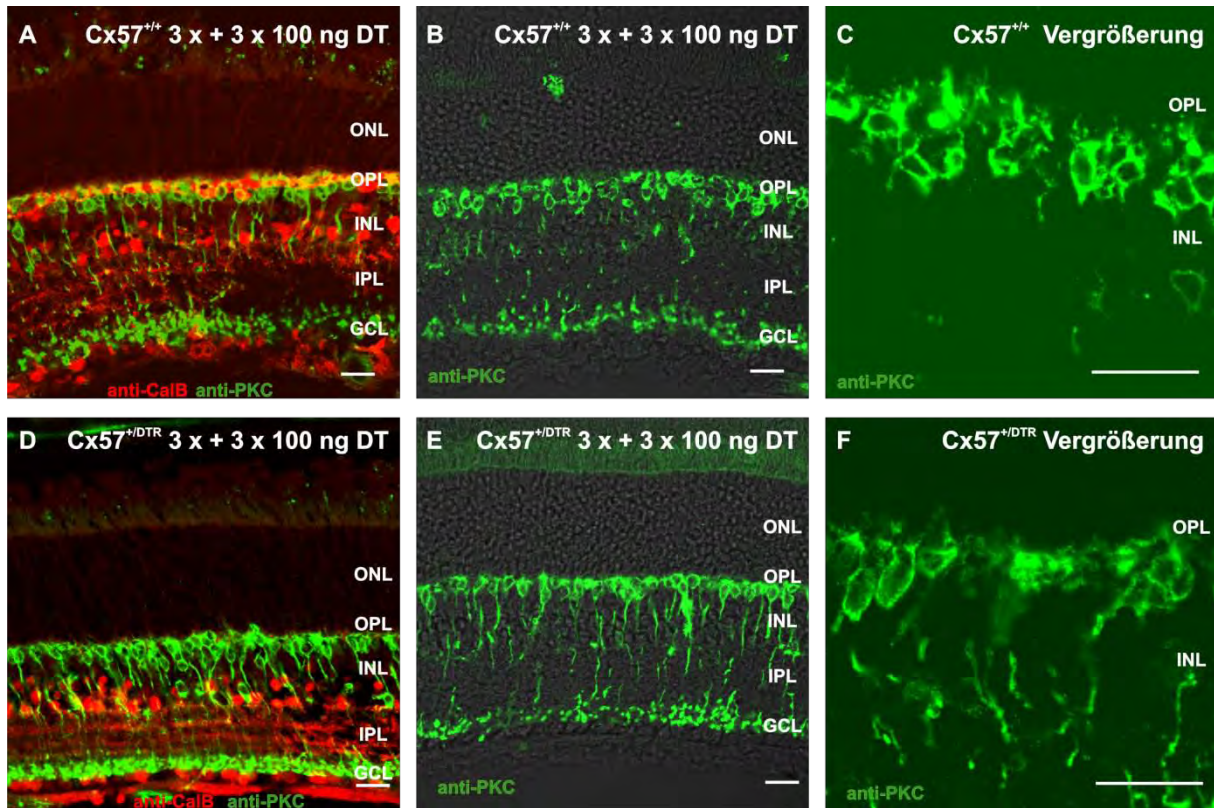
Ein untersuchtes Markerprotein ist das in den Horizontalzellen besonders stark exprimierte Protein Calbindin, das sowohl im Zellkörper als auch in den dendritischen und axonalen Fortsätzen zu finden ist (Haverkamp und Wässle, 2000) und bereits in vorhergehenden Versuchen zum Einsatz kam. Immunfluoreszenzanalysen mit Calbindin-spezifischen Antikörpern zeigten dementsprechend in Wildtyptieren ( $Cx57^{+/+}$ ) eine starke Färbung der Horizontalzellkörper und der in die äußere plexiforme Schicht (OPL) gerichteten Ausläufer. In  $Cx57^{DTR/+}$  Tieren dagegen waren nach sieben Injektionen von 100 ng DT pro Tag und einer Inkubationszeit von sieben Tagen (zweite Versuchsreihe) weder Zellkörper noch dendritische oder axonale Ausläufer zu erkennen, sondern ein punktiertes Muster in der äußeren plexiformen Schicht (Abb. 4.12). Diese nach der DT-Injektion auftretenden Calbindin-gefärbten Strukturen liegen etwa auf Höhe der dendritischen Endigungen.



**Abbildung 4.12: Analyse der Morphologie von Horizontalzellsomata und Ausläufern nach DT-Injektion in  $Cx57^{DTR/+}$  Mäusen.** (A/B) Horizontalzellen zeigen nach Immunfärbung mit Calbindin-spezifischen Antikörpern in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) neben den am unteren Rand der Schicht liegenden Zellkörpern nach oben führende Ausläufer, die in vielen vermutlich dendritischen Spitzen enden. (C/D) Nach Ablation der Horizontalzellen bleibt ein Rest von Calbindin-positiven Strukturen auf Höhe dieser Endigungen erhalten. Der Maßstab entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

## 4. Ergebnisse

Eine Veränderung der Bipolarzellen durch Ablation der Horizontalzellen wurde mithilfe einer Proteinkinase C (PKC) Immunfluoreszenzanalyse einzeln und in Kombination mit Calbindin-Antikörpern untersucht. PKC wird in der Retina besonders stark von Bipolarzellen exprimiert (Haverkamp und Wässle, 2000), wodurch sich die gesamte Bipolarzelle mit PKC-Antikörpern anfärben lässt.

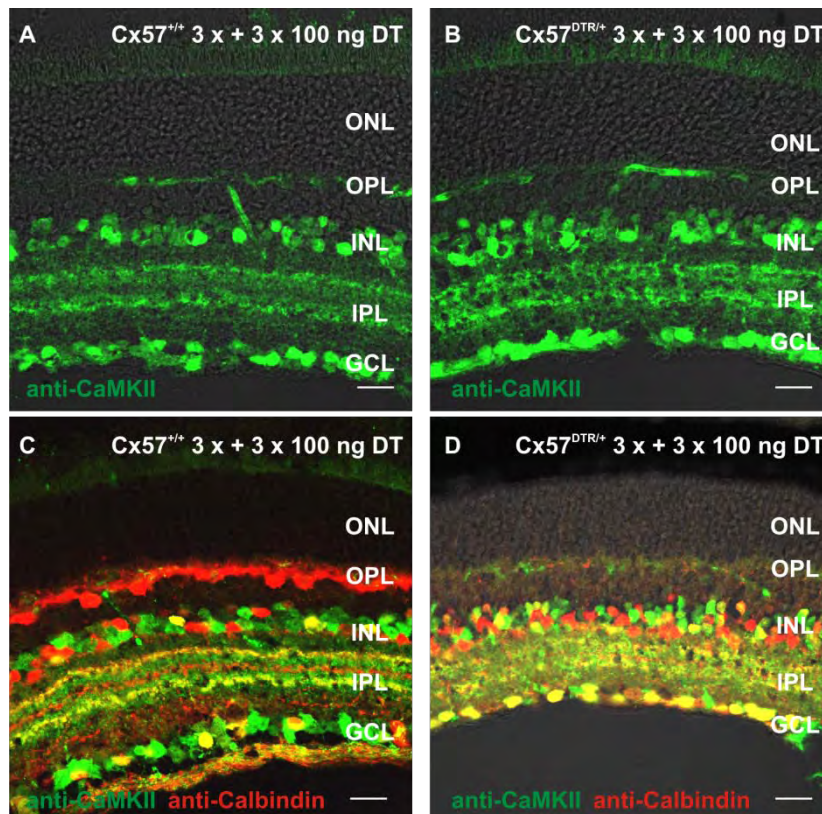


**Abbildung 4.13: Analyse der Morphologie von Bipolarzellen in der Retina von mit DT behandelten Mäusen.** In PFA-fixierten 20 µm dicken Schnitten der Retina von 3 x + 3 x mit 100 ng DT pro Tag behandelten  $Cx57^{DTR/+}$  bzw.  $Cx57^{+/+}$  Tieren wurden eine Woche nach der letzten Injektion die Bipolarzellen mithilfe von Antikörpern gegen PKC (grün) angefärbt. Die Ablation der Horizontalzellen ist mithilfe von Antikörpern gegen Calbindin (rot) gezeigt (**A/D**). Sie führt zu keiner deutlichen Veränderung der Morphologie der Bipolarzellen in der inneren nukleären Schicht (INL) (**B/E**). Die Ausläufer der Bipolarzellen in die äußere plexiforme Schicht (OPL) zeigen auch in der Vergrößerung keinen deutlichen Unterschied zwischen  $Cx57^{DTR/+}$  und  $Cx57^{+/+}$  (**C/F**). ONL äußere nukleäre Schicht, INL innere nukleäre Schicht, IPL innere plexiforme Schicht, GCL Ganglienzellschicht. Der Maßstab entspricht 20 µm.

Wie in Abbildung 4.13 zu sehen, ist die Anzahl und Verteilung der Bipolarzellen zwischen sieben Tagen mit 100 ng DT pro Tag behandelten  $Cx57^{+/+}$  und  $Cx57^{DTR/+}$  Tieren unverändert. Gleichzeitig zeigt das Fehlen der charakteristischen Calbindinfärbung in der äußeren plexiformen Schicht der  $Cx57^{DTR/+}$  Retina die erfolgreiche Ablation der Horizontalzellen. In beiden Genotypen erkennt man in der Vergrößerung deutlich den eigentlichen Zellkörper der Bipolarzellen mit nach oben gerichteten dendritischen Enden. Zwischen Horizontalzell-ablatierter und normaler Retina ist kein Unterschied in der Struktur der dendritischen Endigungen erkennbar. Ob es zu einer Veränderung an der gemeinsamen Kontaktstelle zwischen Bipolarzellen, Photorezeptoren und Horizontalzellen gekommen ist, lässt sich mit lichtmikroskopischen Analysen jedoch aufgrund der begrenzten Auflösung nicht klären.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CaMKII) kommt in der Retina hauptsächlich in Ganglienzellen und einem Subtyp von Amakrinzellen vor (Terashima et al., 1994). Mit Hilfe CaMKII-spezifischer Antikörper wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt, um diese Zellen auf eine Veränderung durch die Ablation der Horizontalzellen mittels DT zu untersuchen.

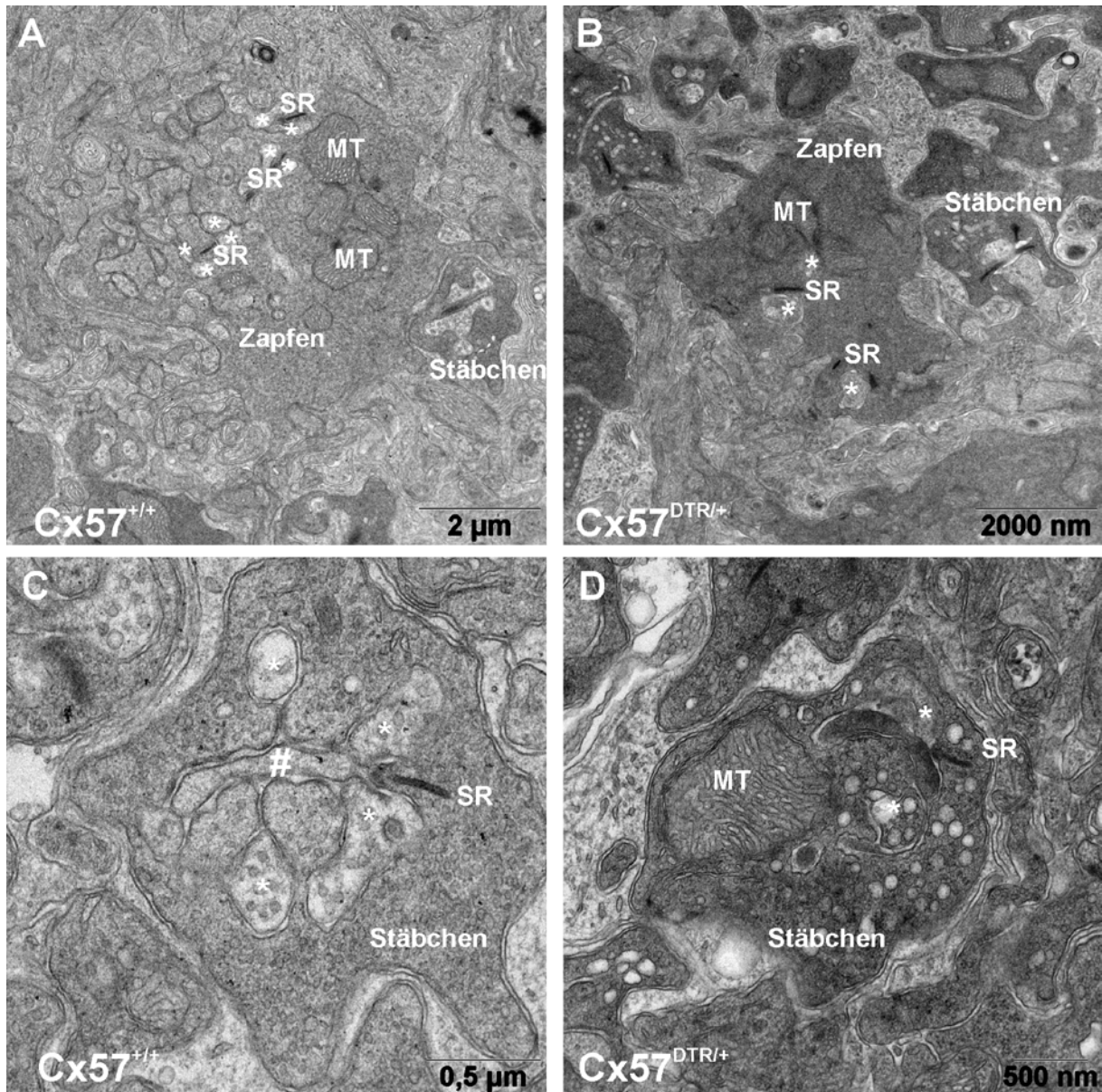
Wie Abbildung 4.14 zeigt, sind die Ganglienzellen in der entsprechenden Zellschicht (GCL) CaMKII positiv. Ebenso ist ein Teil der Amakrinzellen in der inneren nukleären Schicht (INL) mit ihren Verschaltungen in verschiedene Subschichten der inneren plexiformen Schicht (IPL) markiert. In der äußeren plexiformen Schicht (OPL) sind hin und wieder Gefäß-ähnliche Strukturen angefärbt, bei denen es sich um eine unspezifische Reaktion des sekundären anti-Maus Antikörpers handelt (Prof. U. Janssen-Bienhold, persönliche Mitteilung). Die Verteilung der CaMKII-positiven Ganglien- und Amakrinzellen ebenso wie die Verschaltungen der Amakrinzellen in der inneren plexiformen Schicht ist zwischen Horizontalzell-ablatierter ( $\text{Cx57}^{\text{DTR}/+}$  3 x + 3 x DT) und nicht ablatierter Retina ( $\text{Cx57}^{+/+}$  3 x + 3 x DT) unverändert.



**Abbildung 4.14: Analyse von CaMKII-positiven Amakrin- und Ganglienzellen in Horizontalzell-ablatierter Retina.** PFA-fixierte Schnitte der Retina von 3 x + 3 x mit DT behandelten  $\text{Cx57}^{\text{DTR}/+}$  und  $\text{Cx57}^{+/+}$  Tieren wurden mit Antikörpern gegen Calbindin und CaMKII gefärbt. Das Fehlen der roten Calbindin Färbung in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) zeigt die erfolgreiche Ablation der Horizontalzellen (C/D). Die Färbung gegen CaMKII (A/B) zeigt keine Veränderung in der Verteilung der CaMKII-positiven Amakrin- und Ganglienzellen in der inneren nukleären Schicht (INL) bzw. der Ganglienzellschicht (GCL) zwischen beiden mit DT behandelten Genotypen. ONL äußere nukleäre Schicht, INL innere nukleäre Schicht, IPL innere plexiforme Schicht, GCL Ganglienzellschicht. Der Maßstab entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Über eine gleichzeitige Färbung mit Calbindin-Antikörpern ist erneut die erfolgreiche Ablation der Horizontalzellen gezeigt. Zwischen beiden Markern kommt es teilweise zu einer Kolo-kalisation in bestimmten Amakrin- und Ganglienzellen. Aus der Kombination beider Marker ergibt sich in der inneren plexiformen Schicht ein wiederkehrendes Muster aus Subschichten mit Markierung für beide Marker (gelb), nur CaMKII positiven Schichten (grün) und nur Calbindin positiven Schichten (rot). Dies ist sowohl in Cx57<sup>DTR/+</sup> als auch in Cx57<sup>+/+</sup> Retinae der Fall. Damit hat die Ablation der Horizontalzellen keinen Einfluss auf die grobe Morphologie und Verteilung der Amakrin- und Ganglienzellen in der Retina.

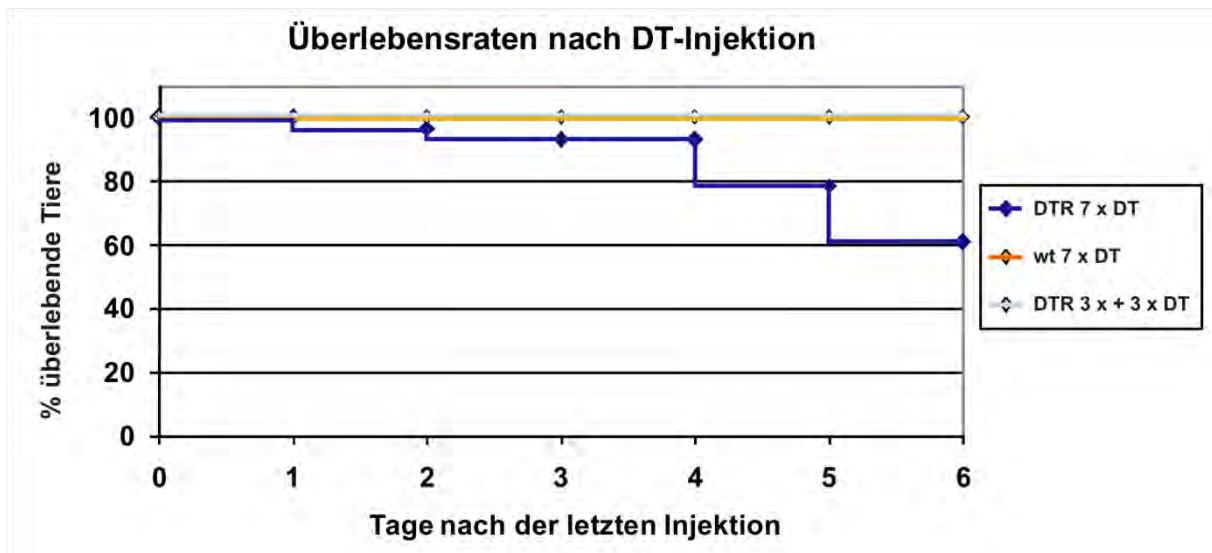
Einen genaueren Eindruck von den Kontakten der Photorezeptoren mit Bipolarzellen nach der Ablation der Horizontalzellen lieferten transmissionselektronenmikroskopische Analysen der Retina. In Zapfen führte die Ablation der Horizontalzellen zum Verlust eines Großteils der invaginierenden Fortsätze von Horizontal- und Bipolarzellen. So sind in einem Zapfen-pedicle (Abb. 4.15 B) nach Ablation der Horizontalzellen die Strukturen der Bändersynapsen noch zu erkennen. Auch einige degradierte Reste der lateralen Elemente der Horizontalzellen sind noch sichtbar. Die invaginierenden Enden der Bipolarzellen fehlen jedoch und einige Bändersynapsen haben jeden Kontakt zu Bipolar- oder Horizontalzellen verloren. In Stäbchen hat die Ablation der Horizontalzellen ebenfalls zu gravierenden Veränderungen geführt (Abb. 4.15 C/D). Hier sind ebenfalls degradierte Reste der lateralen Elemente der Horizontalzellen zu erkennen, ein Kontakt zu noch lebenden Bipolarzellfortsätzen konnte jedoch nicht gefunden werden. Zusätzlich sind größere Mengen von intrazellulären Vesikeln erkennbar, welche in Stäbchen der nicht Horizontalzell-ablatierten Retina nicht vorhanden sind. Die Ablation der Horizontalzellen hat somit gravierende Auswirkungen auf die synaptische Triade aus Photorezeptoren, Bipolar- und Horizontalzellen.



**Abbildung 4.15 Elektronenmikroskopische Analysen der synaptischen Enden der Photorezeptoren nach Ablation der Horizontalzellen mittels DT.**  $Cx57^{DTR/+}$  und  $Cx57^{+/+}$  Tiere wurden  $3 \times 3 \times$  mit 100ng DT täglich im Abstand von zwei Wochen behandelt. Sie wurden eine Woche nach der letzten Injektion getötet und der Augenkelnch präpariert. Nach Ablation der Horizontalzellen zeigen sowohl Zapfen (A/B) als auch Stäbchen (C/D) deutliche morphologische Veränderungen ihrer synaptischen Endigungen. In Zapfen fehlen die meisten invaginierenden Endigungen der Horizontal- und Bipolarzellen, während die synaptischen Bänder noch vorhanden sind (B). In Stäbchen sind teilweise noch Reste der lateralen Elemente von Horizontalzellen erkennbar. Diese weisen jedoch Anzeichen von Degeneration auf (D). Zusätzlich zeigen viele Stäbchen eine Ansammlung von Vesikeln, die im nicht ablatierten Zustand nicht vorhanden sind (B/D). Abkürzungen: \* Horizontalzell-Dedriten; # Bipolarzellfortsätze; SR Bändersynapse; MT Mitochondrium. [In Zusammenarbeit mit Prof. U. Janssen-Bienhold, Oldenburg]

#### 4.1.7 Effekte von DT auf andere Organe von Cx57-DTRfrtCre Mäusen

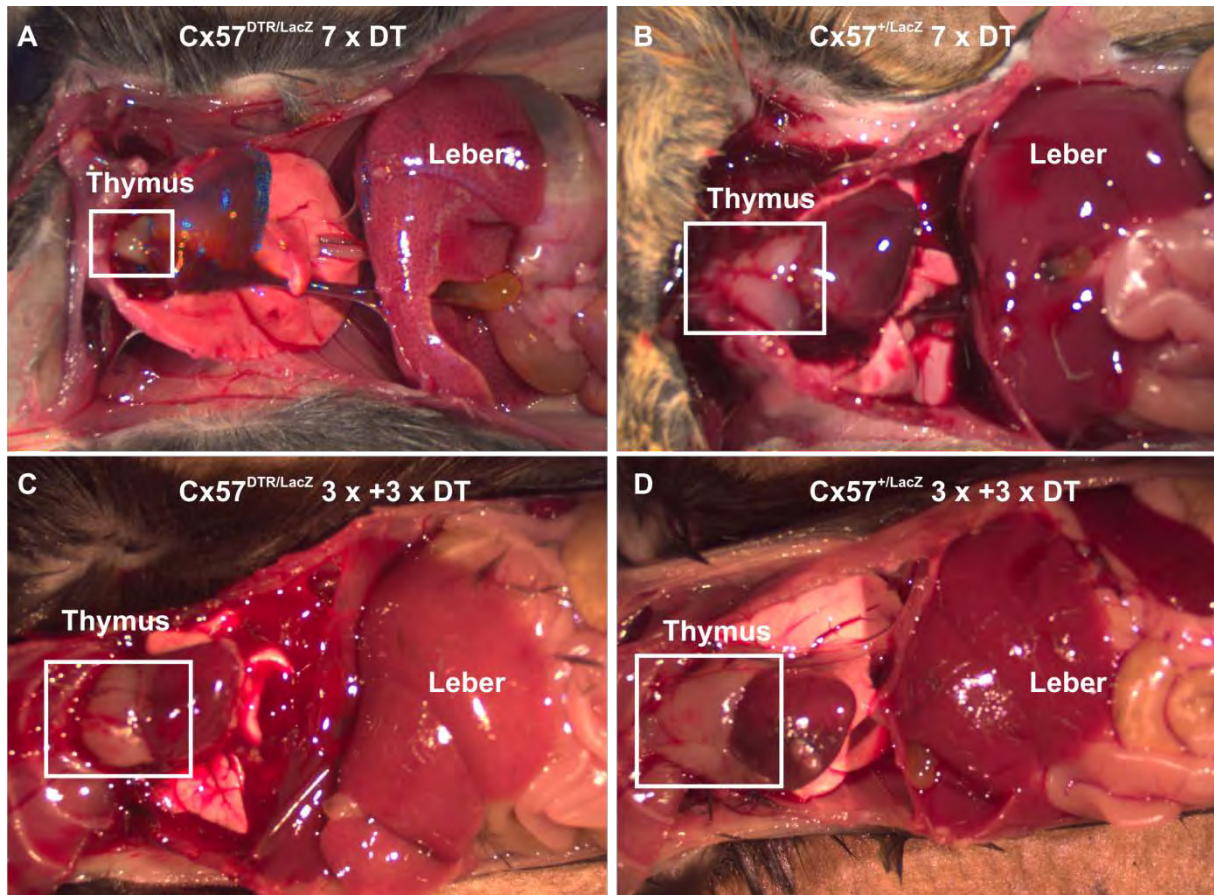
Wie in 4.1.5 erwähnt, starben einige Tiere nach siebentägiger DT Behandlung. Die Überlebensraten unterschiedlicher Genotypen bei unterschiedlichen Injektionsprotokollen fasst Abbildung 4.16 zusammen. Ausschließlich sieben Tage mit 100 ng DT pro Tag behandelte Cx57<sup>DTR/+</sup> und Cx57<sup>DTR/lacZ</sup> Tiere (zusammengefasst unter DTR) weisen eine Sterblichkeit innerhalb der ersten Woche nach der letzten Injektion auf. Nicht betroffen sind dagegen ebenso mit DT behandelte Cx57<sup>+/+</sup> bzw. Cx57<sup>+/lacZ</sup> Geschwister (zusammengefasst unter wt). Der Grund für das Sterben der Tiere muss daher mit der Expression des DT-Rezeptors zusammenhängen. Der Promotor von Cx57 ist in der adulten Maus außer in der Retina noch im Thymus aktiv (Hombach et al., 2004). Der Thymus ist als primäres lymphatisches Organ der Ort der Reifung der T-Lymphozyten. Diese wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein. Diese Thymozyten-Vorläufer zeichnen sich im Gegensatz zu den reifenden und reifen Thymozyten durch Fehlen der beiden Oberflächen Antigene CD4 und CD8 aus (man bezeichnet sie auch als doppelt negative Thymozyten). Im Rahmen der Entwicklung werden dann zunächst beide Antigene exprimiert, man spricht von doppelt positiven Thymozyten. In dieser Phase der Entwicklung findet die Rekombination der T-Zell Rezeptorgene statt. Schließlich reifen die Thymozyten entweder zu einfach CD4 positiven T-Helfer Zellen oder einfach CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen, welche den Thymus verlassen (vergl. Pezzano et al., 2001). Im Folgenden wurde der Thymus von DT-behandelten Mäusen genauer untersucht.



**Abbildung 4.16: Kaplan-Meier Überlebenskurve nach Injektion unterschiedlicher Dosen Diphtherie Toxin.** Sowohl Cx57<sup>DTR/+</sup> und Cx57<sup>DTR/lacZ</sup> (DTR) als auch Cx57<sup>+/+</sup> und Cx57<sup>+/lacZ</sup> Tiere (wt) wurden mit unterschiedlichen Dosen DT behandelt. Bei siebentägiger Behandlung mit 100 ng DT pro Tag starben knapp die Hälfte der untersuchten Tiere (dunkelblau), während alle anderen Gruppen keine Sterblichkeit in der Zeit nach den Injektionen zeigten.

Abbildung 4.17 zeigt einige *in situ* Aufnahmen von über sieben Tage mit 100 ng DT bzw. 3 x + 3 x mit 100 ng DT behandelten Tieren verschiedener Genotypen. Wie deutlich zu erkennen, ist der Thymus der sieben Tage mit DT behandelten Cx57<sup>DTR/+</sup> Maus weniger

als halb so groß wie der des ebenso behandelten Wildtyps. Bei Behandlung mit je drei Injektionen DT im Abstand von zwei Wochen ist dieser Unterschied zwischen  $Cx57^{DTR/+}$  und  $Cx57^{+/+}$  nicht erkennbar. Zusätzlich ist die Leber von DT behandelten  $Cx57^{DTR/lacZ}$  im Vergleich zu  $Cx57^{+/lacZ}$  Tieren verändert. Sie ist nicht mehr, wie für die Leber typisch und in den entsprechenden Kontrollen (Abb. 4.17 B/D) zu erkennen, gleichmäßig dunkel und etwas durchscheinend, sondern heller und gemustert. Die Veränderung der Leber war auch in allen anderen untersuchten  $Cx57^{DTR/+}$  Tieren nach DT-Behandlung zu finden, wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.



**Abbildung 4.17 Auswirkung der Behandlung von Cx57-DTR Tieren mit DT auf den Thymus.** *In situ* Aufnahmen von Mäusen nach siebentägiger (7 x) (A/B) bzw. zweimal dreitägiger Behandlung mit zwei Wochen Unterbrechung (3 x + 3 x) (C/D) mit 100 ng DT pro Tag. Die Tiere wurden drei Tage nach der letzten Injektion geöffnet. Nur im sieben Tage mit DT behandelten  $Cx57^{DTR/lacZ}$  Tier zeigt sich eine deutliche Verkleinerung des Thymus (A), während nach je dreimaliger DT Behandlung im Abstand von zwei Wochen keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen ist (C).

Um die Verkleinerung des Thymus quantitativ zu bestimmen, wurden in einer weiteren Injektionsreihe  $Cx57^{DTR/+}$  Tiere und  $Cx57^{+/+}$  Kontrollen sieben bzw. zehn Tage mit 100 ng DT behandelt. Drei Tage nach der letzten Injektion wurden die Thymi der Tiere präpariert und gewogen. Wie in Tabelle 4.3 dargestellt, gab es große Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren des gleichen Genotyps. So zeigten drei Tiere nach der Behandlung mit DT Krankheitssymptome wie schon beschrieben, wobei eines verstarb und nicht mehr untersucht werden konnte. Deren Thymus war deutlich verkleinert mit nur noch etwa 10-20 % des Gewichtes des Thymus der  $Cx57^{+/+}$  Kontrollen. Bei anderen ebenso behandelten Mäusen des gleichen Genotyps dagegen war keine oder eine nur sehr



geringe Gewichtsabnahme zu erkennen. Sie zeigten zum Zeitpunkt der Analyse keine Krankheitssymptome.

Um festzustellen, ob die Behandlung mit DT auch in Tieren mit unverändertem Thymus zu einer Ablation der Horizontalzellen in der Retina geführt hat, wurde in jedem Tier mit Hilfe einer Calbindin-Färbung der Grad der Ablation in Prozent bestimmt (Tab. 4.3). Es zeigte sich, dass die Ablation in allen untersuchten Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren, auch denen mit unverändertem Thymus, nahezu vollständig war, während die Horizontalzellen in mit DT behandelten Kontrolltieren noch vorhanden waren. Es wurde somit kein direkter Zusammenhang zwischen der Verkleinerung des Thymus und der Ablationsrate der Horizontalzellen in der Retina festgestellt.

OM	Genotyp	Dosis DT	Gewicht des Thymus in mg	Ablation HZ in %	Gesundheitszustand
6216	Cx57 <sup>+DTR</sup>	7 x 100 ng	37,2	100	gesund
6214	Cx57 <sup>+DTR</sup>	7 x 100 ng	46,8	100	gesund
6211	Cx57 <sup>+DTR</sup>	7 x 100 ng	15,8	100	gesund
6221	Cx57 <sup>+DTR</sup>	7 x 100 ng	22,9	100	gesund
6258	Cx57 <sup>+DTR</sup>	10 x 100 ng	7,4	100	krank
6259	Cx57 <sup>+DTR</sup>	10 x 100 ng	10,5	100	krank
4192	Cx57 <sup>+/+</sup>	10 x 100 ng	66,2	0	gesund
4194	Cx57 <sup>+DTR</sup>	10 x 100 ng	61	100	gesund
4177	Cx57 <sup>+DTR</sup>	10 x 100 ng	49,4	95	gesund
9154	Cx57 <sup>+/+</sup>	10 x 100 ng	51,5	0	gesund

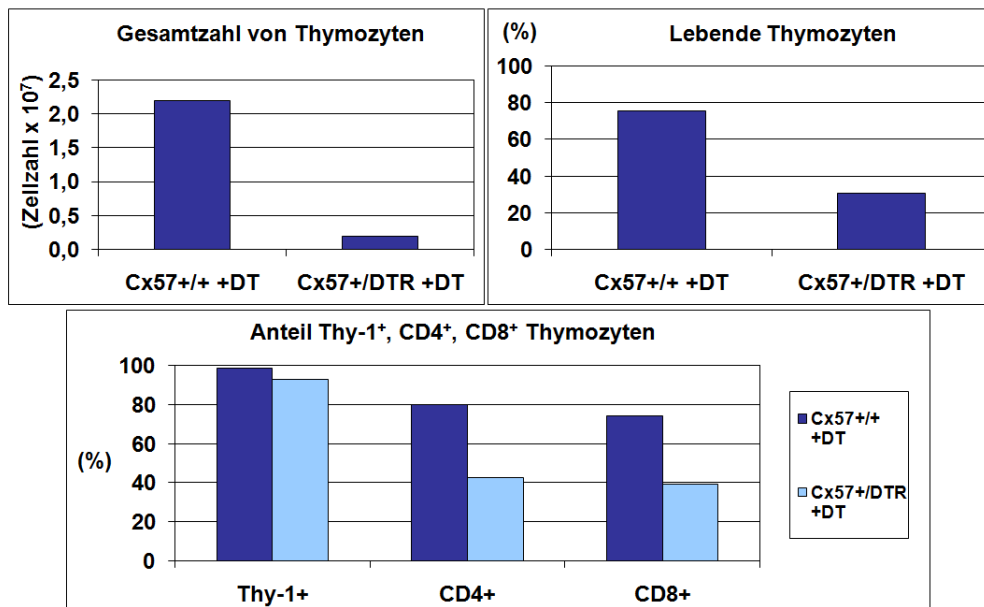
**Tabelle 4.3: Einfluss verschiedener Dosen DT auf den Thymus von Cx57<sup>DTR/+</sup> Mäusen.** Nach Behandlung von sieben bzw. zehn Tagen mit 100 ng DT pro Tag wurden die Tiere drei Tage nach der letzten Injektion getötet, das Gewicht des Thymus bestimmt und die Ablation der Horizontalzellen der Retina mittels Calbindin-Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Eine nahezu vollständige Ablation der Horizontalzellen ist in allen Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren zu beobachten, während es nur in einigen Tieren (6258/6259) zu einer Verkleinerung und damit zu einer Gewichtsreduktion des Thymus kommt. Auf Wildtyptiere hat die Behandlung mit DT keinen Einfluss. Abkürzung: OM Ohrmarke, HZ Horizontalzellen.

Aus dem Thymus kann der Großteil der Zellen über mechanische Homogenisierung vereinzelt und isoliert werden. Diese Zellen wurden im Folgenden sowohl aus Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren mit verkleinertem Thymus nach DT-Gabe als auch aus ebenso behandelten Cx57<sup>+/+</sup> Kontrollen isoliert und analysiert.

In der Zahl der Zellen pro Thymus zeigte sich eine Reduktion von etwa  $2 \times 10^7$  auf  $3 \times 10^6$ , also um etwa 90%, in Cx57<sup>DTR/+</sup> im Vergleich zu Cx57<sup>+/+</sup> (Abb. 4.18 A). Der nicht membrangängige Farbstoff Propidiumjodid kann dazu verwendet werden, tote Zellen von noch lebenden Zellen zu unterscheiden, da er nur in tote Zellen eindringt. Der Anteil gefärbter Zellen und die Intensität der jeweiligen Färbung lassen sich mithilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) bestimmen. Dabei wird für jede einzelne Zelle die Intensität der Fluoreszenz nach Markierung mit einer bestimmten fluoreszenten Sonde (z.B. Propidiumjodid oder Fluoreszenz-markierte Antikörper) bestimmt. Aus der Analyse vieler tausend Zellen wird anschließend der Anteil fluoreszierender Zellen

berechnet. Auch Markierung und gleichzeitiger Nachweis von zwei oder drei unterschiedlichen fluoreszierenden Sonden ist dabei möglich. Nach einer Färbung der isolierten Zellen des Thymus mit Propidiumjodid und anschließender Analyse mittels FACS war der Anteil toter Zellen in DT behandelten Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren deutlich höher als in Cx57<sup>+/+</sup> Kontrollen (Abb. 4.18 B). Um den vom Absterben nach DT-Behandlung betroffenen Zelltyp näher eingrenzen zu können, wurden Antikörper gegen verschiedene charakteristische Oberflächenproteine zur Markierung der verbleibenden lebenden Zellen verwendet. Thy-1 ist ein auf allen Thymozyten vorkommender Marker und färbt unter den isolierten Zellen des Thymus entsprechend alle Thymozyten an (Ledbetter und Herzenberg, 1979). Diese machen den Großteil der isolierten Zellen aus, während dendritische Zellen, Thymus-Epithelzellen und Makrophagen nicht erkannt werden. Nach Färbung mit Thy-1 Antikörpern und einer anschließenden FACS-Analyse zeigte sich, dass der Anteil der Thymozyten an den aus dem jeweiligen Thymus präparierten Zellen in Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren im Vergleich zum Wildtyp minimal reduziert war (Abb. 4.18 C). In beiden Thymi machen die Thymozyten den größten Anteil der gesamten Zellen des Thymus aus.

Die beiden Oberflächenmarker CD4 und CD8 werden dagegen nur von einem Teil der Thymozyten exprimiert (vergl. Pezzano et al., 2001). Bei FACS-Analysen nach einzelner Färbung mit Antikörpern gegen diese Antigene zeigte sich eine Reduktion in der Anzahl CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Zellen im ablatierten Thymus um etwa die Hälfte. Die Behandlung von Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren mit DT führt damit zu einer Verringerung der Zahl der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Thymozyten. Dies weist darauf hin, dass von der Behandlung mit DT vor allem Thymozyten betroffen sind.



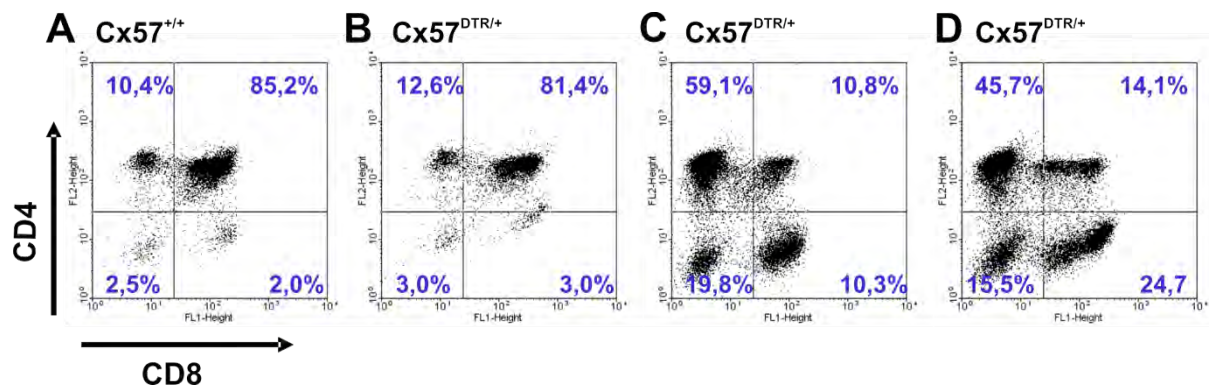
**Abbildung 4.18: Analyse der isolierten Zellen aus dem Thymus von je einem über sieben Tage mit 100 ng DT pro Tag behandelten Tier. (A)** Die Gesamtzahl der aus dem Thymus isolierten Zellen ist bei einem Cx57<sup>DTR/+</sup> Tier im Vergleich zu Cx57<sup>+/+</sup> drastisch reduziert. **(B)** Über Inkubation mit Propidiumjodid wurden die toten Zellen angefärbt und mittels FACS-Analyse der Anteil der lebenden, nicht gefärbten Zellen bestimmt. Dieser ist im Cx57<sup>DTR/+</sup> Tier im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. **(C)** Nach Markierung mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker auf

## 4. Ergebnisse

Thymozyten, wurde der Anteil der für den jeweiligen Marker positiven Zellen ebenfalls mittel FACS Analysen ermittelt. Der Anteil an Thymozyten allgemein (markiert über Thy-1) ist nur wenig verändert, während der Anteil an CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Thymozyten jeweils um die Hälfte reduziert ist [In Kooperation mit S. Temme und Prof. N. Koch, Institut für Genetik, Bonn].

Um herauszufinden, welche der Populationen von Thymozyten von der DT Behandlung betroffen ist, wurde eine Doppelmarkierung der isolierten Zellen des Thymus durchgeführt und nach der Markierung mittels FACS analysiert.

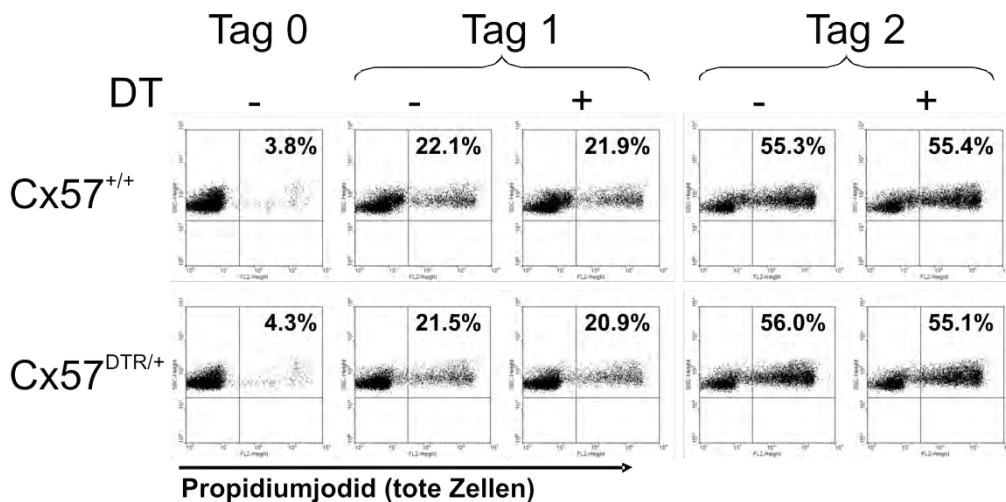
Wie Abbildung 4.19 zeigt, sind im Wildtyp die meisten Zellen (etwa 85 %) doppelt CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>, während etwa 10 % nur CD4<sup>+</sup> sind und 2 % nur CD8<sup>+</sup>. Doppelt negativ sind ebenfalls etwa 2 % (Abb.4.18 A). Die Analysen der drei mit DT behandelten Cx57<sup>DTR/+</sup> Mäuse mittels FACS-Analyse sind in Abbildung 4.19 (B-D) gezeigt. Das erste Tier weist vergleichbare Anteile aller Thymozytenpopulationen zum Wildtyp auf (Abb. 4.19 B), während in den beiden anderen Tieren der Anteil an CD4/CD8 doppelt positiven Zellen drastisch reduziert ist (Abb. 4.19 C/D). Das Verhältnis der drei anderen Populationen zueinander dagegen ist unverändert. Die Reduktion der Population der doppelt CD4/CD8 positiven Thymozyten stimmte mit der Reduktion der Größe des Thymus überein. Diese Ergebnisse zeigen, dass in Tieren, in denen die Behandlung mit DT zu einer deutlichen Reduktion in der Größe des Thymus führt, diese durch eine Reduktion in der Anzahl CD4/CD8 doppelt positiver Zellen hervorgerufen wird.



**Abbildung 4.19: FACS-Analysen von CD4 und CD8 doppelmarkierten Thymozyten aus DT behandelten Cx57<sup>DTR/+</sup> Mäusen.** Cx57<sup>+/+</sup> und Cx57<sup>DTR/+</sup> Mäuse wurden jeweils sieben Tage mit 100 ng DT pro Tag behandelt, die Zellen drei Tage nach der letzten Injektion aus dem Thymus isoliert und mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 doppelt markiert. Mittels FACS-Analyse wurden die verschiedenen Populationen doppelt negativer, doppelt positiver und jeweils einfach positiver Thymozyten ausgezählt. Die Intensitäten der Fluoreszenzmarkierung für CD4 nimmt dabei nach oben zu, die für CD8 nach rechts. In zwei der betrachteten Cx57<sup>DTR/+</sup> Tiere (C/D) ist die Population doppelt CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Thymozyten im Verhältnis zum Wildtyp (A) stark reduziert, während die drei anderen Populationen im Verhältnis zueinander unverändert sind. Das dritte Cx57<sup>DTR/+</sup> Tier (B) zeigt dagegen keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (A) [In Kooperation mit S. Temme und Prof. N. Koch, Institut für Genetik, Bonn].

Die Reduktion in der Größe des Thymus ist somit auf den Verlust der größten Population an Thymozyten (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) zurückzuführen. Die Expression von Cx57 wurde jedoch bisher nur in einer äußerst kleinen Population von möglicherweise CD45 positiven Zellen im Thymus und nicht in Thymozyten nachgewiesen (Dissertation S. Hombach, 2004). Um zu klären, ob diese Analysen möglicherweise fehlerhaft sind und Cx57 und damit auch der DT-Rezeptor in der Cx57<sup>DTR/+</sup> Maus in einer wesentlich größeren Population

exprimiert wird, wurden isolierte Thymozyten direkt mit DT behandelt. Sollte Cx57 und damit der DT-Rezeptor, wenn auch nur in geringer Menge, in einer größeren Anzahl von Thymozyten exprimiert werden, so würde diese Behandlung mit DT zum Tod dieser Zellen führen. In Abbildung 4.20 ist die Analyse von isolierten Thymozyten aus Cx57<sup>DTR/+</sup> und Wildtyp-Tieren nach Inkubation mit 1 µg/ml DT für jeweils zwei Tage dargestellt. Das Verhältnis toter zu lebenden Zellen wurde ebenfalls mittels Propidiumjodidfärbung und anschließender FACS Analyse bestimmt. Der Anteil an toten Thymozyten stieg von Tag zu Tag, von 2 % an Tag 0 über ca. 20 % an Tag 1 auf etwa 50 % an Tag 2. Zwischen den beiden Genotypen sowie zwischen DT behandelten und unbehandelten Zellen bestand jedoch kein Unterschied in den jeweiligen Anteilen toter Zellen.



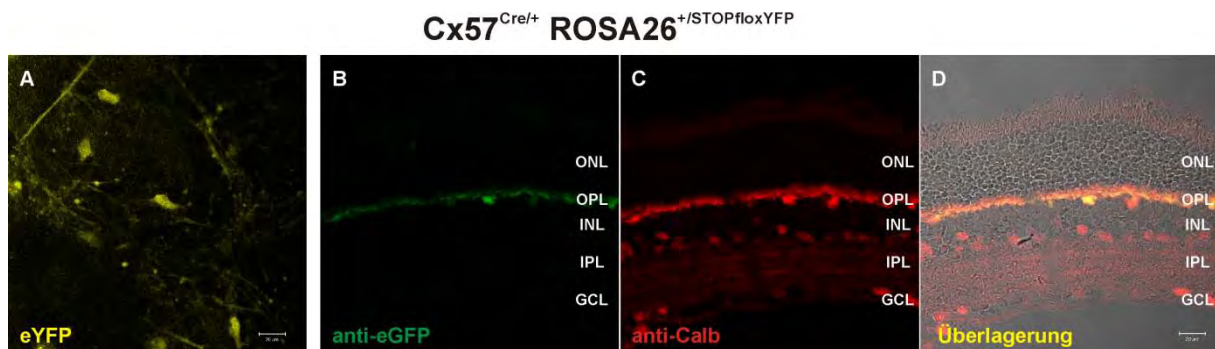
**Abbildung 4.20: Einfluss von DT auf isolierte Thymozyten aus Cx57<sup>DTR/+</sup> Mäusen.** Aus dem Thymus von Cx57<sup>DTR/+</sup> sowie Cx57<sup>+/+</sup> Tieren wurden die Thymozyten isoliert und über zwei Tage in An- bzw. Abwesenheit von 1 µg/ml DT kultiviert. An jedem Tag wurde der Anteil toter Zellen nach Färbung mit Propidiumjodid über eine FACS Analyse bestimmt. Zwischen Zellen aus Cx57<sup>DTR/+</sup> und Cx57<sup>+/+</sup>, sowie zwischen DT behandelten und unbehandelten Zellen zeigte sich kein Unterschied [In Kooperation mit S. Temme und Prof. N. Koch, Institut für Genetik, Bonn].

Als Kontrolle für die Wirksamkeit des DT wurden Zellen einer humanen Karzinomzelllinie (HeLa-Zellen), die den humanen DT-Rezeptor endogen exprimieren (Wright et al., 1984), mit entsprechenden Mengen an DT behandelt. Dies führte zum Tod nahezu aller Zellen innerhalb von 24 h (nicht gezeigt). Damit ist gezeigt, dass der DT-Rezeptor in Cx57<sup>DTR/+</sup> Thymozyten nicht in ausreichender Menge exprimiert sein kann, um das massive Sterben der CD4/CD8 doppelt positiven Thymozyten nach DT-Behandlung zu erklären. Dieser Effekt muss daher durch die Ablation eines anderen Zelltyps oder einen Nebeneffekt der Ablation verursacht worden sein.

#### 4.1.8 Funktion der Cre-Rekombinase in der Cx57Cre-Mauslinie

Nach FLP-Rekombinase vermittelter Deletion der DT-Rezeptor/eGFP Sequenz in der Cx57DTRfrtCre Mauslinie gelangt die Cre-Rekombinase unter die Kontrolle des Cx57-Promotors. Nachdem die Expression der Cre-Rekombinase in der Retina von Cx57<sup>Cre/+</sup> Mäusen gezeigt werden konnte (4.1.3.3) wurde im Folgenden die Funktion der Cre-

Rekombinase untersucht. Dazu wurde eine Reportermauslinie verwendet, bei der eine geflochte Stopp-Kassette und das verstärkt gelb-fluoreszierende Protein (eYFP) hinter dem ubiquitären ROSA26 Promotors stehen (kurz: ROSY). Nach Cre vermittelter Deletion gelangt eYFP unter die Kontrolle des ROSA26 Promotors und zeigt über seine Expression die vorhergegangene Aktivität der Cre-Rekombinase an (Srinivas et al., 2001). Die Aktivität der Cre-Rekombinase wurde so in der Retina von  $Cx57^{Cre/+}$  ROSA26<sup>+/STOPfloxYFP</sup> Mäusen untersucht. Es zeigte sich in Aufsicht auf die lebende Retina eYFP-Fluoreszenz in einem Zelltyp mit großem Soma und weitreichenden dendritischen oder axonalen Ausläufern, was der Morphologie von Horizontalzellen der Maus entspricht (Abb. 4.21 A). In Kryoschnitten konnte die Eigenfluoreszenz nach Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd nicht erhalten werden (nicht gezeigt). Daher wurde das eYFP Protein mithilfe eGFP spezifischer Antikörper nachgewiesen, wobei diese aufgrund der geringen Unterschiede zwischen eGFP und eYFP beide Proteine gleich gut erkennen. In 14 µm dicken Kryoschnitten konnten deutliche eGFP-Signale in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) nachgewiesen werden (Abb. 4.21 B), die mithilfe von Calbindin-Koimmunfluoreszenzanalysen als Horizontalzellen identifiziert werden konnten (Abb. 4.21.C/D). Zusätzlich ist ein schwaches eGFP-Signal in der äußeren nukleären Schicht (ONL) in vereinzelt Zellen zu erkennen (Abb. 4.21 B). Die Aktivität der Cre-Rekombinase in Horizontalzellen der Retina von  $Cx57^{Cre/+}$  Mäusen ist damit gezeigt. Ob es zusätzlich zu einer unspezifischen Expression der Cre-Rekombinase in einem anderen Zelltyp der Retina kommt, lässt sich anhand dieser Analysen jedoch nicht endgültig klären.



**Abbildung 4.21 Aktivität von Cx57-Cre in der Retina.** Mithilfe einer ROSA26-STOPfloxYFP-Reporter Mauslinie (ROSY) wurde die Horizontalzell-spezifische Aktivität der Cre-Rekombinase in  $Cx57^{Cre/+}$  Tieren durch die Eigenfluoreszenz des eYFP in Aufsicht auf lebende Retina (**A**) und mithilfe eGFP-spezifischer Antikörper in 14 µm Kryoschnitten gezeigt (**B-D**). Der eGFP positive Zelltyp wurde mittels Calbindin-spezifischer Antikörper als Horizontalzellen identifiziert (**C/D**).

## 4.2 Analysen der Kanaleigenschaften von Connexin57

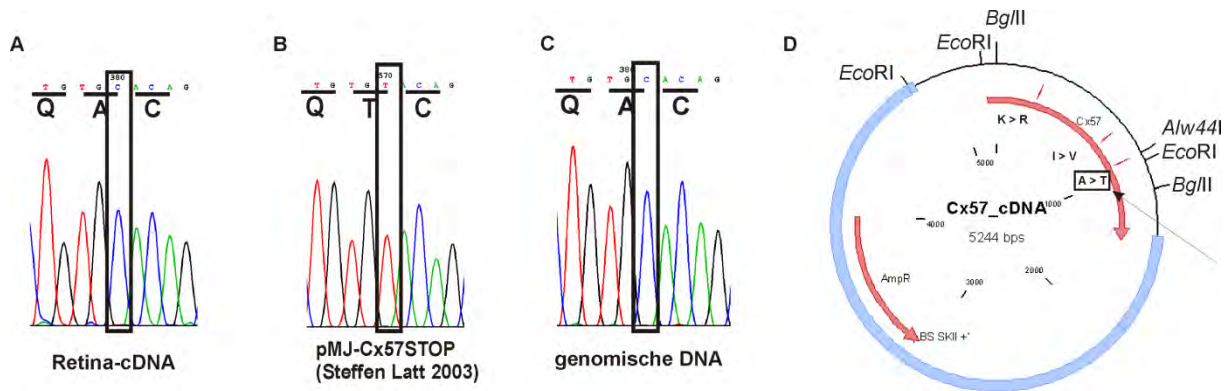
Connexin57 (Gja10) wurde vor zehn Jahren als Protein mit 505 Aminosäureresten von ca. 57 kDa beschrieben, das, wie für die meisten Connexine üblich, auf einem Exon (Exon 2) kodiert ist. Diese Sequenz wurde verwendet, um die Kanaleigenschaften von Cx57 in HeLa-Zellen genauer zu untersuchen (Manthey et al., 1999).

Bei der weiteren Untersuchung der Expression von Cx57 im Rahmen der Herstellung einer Cx57-lacZ Reportermauslinie wurde jedoch festgestellt, dass Cx57 auf zwei Exons kodiert ist und die dafür notwendige Spleißstelle in dem für den C-Terminus kodierenden Bereich liegt. Dadurch werden die ursprünglich letzten 25 Aminosäurereste auf Exon 2 durch auf Exon 3 kodierte 12 neue Aminosäurereste ersetzt. Es wurde gezeigt, dass diese Form von Cx57 in der Retina exprimiert wird, während die ungespleißte Form nicht vorhanden ist (Hombach et al., 2004).

Im Folgenden wurde im Rahmen mehrerer Diplom- und Doktorarbeiten erfolglos versucht, eine neue stabil exprimierende HeLa-Zelllinie von Cx57, mit entsprechend verändertem C-Terminus, herzustellen (Diplomarbeit S. Latt 2003, Dissertation S. Hombach 2004, Dissertation K. Wellershaus 2006).

### 4.2.1 Die Cx57-Sequenz

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein weiterer Versuch unternommen werden, eine stabile Cx57-HeLa Zelllinie zu erzeugen. Zuvor wurde die Sequenz von Cx57 genauer untersucht. Über Sequenzierungen der Cx57-cDNA aus der Retina sowie der genomischen DNA von Cx57 wurden einige Fehler in der bis dahin verwendeten Sequenz (z.B. pMJ-Cx57STOP, Diplomarbeit S. Latt, 2003) entdeckt, die in drei Fällen zu einem Aminosäureaustausch führen (Lysin110 → Arginin, Isoleucin272 → Valin und Alanin330 → Threonin, Abb. 4.22). Ein zusätzlicher Vergleich mit der genomischen Maus-Datenbank (NCBI) bestätigte die Richtigkeit der Sequenzierungen. So war eine Neuklonierung des entsprechenden Bereiches in HeLa-Expressionsvektoren notwendig. Unter Verwendung der *Bgl*II und *Eco*RI Restriktionsschnittstellen wurde die fehlerhafte Sequenz in allen Cx57 Expressionsvektoren gegen die korrekte mittels PCR amplifizierte Sequenz aus der Cx57 cDNA ausgetauscht (Zur genauen Beschreibung der Klonierung siehe Methoden Kap. 3.6.1).



**Abbildung 4.22: Ermittlung der korrekten Sequenz von Cx57.** Das über PCR amplifizierte Exon 2 von Cx57 aus retinaler cDNA bzw. genomischer DNA sowie die bis dahin verwendete Sequenz im Cx57-Expressionsvektor (pMJ-Cx57STOP, Diplomarbeit S. Latt, 2003) wurden sequenziert (AGOWA, Berlin). **(A-C)** zeigt den jeweiligen Abschnitt der Sequenzierung mit einer Mutation von C990T was zur Deletion einer *A/w441* Restriktionsschnittstelle und zum Austausch von Alanin zu Threonin (A330T) führt. **(D)** Die Lage der drei identifizierten ausgetauschten Aminosäuren K110R, I272V und A330T ist im Vektor pCx57-cDNA dargestellt. Die A-C entsprechende Mutation von ist durch einen Pfeil markiert.

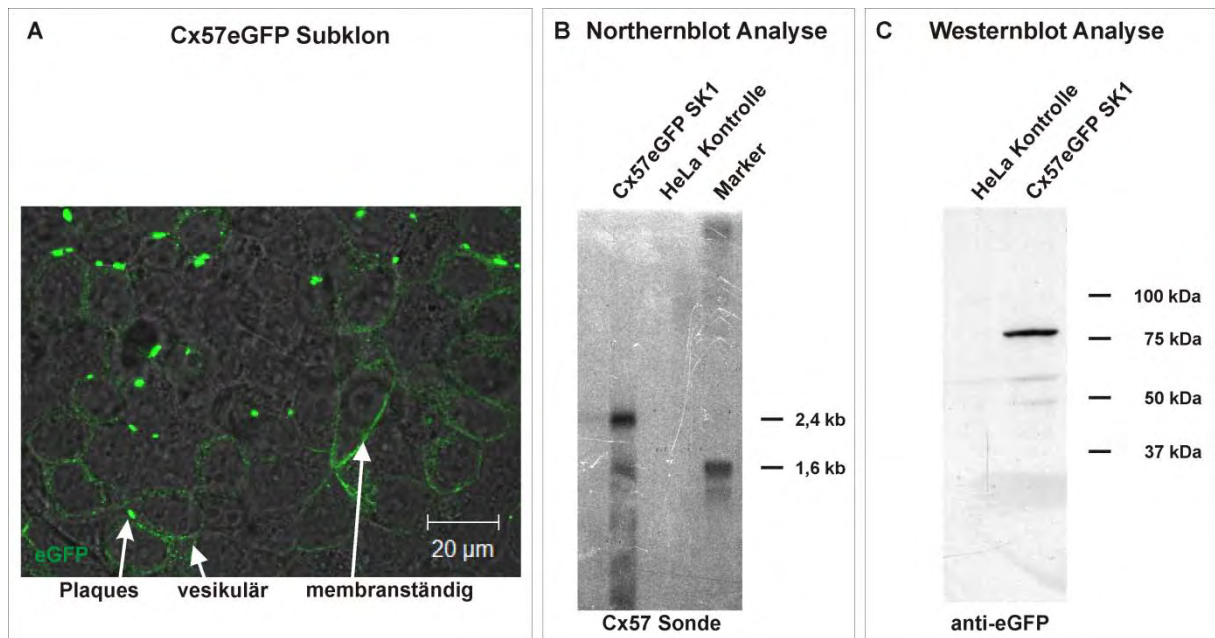
#### 4.2.2 Herstellung stabil Cx57eGFP exprimierender HeLa-Zellen

Zunächst wurde mithilfe des neuen Expressionsvektors für ein Fusionsprotein aus Cx57 und eGFP (pMJ-Cx57GOneu) eine Transfektion in kopplungsdefiziente HeLa-Zellen (Elfgang et al., 1995) durchgeführt. Nach etwa zehntägiger Selektion entstanden einige hundert Klone, von denen ca. 100 isoliert und analysiert wurden. Darunter wurden einige Klone identifiziert, die Cx57eGFP exprimierten, jedoch nur in ca. 10 % der Zellen. Zur Erhöhung dieses Anteils wurde eine Subklonierung durchgeführt. Dazu wurden aus durch Verdünnung vereinzelt Zellen eines Cx57eGFP positiven Klons erneut Klone wachsen lassen, welche wiederum isoliert und analysiert wurden. Dies führte zu Subklonen mit Expression von Cx57eGFP in über 80% der Zellen. Über Wochen der Kultivierung der Subklone sank dieser Anteil jedoch wieder. In Horizontalzellen wird ein Gap Junction Halbkanal vermutet, der in der negativen Rückkopplung zu den Photorezeptoren eine wichtige Rolle spielen soll (Kamermans et al., 2001; Fahrenfort et al., 2004). So bestand die Möglichkeit, dass Cx57, als einziges bisher identifiziertes Connexin in Horizontalzellen der Maus (Hombach et al., 2004), Halbkanäle bilden könnte, die, falls unkontrolliert geöffnet, für die Instabilität der Cx57eGFP HeLa-Zellen verantwortlich sein könnten. Halbkanäle anderer Connexine sind meist Calcium-abhängig und werden nur bei geringen extrazellulären Calciumkonzentrationen geöffnet (vergl. Evans et al., 2006). Um mögliche Cx57-Halbkanäle zu schließen, wurde daher ein Teil der Zellen eines Cx57eGFP Subklons über sechs Wochen in Medium mit zehnfach erhöhter Calcium-Konzentration kultiviert, um mögliche Halbkanäle zu schließen. Die Zugabe von Calcium zum Medium hielt den Anteil Cx57eGFP exprimierender Zellen stabil, während es in normal kultivierten Zellen zu einer drastischen Reduktion des Expressionslevels kam (nicht gezeigt).

## 4. Ergebnisse

Die Expression von Cx57eGFP wurde zunächst direkt über die Fluoreszenz des eGFP analysiert. Das Fusionsprotein gelangte in stabil exprimierenden HeLa-Zellen in die Plasmamembran und verursachte dort, wie für Connexine typisch, punktuelle Signale. Daneben ist Cx57eGFP jedoch auch in vesikulären Strukturen im Zytoplasma und in einigen Zellen gleichmäßig verteilt in der Plasmamembran zu finden (Abb. 4.23 A).

Zusätzlich wurde die Expression von Cx57eGFP auf RNA- und auf Proteinebene untersucht. Für Northernblot-Analysen wurde die Gesamt-RNA aus Cx57eGFP HeLa-Zellen gewonnen und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Mithilfe einer PCR-amplifizierten Sonde gegen Cx57 wurde die mRNA von Cx57eGFP nachgewiesen. Wie Abbildung 4.23 B zeigt, ist ein deutliches Signal bei etwa 2,4 kb zu erkennen, was der erwarteten Größe der Cx57eGFP mRNA entspricht. In Kontrollzellen eines nicht Cx57 exprimierenden Klons nach Transfektion mit Cx57IRES-eGFP (vergl. Kap. 4.2.3) konnte diese nicht nachgewiesen werden.



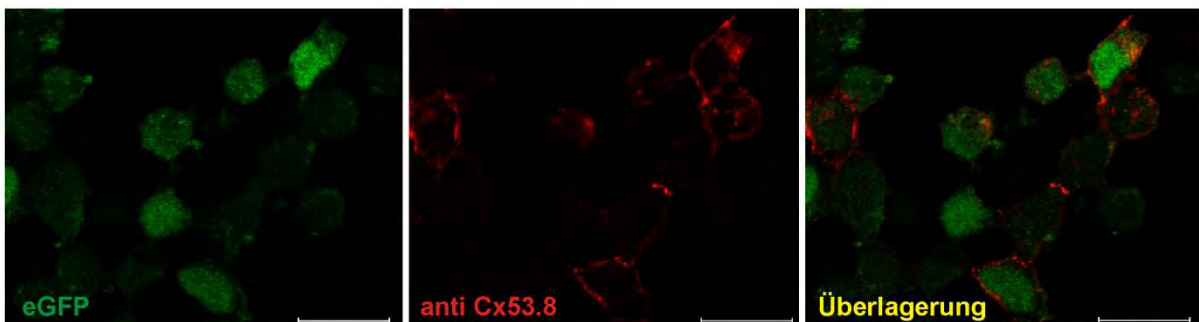
**Abbildung 4.23: Expressionsanalyse von Cx57eGFP in stabil transfizierten HeLa-Zellen.** (A) Das Fusionsprotein aus Cx57 und eGFP wurde anhand der Fluoreszenz des eGFP direkt in lebenden Zellen nachgewiesen. Es ist in Plaque-ähnlichen Strukturen, als gleichmäßiges Signal in der Plasmamembran und in zytoplasmatischen Strukturen zu finden. (B) Zur Analyse des Cx57eGFP Transkriptes wurde die Gesamt-RNA isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran gebロットet. Mithilfe einer radioaktiv markierten Sonde gegen Cx57 konnte ein Transkript von ca. 2,4 kb in nachgewiesen werden. (C) Aus einem über SDS-PAGE aufgetrennten Proteinlysate konnte mittels Immunoblot-Analyse die Expression von Cx57eGFP über eine spezifische, ca. 80 kDa große Bande mittels eGFP spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Zur Immunoblot-Analyse wurden Proteinlysate aus Cx57eGFP Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und gebロットet. Mithilfe von eGFP spezifischen Antikörpern konnte das Fusionsprotein mit einer Größe von 80 kDa nachgewiesen werden (Abb. 4.25 C). Es traten schwache unspezifische Banden bei ca. 60 kDa und 50 kDa auf, die jedoch ein wenig schwächer ebenfalls in den Kontrolllysaten zu finden sind. Damit konnte die Expression des Cx57eGFP Fusionsproteins in diesem Subklon sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.



### 4.2.3 Transfektion von Cx57 ohne eGFP-Markierung

Um den Cx57-Kanal ohne den Einfluss einer möglicherweise störenden C-terminalen eGFP-Markierung untersuchen zu können, wurden Transfektionen mit den eukaryotischen Expressionsplasmiden pMJ-Cx57STOPneu und pMJ-Cx57IRESeGFP durchgeführt. Während pMJ-Cx57STOPneu ausschließlich die Expression von Cx57 ermöglicht, wird durch pMJ-Cx57IRESeGFP die Expression von Cx57 und eGFP von einer gemeinsamen mRNA mithilfe einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES-Sequenz) bewirkt. So können im Idealfall transfizierte Klone direkt über die Fluoreszenz des dann zytoplasmatischen eGFP identifiziert werden. Nach transienter Transfektion von HeLa bzw. N2A-Zellen (neuronale Mauszelllinie, Olmsted et al., 1970) konnte sowohl die eGFP-Fluoreszenz mittels Fluoreszenzmikroskopie als auch das Vorhandensein von Cx57 in Immunfluoreszenzanalysen mittels Cx57-spezifischen Antikörpern (anti-Cx53.8, Cx57 ortholog des Karpfen; zur Verfügung gestellt von Prof. U. Janssen-Bienhold, Oldenburg) nachgewiesen werden (Abb. 4.24). Mehrere Versuche, stabile Klone mit diesen Vektoren herzustellen, schlugen fehl. In den folgenden elektrophysiologischen Untersuchungen wurden daher transiente Transfektanten von Cx57IRESeGFP verwendet. Diese zeigten keine Unterschiede zu den an der Cx57eGFP-HeLa Zelllinie gemessenen Daten (Prof. F. Bukauskas, persönliche Mitteilung).



**Abbildung 4.24: Transiente Expression von Connexin57 und eGFP in N2A-Zellen.** Nach transienter Transfektion von N2A-Zellen mit dem Vektor pMJ-Cx57IRESeGFP wurden die Zellen nach 48 h fixiert und mit Hilfe von Antikörpern gegen das zu Cx57 orthologe Karpfen-Connexin Cx53.8 nachgewiesen. N2A-Zellen zeigten Fluoreszenz von eGFP (grün) im Zytoplasma und Immunfluoreszenzsignale für Cx57 (rot) in der Kontaktmembran zwischen verschiedenen Zellen. Der Maßstab entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

### 4.2.4 Analyse des Farbstofftransfers durch Cx57eGFP Kanäle

Die Funktion von Gap Junctions, aufgebaut aus bestimmten Connexinen, kann über Injektion von kleinen, nicht membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffen oder anderen Molekülen in eine Zelle bestimmt werden, die über Gap Junctions an benachbarte Zellen weitergegeben werden. Dies lässt Rückschlüsse auf die Selektivität eines bestimmten Gap Junction Kanals in Bezug auf Größe oder Ladung der permeablen Stoffe zu. Als Farbstoffe kommen kleine, meist geladene Moleküle wie Ethidiumbromid (Molekulargewicht MW 314, Ladung  $z = +1$ ), Propidiumjodid (MW 414,  $z = +1$ ), 4',6-

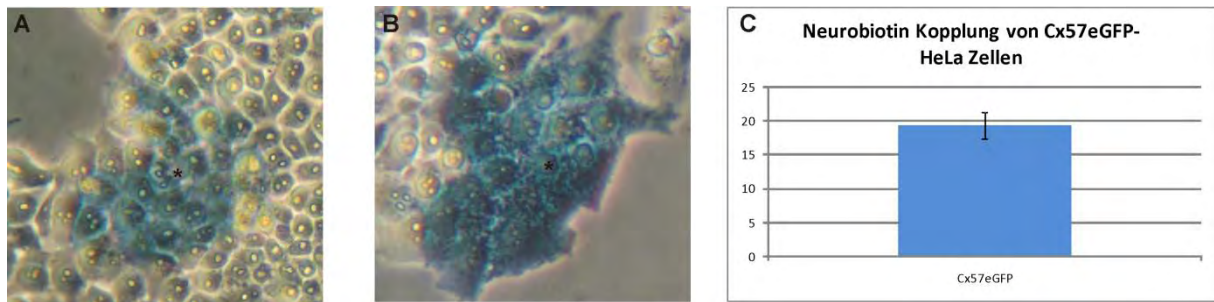
Diamidino-2-phenylindol (DAPI, MW 279,  $z = +1$ ), Lucifer Yellow (MW 443,  $z = -2$ ) oder Alexa Fluor<sup>350</sup> (MW 326,  $z = -1$ ) zum Nachweis von Gap Junction vermittelter Kopplung zum Einsatz (Bukauskas et al., 2000). Als zuverlässiges und relativ kleines Gap Junction permeables Molekül wird zusätzlich Neurobiotin (MW 287,  $z = +1$ ) verwendet, dass mit Hilfe der Biotin-Avidin Wechselwirkung über eine Avidin-gekoppelte Peroxidase nachgewiesen werden kann.

Zur Analyse der Farbstoffselektivität von Cx57eGFP Gap Junction Kanälen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. F. Bukauskas (New York) jeweils unterschiedliche Farbstoffe in zufällig gebildete Zellpaare mit wenigstens einem sichtbaren Cx57eGFP-Gap Junction Plaque zwischen beiden Zellen injiziert. Es zeigte sich, dass Cx57eGFP Kanäle durchlässig für Alexa Fluor<sup>350</sup>, Ethidiumbromid und DAPI sind (Abb. 4.25). Bei den beiden Farbstoffen Lucifer Yellow und Propidiumjodid wurde unter normalen Bedingungen zunächst kein Farbstofftransfer nachgewiesen (nicht gezeigt). Wie im Folgenden dargestellt, erhöht eine intrazelluläre Alkalisierung mittels Ammoniumchlorid die Öffnungswahrscheinlichkeit von Cx57eGFP Kanälen deutlich. Daher wurden die Zellen vor der Injektion mit Lucifer Yellow und Propidiumjodid zusätzlich 30 Minuten mit Ammoniumchlorid inkubiert, um eine größere Anzahl von Kanälen zu öffnen. Intrazelluläre Alkalisierung ermöglichte den Transfer von Lucifer Yellow durch Cx57eGFP Kanäle, während sie für Propidiumjodid auch nach Behandlung mit Ammoniumchlorid nicht permeabel waren (Abb. 4.27).



**Abbildung 4.25: Analyse der Farbstoffkopplung von Cx57eGFP Kanälen.** Zufällige Zellpaare stabil Cx57eGFP exprimierender HeLa Zellen wurden mit Alexa Fluor<sup>350</sup> (A), Lucifer Yellow (B), Ethidiumbromid (C), DAPI (D) und Propidiumjodid (E) injiziert. Es zeigte sich Transfer von Alexa Fluor<sup>350</sup>, Ethidiumbromid und DAPI unter normalen Bedingungen von der injizierten Zelle (\*\*) in die benachbarte Zelle (\*). Ein Transfer von Lucifer Yellow konnte erst nach vorheriger Alkalisierung des Zellinneren mittels Ammoniumchlorid (10 mM) nachgewiesen werden. Propidiumjodid wurde weder unter normalen Bedingungen noch nach intrazellulärer Alkalisierung über Cx57eGFP Kanäle weitergegeben [In Zusammenarbeit mit Prof. F. Bukauskas, New York].

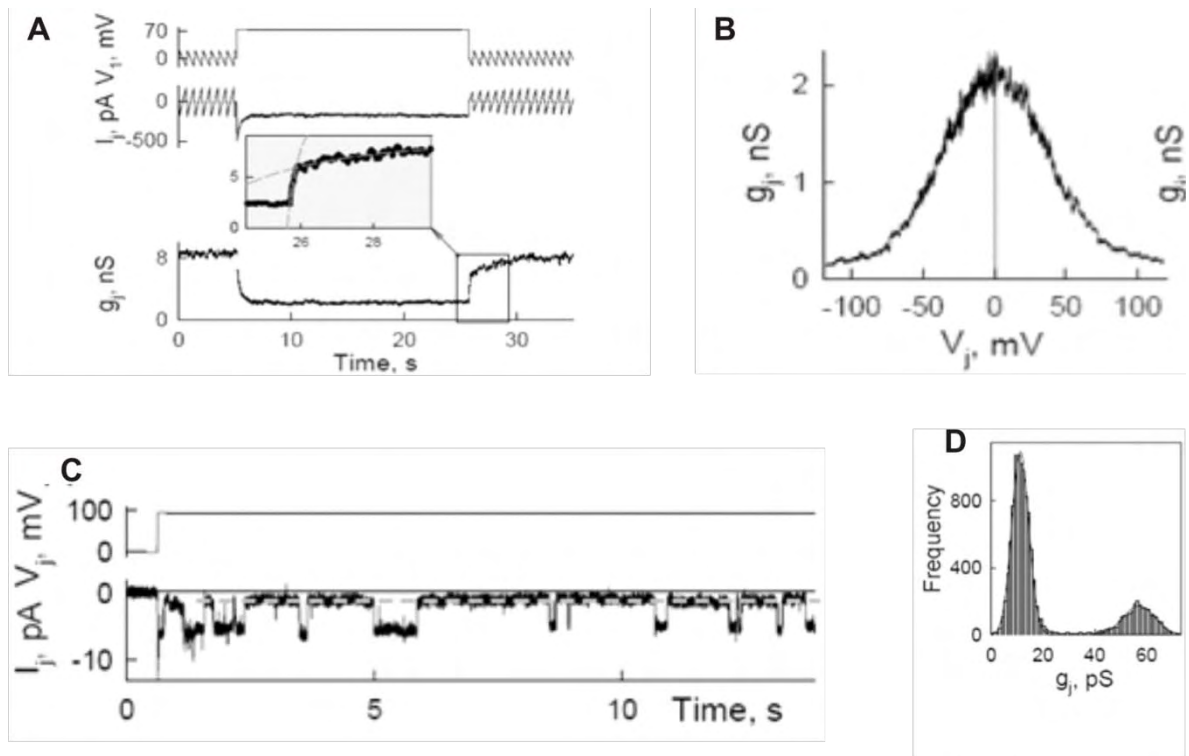
Zusätzlich wurde der Transfer von Neurobiotin zwischen Cx57eGFP exprimierenden HeLa-Zellen untersucht. Wie Abbildung 4.26 zeigt, wird Neurobiotin über Cx57eGFP Gap Junctions an benachbarte Zellen effektiv weitergegeben. Die durchschnittliche Anzahl neurobiotin-positiver Zellen beträgt demnach ohne vorherige intrazelluläre Alkalisierung etwas weniger als zwanzig Zellen pro injizierter Ausgangszelle, was etwa einem Siebtel der durchschnittlichen Zahl gekoppelter Zellen von Connexin43 entspricht (Dobrowolski et al. 2007).



**Abbildung 4.26: Neurobiotintransfer zwischen Cx57eGFP stabil transfizierten HeLa-Zellen.** (A/B) Neurobiotin wurde durch Iontophorese in stabil Cx57eGFP exprimierende HeLa-Zellen injiziert (\*) und mittels einer Avidin gekoppelten Peroxidase über ein Substrat (Histogreen) nachgewiesen, das zu einem blauen Produkt umgesetzt wird. (C) Die durchschnittliche Anzahl gekoppelter Zellen nach Mikroinjektion von Neurobiotin liegt nach statistischer Auswertung bei etwa zwanzig Zellen.

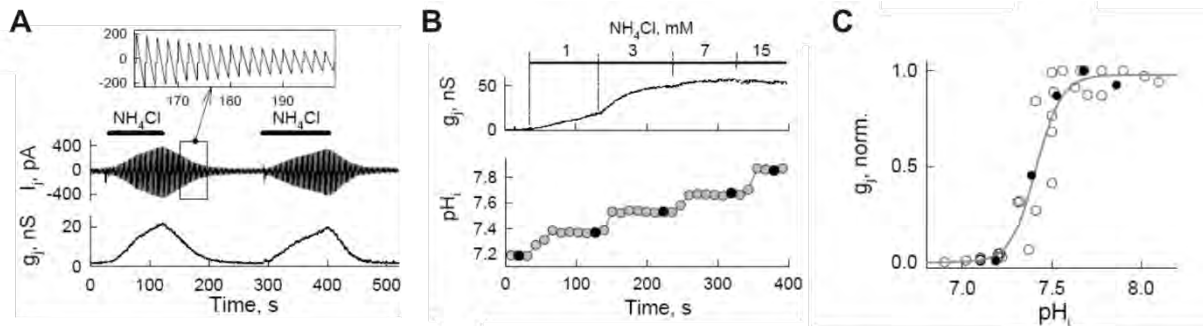
#### 4.2.5 Analyse der elektrophysiologischen Eigenschaften von Connexin57eGFP Kanälen

Über „double Voltage Clamp“ Analysen kann man im Gegensatz zu Farbstoff-transferanalysen weitere Charakteristika von Gap Junction Kanälen wie Spannungsabhängigkeit, Einzelkanalleitfähigkeit und Öffnungswahrscheinlichkeit bestimmen. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit Prof. F. Bukauskas (New York) in Zellpaaren mit sichtbaren Cx57eGFP Plaques die direkte elektrische Kopplung gemessen. Unter normalen Perfusionsbedingungen konnte ein auf Cx57eGFP Kanäle zurückzuführender schwacher Strom gemessen werden. Die gesamte Leitfähigkeit ( $g_j$ ) dieser Kanäle in Cx57eGFP HeLa-Zellen war um den Faktor 100 geringer als zwischen Cx43eGFP HeLa-Zellen (Bukauskas et al., 2000). Cx57eGFP Kanäle zeigten eine Spannungsabhängigkeit in Form einer Glockenkurve mit der höchsten Leitfähigkeit um 0 V (Abb. 4.27 B), berechnet aus der angelegten Spannung  $V_j$  und dem gemessenen Strom  $I_j$  (Abb. 4.27 A). Diese entspricht im Wesentlichen den Beobachtungen für den Cx57-Kanal mit altem C-Terminus (Manthey et al., 1999). Die Einzelkanalleitfähigkeit, berechnet aus der angelegten Spannung  $V_j$  und dem gemessenen Strom von einzelnen Cx57eGFP Kanälen (Abb. 4.27 C), beträgt 58 pS im vollständig geöffneten Zustand und 11 pS im Residualzustand (Abb. 4.27 D). Aus der Intensität der Fluoreszenz des Plaques zwischen zwei Zellen, über die die Anzahl an Kanälen im Plaque bestimmt wurde, und der gemessenen Leitfähigkeit ergab sich analog zu Bukauskas et al. (2000) ein Anteil an geöffneten Kanälen von  $0,5 - 0,6 \times 10^{-4}$ . Dieser ist deutlich geringer als der Anteil an geöffneten Kanälen für Cx43eGFP mit etwa 0,15 (Bukauskas et al., 2000).



**Abbildung 4.27: Elektrophysiologische Charakterisierung von Cx57eGFP Gap Junction Kanälen.** (A) zeigt ein Beispiel für die Spannungsabhängigkeit von Cx57eGFP-Kanälen. Die Veränderung der Leitfähigkeit  $g_j$  berechnet aus der angelegten Spannung  $V_j$  und dem gemessenen Strom  $I_j$  sinkt als Antwort auf eine Erhöhung der Spannung auf  $V_j = +70$  mV. Die Rückkehr der Leitfähigkeit in den Ausgangszustand nach erneuter Veränderung von  $V_j$  zeigt zwei Phasen, einen schnellen und einen langsamen Anteil (vergrößerter Ausschnitt). (B) Die Leitfähigkeit  $g_j$  von Cx57eGFP-Kanälen ist für ein Zellpaar in Abhängigkeit von der angelegten Spannung dargestellt. Die Leitfähigkeit ist ohne angelegte Spannung am höchsten und fällt zu beiden Seiten bei Veränderung von  $V_j$  ab. (C) zeigt das Öffnen und Schließen einzelner Cx57eGFP Kanäle zwischen zwei Zellen. Dazu wurde bei einem Zellpaar mit nur wenigen geöffneten Kanälen ein Spannungsschritt zu  $V_j = +95$  mV angelegt. Die meisten Veränderungen des Stroms gehen vom Residualzustand (gestrichelte Linie) in den geöffneten Zustand. (D) Eine Auftragung der Häufigkeit der Unterschiede in der Leitfähigkeit bei diesen Veränderungen zeigt eine Leitfähigkeit von etwa 11 pS im Residualzustand und etwa 58 pS im geöffneten Zustand. Die bestimmte Einzelkanalleitfähigkeit beträgt damit 58 pS im vollständig geöffneten Zustand [in Zusammenarbeit mit Prof. F. Bukauskas, New York].

Um den Anteil an geöffneten Cx57eGFP Kanälen zu erhöhen wurde mithilfe von Ammoniumchlorid (10 mM) der intrazelluläre pH-Wert angehoben, da in einer kürzlich erschienenen Publikation ein Einfluss des pH-Wertes auf die Kopplung zwischen Horizontalzellen beschrieben wurde (Jouhou et al., 2007). Wie in Abbildung 4.28 zu sehen, erhöhte diese Behandlung die Leitfähigkeit von Cx57eGFP Kanälen deutlich um das bis zu 100fache. Dieser Effekt war reversibel. Durch Einsatz des intrazellulären pH-Indikators 2',7'-Bis'(carboxyethyl)-5-(6')-Carboxyfluorescein (BCECF) wurde bei unterschiedlichen Konzentrationen von Ammoniumchlorid der intrazelluläre pH-Wert sowie die Leitfähigkeit zwischen den jeweiligen Zellpaaren bestimmt. Aus der Kombination der Leitfähigkeit und des intrazellulären pH-Werts ergibt sich eine steil ansteigende sigmoide Verlaufskurve mit einem  $pK_A = 7,42$ , wobei Cx57eGFP-Kanäle bei Erhöhung des pH-Wertes geöffnet werden. Der Cx57eGFP Kanal kann also im Bereich um pH 7,4 sehr direkt über den intrazellulären pH-Wert reguliert werden.

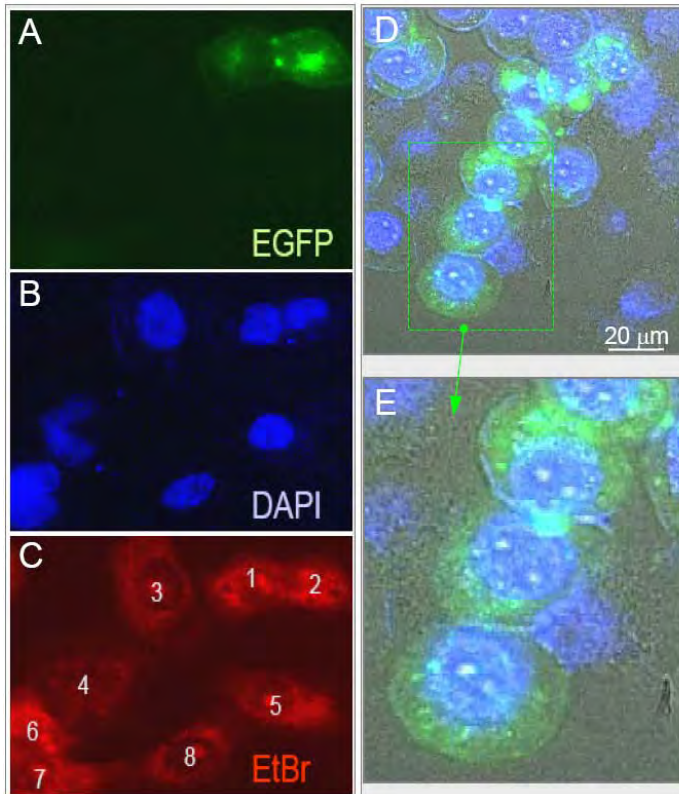


**Abbildung 4.28: Einfluss der intrazellulären Protonenkonzentration auf die Kopplung von Cx57eGFP Gap Junctions.** (A) zeigt die Dynamik des gemessenen Stroms  $I_j$  und der sich daraus ergebenden Leitfähigkeit  $g_j$  bei sich wiederholenden Veränderungen des angelegten Spannung von +20 mV bis -20 mV als Antwort auf eine wiederholte Behandlung des Zellpaares mit 10 mM Ammoniumchlorid. Die Veränderung des intrazellulären pH-Wertes führte zur Erhöhung des gemessenen Stroms und der Leitfähigkeit der Cx57eGFP Kanäle. (B) zeigt die mittels BCECF bestimmten Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes bei Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ammoniumchlorid. (C) Die Veränderung der Leitfähigkeit der Cx57eGFP-Kanäle aus sechs verschiedenen Experimenten wurde in Abhängigkeit des intrazellulären pH-Wertes bestimmt. Die Ausgleichskurve (durchgezogene Linie) zeigt einen steil sigmoiden Verlauf mit einem  $pK_A = 7,42$  [in Zusammenarbeit mit Prof. F. Bukauskas, New York].

#### 4.2.6 Analyse der Halbkanalaktivität von Connexin57

Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, gibt es aufgrund der Instabilität der Cx57eGFP exprimierenden HeLa-Zellen und deren Abhängigkeit von der extrazellulären Calciumkonzentration Hinweise auf das Vorhandensein von Cx57eGFP Halbkkanälen.

In Zusammenarbeit mit Prof. F. Bukauskas (New York) wurden dazu Cx57eGFP HeLa-Zellen und HeLa-Wildtyp Zellen mit den zuvor als Cx57eGFP Gap Junction permeabel identifizierten Farbstoffen DAPI und Ethidiumbromid inkubiert. Dabei wurden beide Farbstoffe einmal in normalem Medium und einmal in Calcium-freier modifizierter Krebs-Ringerlösung (MRK-Lösung) mit zusätzlich 5 mM Ammoniumchlorid zu einer Mischkultur aus HeLa Wildtyp und HeLa-Cx57eGFP Zellen gegeben. In normalem Medium zeigte sich kein Unterschied in der Farbstoffaufnahme zwischen HeLa Wildtyp und HeLa-Cx57eGFP Zellen, weder für Ethidiumbromid noch für DAPI (Abb. 4.29 A-C). In Calcium-freier MRK-Lösung mit 5 mM Ammoniumchlorid dagegen wird DAPI von Cx57eGFP HeLa-Zellen, zu erkennen am Fluoreszenzsignal von Cx57eGFP-Plaques zwischen den Zellen, deutlich besser aufgenommen, als von den umgebenden HeLa-Wildtyp Zellen ohne eGFP Signal (Abb. 4.29 D/E). Ethidiumbromid dagegen wird nicht aufgenommen (nicht gezeigt). Bei längerer Inkubation unter diesen Bedingungen (ca. 25 Minuten) schwellen die Cx57eGFP exprimierenden Zellen an und werden rund, deutlich zu erkennen am Unterschied zu HeLa-Wildtyp Zellen. Eine Aufnahme des Farbstoffs DAPI konnte in reduziertem Umfang bei Calciumkonzentrationen von 0,1 mM und 0,3 mM beobachtet werden, ab 0,5 mM inhibiert extrazelluläres Calcium Cx57eGFP-Halbkkanäle jedoch komplett (nicht gezeigt). Damit wurde demonstriert, dass Cx57eGFP in HeLa-Zellen funktionelle Halbkkanäle bildet, die sich bei entsprechendem intrazellulären pH-Wert und einer geringen extrazellulären Calciumkonzentration öffnen lassen.



**Abbildung 4.29: Farbstoffaufnahme in Kokulturen von HeLa-Cx57eGFP und Wildtyp-Zellen.** (A-C) Fluoreszenzbilder nach einer Stunde Inkubation mit Ethidiumbromid (EtBr; 5  $\mu$ M) und DAPI (0,5  $\mu$ M) in normalem Kulturmedium (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium) zeigen keine Unterschiede in der Farbstoffaufnahme von HeLa-Cx57eGFP (Zellpaar oben rechts) und HeLa-Wildtyp (restliche Zellen). (D) Bei Inkubation von DAPI (5  $\mu$ M) für ca. 25 Minuten in Calcium-freier MRK-Lösung mit 5 mM Ammoniumchlorid nehmen HeLa-Cx57eGFP Zellen (grün) deutlich mehr DAPI (blau) auf als HeLa-Wildtypzellen. Die entsprechenden Zellen schwellen dabei an und werden rund, wie in der Vergrößerung (E) zu erkennen ist [In Zusammenarbeit mit Prof. F. Bukauskas, New York].

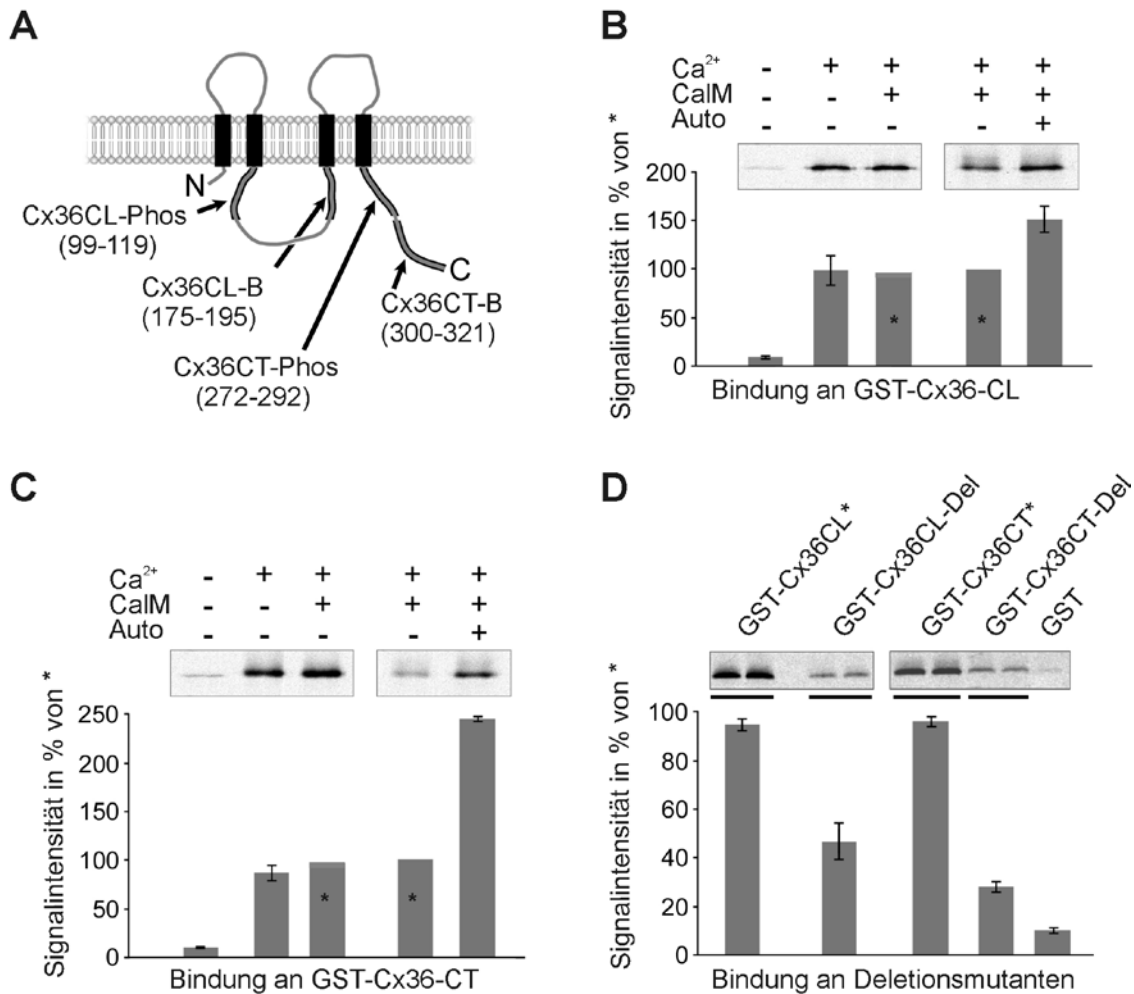
### 4.3 Analyse der Interaktion zwischen Connexin36 und $Ca^{2+}$ /Calmodulin abhängiger Kinase II (CaMKII)

Connexin36 (Cx36) ist eines der häufigsten neuronal exprimierten Connexine in der Retina und vermittelt die Kopplung zwischen Photorezeptoren, zwischen Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen (Feigenspan et al., 2001; Degen et al., 2004; Feigenspan et al., 2004). Diese Funktion kann über interagierende Kinasen wie die Proteinkinase A (PKA) durch Phosphorylierung von Cx36 reguliert werden, was von großer Bedeutung für die Verarbeitung von Lichtsignalen in der Retina ist (vergl. Urschel et al., 2006). Vor Beginn dieser Arbeit wurde von Dr. C. Alev und Dr. S. Urschel bei der Suche nach Interaktionspartnern von Cx36 nach Immunpräzipitation bzw. GST-Pulldown Experimenten über massenspektrometrische Analyse die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Kinase (CaMKII) als mögliches interagierendes Protein für Cx36 identifiziert. Zusätzlich zeigten Immunfluoreszenzanalysen in der inferioren Olive im Gehirn von Mäusen eine ausgeprägt Kolokalisation beider Proteine (Analyse Dr. G. Zoidl, nicht gezeigt). In den folgenden Versuchen wurde diese Interaktion mithilfe von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen zweier zytoplasmatischer Bereiche von Cx36, der zytoplasmatischen Schleife (GST-Cx36CL) bzw. dem C-Terminus (GST-Cx36CT), bestätigt und ihre Relevanz für die Phosphorylierung von Cx36 geklärt.

#### 4.3.1 Bindung der CaMKII an Connexin36

Die Bindung von CaMKII an Cx36 wurde zunächst genauer unter *in vitro* Bedingungen untersucht. [<sup>35</sup>S] markierte *in vitro* translatierte CaMKII wurde mit über Glutathion-Agarose immobilisierten GST-Fusionsproteinen von Cx36 C-Terminus (Cx36CT) bzw. zytoplasmatischer Schleife (Cx36CL) unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Nach Waschen mit entsprechenden Waschlösungen wurden alle gebundenen Proteine eluiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie die gebundene CaMKII nachgewiesen. Dabei wurden die Abhängigkeit der Bindung von Calcium (Ca<sup>2+</sup>) und Calmodulin (CaM), sowie der Einfluss der Autophosphorylierung der CaMKII (Auto) auf deren Bindeverhalten untersucht. Wie Abb. 4.30 B und C zeigen, bindet die CaMKII an beide untersuchte zytoplasmatischen Domänen von Cx36 in Anwesenheit von Calcium und unabhängig von der Anwesenheit von Calmodulin. In zusätzlichen Immunoblot-Analysen mit Antikörpern gegen Calmodulin wurde festgestellt, dass die Ansätze jedoch Calmodulin aus den zur *in vitro* Translation eingesetzten Retikulozytenlysaten enthalten. Über die Abhängigkeit von Calmodulin kann damit keine Aussage getroffen werden. Eine Autophosphorylierung der CaMKII verbessert die Bindung an Cx36CL um etwa 50 % und an Cx36CT um 150 %.

Anhand von *in silico* Analysen wurden zwei mögliche Bindestellen (Cx36CL-B und Cx36CT-B) für die CaMKII in Cx36 identifiziert (vergl. Abb. 4.30 A). Um die Beteiligung dieser Teile der Cx36 Sequenz an der Interaktion von Cx36 mit der CaMKII zu bestätigen, wurden zunächst mittels „Overlap-Extension“-PCR (vergl. 3.7) Deletionsmutanten der entsprechenden Cx36-GST-Fusionsproteine hergestellt und aus *E.coli* aufgereinigt (Vektoren siehe Anhang). In einem wie oben beschriebenen Bindeexperiment mit radioaktiv markierter CaMKII und immobilisierten GST-Fusionsproteinen der Cx36-Deletionsmutanten zeigte sich, dass Deletionen beider identifizierter Bindestellen zu einer deutlichen Reduktion in der Menge von an Cx36 gebundener CaMKII führen (Abb.4.30 D). Dies deutet auf eine Beteiligung beider vermuteten Bindestellen an der Interaktion zwischen Cx36 und CaMKII hin. Damit konnten die ursprünglich identifizierte Interaktion zwischen CaMKII und Cx36 bestätigt werden und zwei an der Interaktion beteiligte Bereiche in Cx36 identifiziert werden.



**Abbildung 4.30: Bindung von CaMKII an immobilisierte GST-Fusionsproteine von zytoplasmatischer Schleife (Cx36CL) und C-Terminus (Cx36CT) von Cx36.** (A) Schematische Darstellung über *in silico* Analysen identifizierter putativer Binde- (-B) und Phosphorylierungsdomänen (-Phos) von Cx36. (B/C) zeigen repräsentative Autoradiogramme und deren quantitative Auswertungen von *in vitro* translatierter [<sup>35</sup>S] markierter CaMKII an Fusionsproteine von GST und Cx36CL bzw. Cx36CT. Eine effektive Bindung ist in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> oder Ca<sup>2+</sup> und Calmodulin zu erkennen. Vorherige Autophosphorylierung der CaMKII erhöht die Effektivität der Bindung deutlich (Vergleich der jeweils letzten beiden Spalten). (D) Die Deletion der putativen Binderegionen in Cx36 (siehe A) führt sowohl in Cx36CL als auch Cx36CT zu einer deutlichen Reduktion in der Affinität der CaMKII zu den jeweiligen GST-Fusionsproteinen (jeweils Duplikate). GST alleine diente als Negativkontrolle.

#### 4.3.2 Phosphorylierung von Connexin36 durch die CaMKII

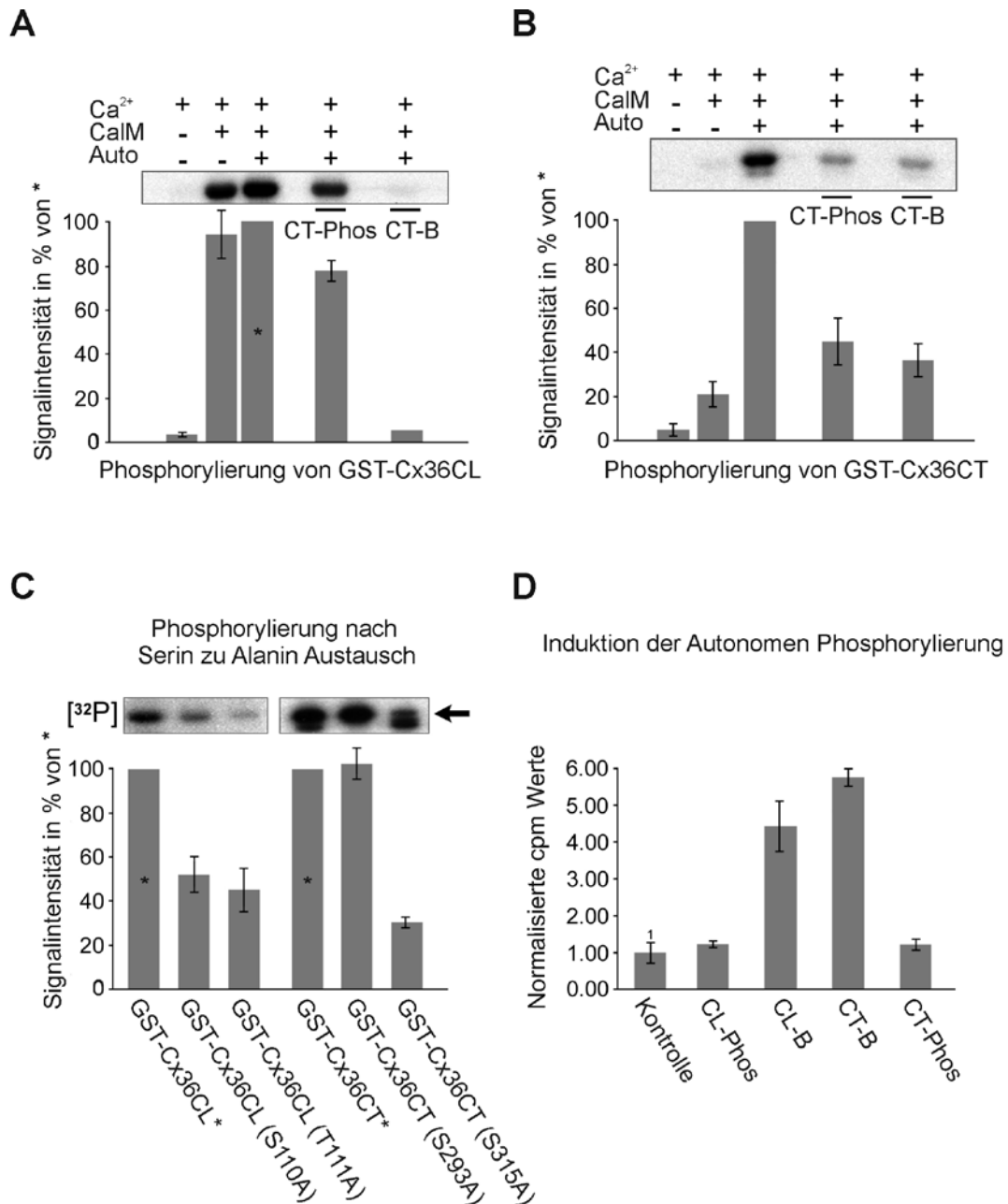
Cx36 besitzt laut *in silico* Analyse vier Konsensus-Stellen für die Phosphorylierung durch die CaMKII, zwei in der zytoplasmatischen Schleife und zwei im C-Terminus. Daher wurde die Phosphorylierung von Cx36 durch die CaMKII an GST-Fusionsproteinen *in vitro* unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Dazu wurde die Kinase in Gegenwart von radioaktiv markiertem  $\gamma$ -ATP unter Bedingungen analog zu den Binde-Experimenten mit immobilisierten Cx36-GST Fusionsproteinen inkubiert. Die Agarosekügelchen wurden anschließend mehrfach gewaschen, die Proteine eluiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Phosphorylierung der Fusionsproteine wurde über Autoradiographie nachgewiesen. Es zeigte sich, dass zur effektiven Phosphorylierung von Cx36CT durch



die CaMKII eine vorherige Autophosphorylierung der CaMKII notwendig ist (Abb. 4.31 B), während der Cx36CL bereits in Anwesenheit von Calcium und Calmodulin ohne vorhergehende Autophosphorylierung der CaMKII effektiv phosphoryliert wird (Abb. 4.31 A). Um die Beteiligung der verschiedenen Binde- und Phosphorylierungsregionen in Cx36 (vergl. Abb. 4.30 A) an dieser Interaktion zu untersuchen, wurden Peptide, die diesen Regionen entsprechen, während der Phosphorylierung im Überschuss hinzugegeben. Beide den Bindestellen entsprechenden Peptide (Cx36CL-B und Cx36CT-B) inhibierten die Phosphorylierung von Cx36 durch die CaMKII. Von den beiden den Phosphorylierungsregionen von Cx36 entsprechenden Peptiden (Cx36CL-Phos Cx36CT-Phos) war nur Cx36CT-Phos aber nicht Cx36CL-Phos dazu in der Lage (Abb.4.31 A/B rechte Spuren).

In einer massenspektrometrischen Analyse von *in vitro* phosphorylierten GST-Cx36 Fusionsproteinen wurden vier verschiedene phosphorylierte Aminosäurereste identifiziert (in Zusammenarbeit mit C. Alev, nicht gezeigt): S110 und T111 in der zytoplasmatischen Schleife sowie S293 und S315 im C-Terminus. Um den Grad der Phosphorylierung dieser Stellen durch die CaMKII zu untersuchen, wurden Punktmutanten von Cx36-GST-Fusionsproteinen mit einem Austausch der entsprechenden Aminosäuren zu Alanin (Urschel et al., 2006) verwendet bzw. die T111A Mutante neu erzeugt (siehe Kap. 3.7). Aufgereinigte GST-Fusionsproteine mit den jeweiligen Punktmutationen wurden in Zusammenarbeit mit Thorsten Höher zur *in vitro* Phosphorylierung eingesetzt. Ein Vergleich der Phosphorylierungsstärke nach entsprechender Punktmutation sollte Aufschluss über die Bedeutung des jeweiligen Aminosäurerestes für die Phosphorylierung von Cx36 durch die CaMKII geben.

Eine Mutation von Serin315 im Cx36CT reduzierte die Phosphorylierung durch die CaMKII deutlich, während eine Mutation von Serin293 kaum Auswirkungen hatte (Abb. 4.31 C). Für die quantitative Bestimmung der Bandenstärken wurde hier jeweils nur die obere Bande ausgewertet, da die untere Bande vermutlich einem Degradationsprodukt des Proteins entspricht. Eine Mutation von Serin110 und Threonin111 hat dagegen einen in etwa vergleichbaren Effekt auf die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Schleife. Beide führen zu einer deutlich geringeren Phosphorylierung von Cx36CL durch CaMKII. Da die zytoplasmatische Schleife von Cx36 auch ohne vorherige Autoaktivierung der CaMKII durch die Kinase phosphoryliert wird, wurde in einem weiteren Experiment in Zusammenarbeit mit Dr. S. Urschel untersucht, ob den Binde- oder Phosphorylierungsregionen von Cx36 entsprechende Peptide in der Lage sind, die CaMKII in Abwesenheit von Calmodulin zu aktivieren, wie dies für einen anderen Bindungspartner der CaMKII, die NR2B Untereinheit des N-Methyl-D-Aspartat- kurz NMDA-Rezeptors, der Fall ist (Bayer et al. 2001). Tatsächlich führte eine Inkubation der CaMKII mit Peptiden, die den Cx36-Binderegionen entsprechen, in Abwesenheit von Calmodulin zu einer Autoaktivierung der Kinase, nachgewiesen durch Phosphorylierung des CaMKII-Substrates Autokamptide (Abb.4.31 D).



**Abbildung 4.31: Phosphorylierung von Connexin36 durch die CaMKII *in vitro*.** (A/B) GST-Fusionsproteine von Cx36CL und Cx36CT wurden durch aktivierte CaMKII (Autophosphorylierung) in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> und Calmodulin effektiv phosphoryliert wie nach Inkubation mit [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP in Autoradiogrammen und deren quantitativer Auswertung gezeigt. Das Fusionsprotein der zytoplasmatischen Schleife von Cx36 wird auch ohne vorherige Aktivierung der CaMKII phosphoryliert (A zweite Spur). Peptide, welche den putativen Binde- und Phosphorylierungsstellen von Cx36 (vergl. 4.30 A) entsprechen, sind mit Ausnahme des Cx36CL-Phos Peptides in der Lage die Phosphorylierung durch die CaMKII zu inhibieren. (C) Mutationen der putativen phosphorylierten Aminosäuren zu Alanin (S110A, T111A S293A und S315A) wurden auf Veränderungen in der Effektivität der Phosphorylierung hin untersucht. Eine Mutation von Serin110, Threonin111 sowie Serin315 zu Alanin führte zu einer deutlichen Reduktion der Phosphorylierung, während eine Veränderung von Serin293 keinen Effekt hatte. Das phosphorylierte GST-Cx36CT Fusionsprotein zeigte im Autoradiogramm zwei Banden, wobei es sich bei der unteren Bande vermutlich um ein Degradationsprodukt handelt. Daher wurden ausschließlich die mit einem Pfeil markierten Banden quantifiziert. (D) Mittels Biotinylierung und Bindung an Avidin-Agarose immobilisierte Peptide entsprechend den Binderegionen in Cx36, sind in der Lage die CaMKII in Abwesenheit von Calmodulin zu aktivieren. Dies wurde durch Phosphorylierung des CaMKII-Substrates Autocamptide in Gegenwart von [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP gezeigt, welche in einem Szintillationszähler (cpm) bestimmt wurde. [C in Zusammenarbeit mit T. Höher; D in Zusammenarbeit mit Dr. S. Urschel].

Damit wurde gezeigt, dass die CaMKII effektiv in einer Calcium abhängigen Weise an beide großen zytoplasmatischen Domänen von Cx36 bindet und dass diese Bindung die Voraussetzung schafft für eine Phosphorylierung von Cx36 durch die CaMKII. Die Interaktion zwischen beiden Molekülen, insbesondere die Autoaktivierung der CaMKII durch Bindung an Cx36, weist damit Gemeinsamkeiten mit der Wechselwirkung zwischen CaMKII und der NR2B Untereinheit des NMDA-Rezeptors auf, einem wichtigen Bestandteil chemischer Synapsen (Bayer et al., 2001).

### 4.4 Analysen zu Vorkommen und Funktion von Maus Connexin23

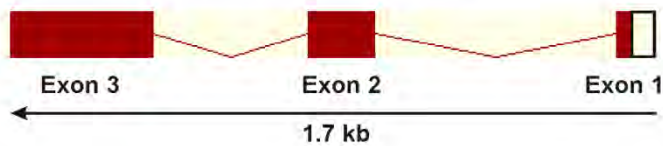
Eines der letzten Connexine in der Maus wurde in einer Arbeit aus dem Jahr 2003 im Rahmen einer Transkriptomanalyse (Gustincich et al., 2003) als 1477bp langes Transkript entdeckt (**D230044M03Rik**). Diese Sequenz kodiert für ein Protein von 23 kDa. Entsprechend der für Connexine gebräuchlichen Nomenklatur wurde das Protein Connexin23 (Cx23) benannt (Söhl und Willecke, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Aufklärung der Funktion dieses Gens die Expression in verschiedenen Geweben der Maus sowie die Kanaleigenschaften von Cx23 in stabil exprimierenden HeLa-Zellen untersucht.

#### 4.4.1 Das Connexin23 Gen

Das Gen für Maus Connexin23 (*Gje1*) ist in einer Region auf Chromosom 10 lokalisiert. Das offene Leseraster von 618 nt kodiert für ein Protein von 205 Aminosäureresten mit einer theoretischen molekularen Masse von 23,83 kDa und ist auf drei verschiedene Exone verteilt (Abb. 4.32 A). Eine Analyse der Proteinstruktur mittels TMHMM-Algorithmus (HUSAR) durch Dr. G. Söhl zeigte die für Connexine typische Struktur aus vier Transmembrandomänen, einem zytoplasmatischen N- sowie C-Terminus, zwei extrazellulären und einer intrazellulären Schleife. Im Vergleich zu anderen Connexinen sind die zytoplasmatische Schleife sowie der C-Terminus mit 12 bzw. 13 Aminosäuren besonders kurz, während die zweite extrazelluläre Schleife mit 37 Aminosäuren etwas länger ist als bei anderen Connexinen (Abb. 4.32 B). Eine Besonderheit der Sequenz von Cx23 im Vergleich zu anderen Connexinen ist das Fehlen des jeweils mittleren der drei Cysteinreste in den beiden extrazellulären Schleifen (Abb. 4.32 C). Diese sind in allen bisher bekannten Connexinen konserviert, fehlen aber in der ebenfalls Gap Junction bildenden Proteinfamilie der Innexine und Pannexine. Trotz dieser Gemeinsamkeit von Cx23 mit Innexinen und Pannexinen legte ein Sequenzvergleich mittels Blast-Algorithmus (HUSAR) stattdessen eine Verwandtschaft zu den Connexinen nahe.

## 4. Ergebnisse

### A Genomischer Aufbau des Cx23 Gens der Maus (Gje1)



### B Transmembran domänen (TMHMM)

N-Term.	22 AS	Exon1 & 2 (13, 9)
1. TM	23 AS	Exon2
1. EL	29 AS	Exon2
2. TM	23 AS	Exon3
CL	12 AS	Exon3
3. TM	23 AS	Exon3
2. EL	37 AS	Exon3
4. TM	23 AS	Exon3
C-Term.	13 AS	Exon3
$\Sigma$ 205 AS		

### C Extrazelluläre Cysteinmotive

1. EL	C-X <sub>6</sub> -C-X <sub>3</sub> -C
mCx23	C-X <sub>6</sub> -I-X <sub>3</sub> -C
hCx23	C-X <sub>6</sub> -V-X <sub>3</sub> -C
2. EL	C-X <sub>4</sub> -C-X <sub>5</sub> -C
(mCx31)	C-X <sub>5</sub> -C-X <sub>5</sub> -C
mCx23	C-X <sub>7</sub> -K-X <sub>3</sub> -C
hCx23	C-X <sub>7</sub> -E-X <sub>3</sub> -C

### D Spliceakzeptorstelle von Cx23 Exon 3 in verschiedenen Spezies

mCx23	223	..ttag gtg	ttc	tgg	gca..	234	
	75		V	F	W	A	78 → 205 AS
drCx23a	223	..gcag gtg	ttt	tgg	gcg..	234	
	75		V	F	W	A	78 → 205 AS
chCx23/hCx23	223	..ttag gtg	ttc	tag	gca..	234	
	75		V	F	-*		78 → trunziert
	223	..ttag	gtg	ttc	tag gca..	234	
	75			*	A		78 → 201 AS

**Abbildung 4.32: Sequenzanalysen von Cx23.** **(A)** Schematische Darstellung der Cx23-Genstruktur (verändert nach D230044M03Rik). Die kodierende Region hat eine Länge von 618 bp und ist auf drei Exone verteilt. **(B)** Größe und Exon-spezifische Verteilung der neun verschiedenen putativen Domänen von Maus-Cx23 nach der Vorhersage mit dem TMHMM-Algorithmus (HUSAR). (TM: Transmembrandomäne, CL: zytoplasmatische Schleife, EL: extrazelluläre Schleife) **(C)** Vergleich der konservierten Cysteinreste in den extrazellulären Schleifen von Connexinen in 1. und 2. extrazellulären Schleife (EL) mit denen von murinem und menschlichem Cx23 bzw. murinem Cx31. (C, Cystein, K, Lysin, E, Glutamat, X, beliebige Aminosäure). **(D)** Unterschiede in der Sequenz der Spleißakzeptorstelle (ag) vor Kodon 75 von Exon 3 zwischen Maus (m), Schimpanse (ch), Mensch (h) sowie Zebrafisch (zf) Cx23. Die über \* markierte Mutation von „g“ zu „a“ in der menschlichen Sequenz führt zu einem Stoppkodon und einem größtenteils trunzierten Protein. Das neu entstandene „ag“ könnte aber auch als möglicher neuer Spleißakzeptor genutzt werden, was zu einem Protein von 201 Aminosäuren (AS) führen würde. [In Zusammenarbeit mit Dr. G. Söhl].

Bei einer Spezies-übergreifenden Suche nach orthologen Genen von Cx23 in genomischen Datenbanken mittels des entsprechenden Blast-Algorithmus (NCBI) wurden in den meisten Spezies Cx23 orthologe Gene identifiziert. So finden sich Cx23 Sequenzen neben dem Genom der Maus auch im Genom von Ratte, Opossum, Katze, Hund, Kuh, Pferd, Zebrafisch (mit zwei orthologen Genen), Rhesusaffe, Schimpanse und Mensch (siehe Tabelle 4.4). Zusätzlich wurden bei der Suche in Datenbanken für exprimierte Sequenzen (ESTs) cDNA-Sequenzen in Kaninchen, Kuh und Zebrafisch

## 4. Ergebnisse

gefunden. Die cDNA Sequenzen der Säuger stammten dabei alle aus dem Auge oder der Linse, bei Zebrafisch aus einer embryonalen cDNA-Bibliothek.

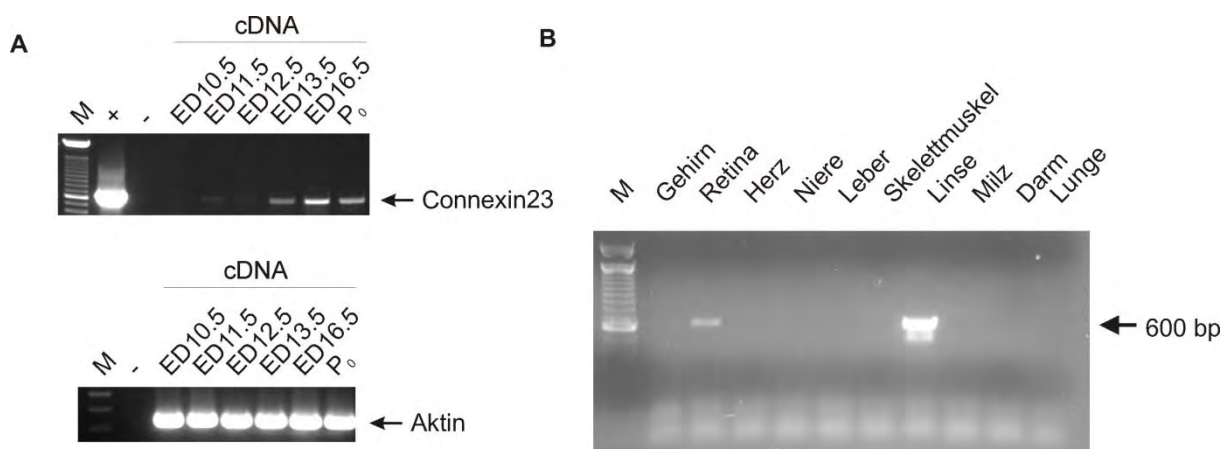
Spezies	cDNA	Gewebe	Chromosom (Chr.)	Nukleotide (bp)	Protein (AS)	Zugangs Nr.
Maus	Ja	Auge ED12	Chr 10	618 bp	205 AS	NW_001030408
Ratte	Nein		Chr 1p12	618 bp	205 AS	NW_047544
Kaninchen	Ja	Linse	nicht seq.	-	205 AS	-
Opossum	Nein		Chr 2	618 bp	205 AS	NW_00158187
Katze	Nein		Schrotschuss Seq.	618 bp	205 AS	AANG01374118
Hund	Nein		Chr 1	618 bp	205 AS	NW_876269
Rind	Ja (tw.)	Linse	Chr 9	618 bp	205 AS	NW_001495598
Pferd	Nein		Chr31	615 bp	204 AS	NW_001799710
Mensch	Nein		Chr 6q24	606 bp	201 AS	NW_001838990
Schimpanse	Nein		Chr 5	606 bp	201 AS	NW_001236564
Rhesusaffe	Nein		Chr 4	2 Stopp	-	NW_001116522
Zebrafisch (Cx23b)	Ja	Embryo	Chr 20	624 bp	207 AS	NW_001512129
Zebrafisch (Cx23a)			Chr 17	618 bp	205 AS	NW_001511510
Zebrafisch (Cx23a)			Chr 2	618 bp *	(205 AS)	NW_001512972

**Tabelle 4.4: Datenbankanalysen der genomischen und Transkriptdatenbanken für Cx23.** cDNA-Sequenzen und genomische Loci für Cx23 in verschiedenen Spezies wurden identifiziert (als cDNA vorhanden: Ja). Die Größe von Cx23 ist mit 618 bp und 205 Aminosäuren (AS) zwischen den einzelnen Spezies konserviert. Nur in wenigen Spezies weicht die Größe des offenen Leserasters ab. In Zebrafisch gibt es neben der Cx23b-Isoform eine Genduplikation mit identischen Sequenzen von Cx23a Chromosom 17 und Chromosom 2 (\*). tw.: teilweise; seq./Seq.: sequenziert/Sequenz.

Bei genauerer Analyse der Sequenzen aus Primaten wurden im Rhesusaffen zwei Punktmutationen im Vergleich zur Maus Sequenz identifiziert, die zu einem vorzeitigen Stopp der Translation des Proteins in Kodon 29 bzw. 63 führen würden. In der menschlichen und der Schimpansen-Sequenz von Cx23 wurde eine Stopp-Punktmutation in Kodon 77 kurz nach Beginn des Exons 3 entdeckt. Während Cx23 im Rhesusaffen in der Datenbank nicht als Gen identifiziert ist, wird für Schimpansen und Menschen trotz Punktmutation ein Protein vorhergesagt. Dabei wird das AG aus dem durch Mutation entstandenen Amber-Stopp-Kodon (TAG) als neuer Spleißakzeptor vorhergesagt, wodurch die Stoppmutation umgangen wird und ein 4 Aminosäurereste kürzeres Protein entstehen würde (Abb. 4.32 D). In allen übrigen analysierten genomischen Sequenzen scheint das Spleißmuster und die Länge der Exone dagegen von Zebrafisch über Opossum bis zur Maus konserviert zu sein. Die Punktmutation in Kodon 77 wurde von Dr. G. Söhl durch Sequenzierung genomischer DNA des Menschen bestätigt. Ein Nachweis des Transkriptes von Cx23 in dieser Form ist bisher jedoch nicht gelungen. So konnte weder in Transkriptdatenbanken von Mensch und Schimpanse noch in RT-PCR und Northernblot-Analysen aus einem menschlichen Auge (Dr. G. Söhl, nicht gezeigt) bisher eine Cx23 mRNA nachgewiesen werden, was nahelegt, dass es sich bei Cx23 in Primaten um ein Pseudogen handelt.

#### 4.4.2 Vorkommen von Connexin23 in der Maus

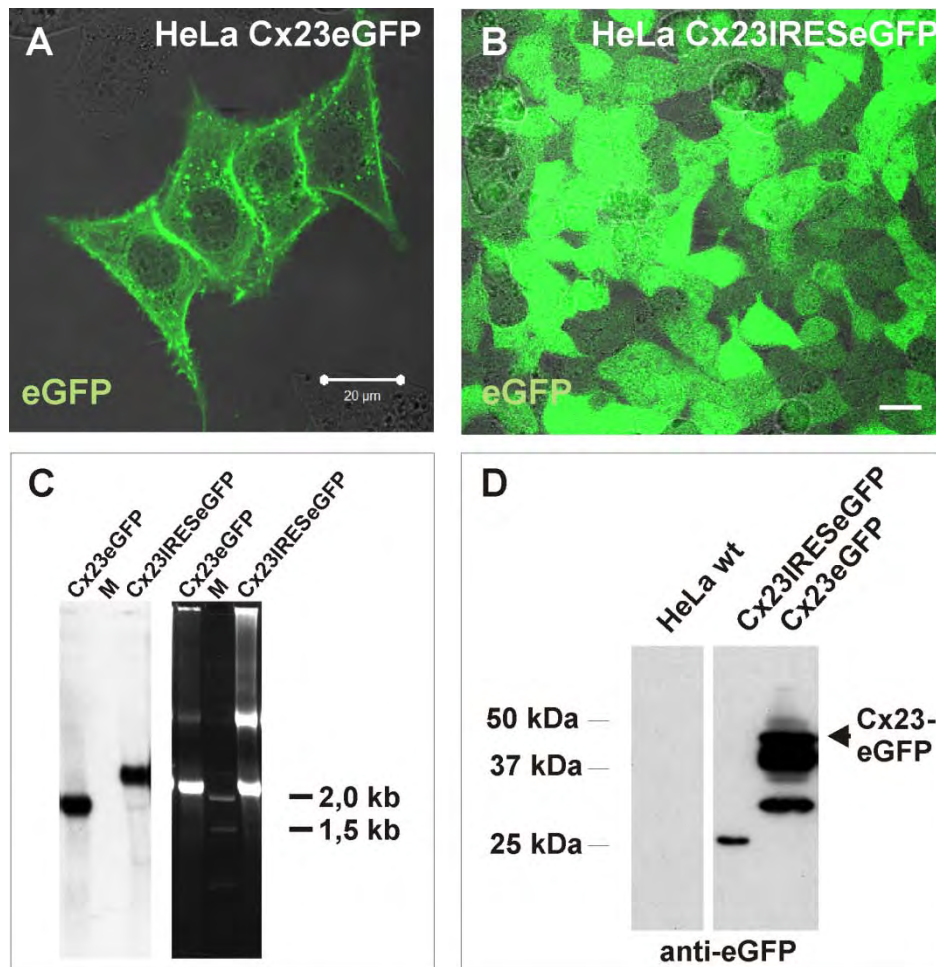
Um die Gewebe der Maus zu identifizieren, in denen Cx23 exprimiert wird, wurden spezifische Oligonukleotidstartermoleküle abgeleitet, die den Bereich des Startkodons bzw. des Stoppkodons von Cx23 abdecken. Mit diesen Startern wurde eine Intron-überspannende RT-PCR Analyse an verschiedenen Mausgeweben sowie mit RNA von kompletten Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien durchgeführt. Cx23 wird beginnend mit Tag 11.5 der Embryonalentwicklung bis zur neugeborenen Maus (P<sub>0</sub>) exprimiert, was über eine schwache Bande bei ca. 600 bp gezeigt ist (Abb. 4.33 A). In der adulten Maus findet man Cx23 dagegen ausschließlich in RNA aus zwei Geweben. Es findet sich ein starkes Signal in der Linse und ein im Vergleich dazu schwächeres Signal in der Retina (Abb. 4.33 B).



**Abbildung 4.33: RT-PCR Analysen verschiedener Embryonalstadien und adulter Gewebe von Cx23.** (A) Ein schwaches für Cx23 spezifisches Signal von ca. 600 bp wurde in cDNA aus Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien beginnend mit Tag 11.5 nachgewiesen (oben). Ein 243 bp großes Amplikon für  $\beta$ -Aktin aus cDNA-Proben der verschiedenen embryonalen Stadien zeigt die Integrität der cDNA (unten). (B) Bei Analyse verschiedener Gewebe der adulten Maus finden sich ein schwaches Amplikon mit RNA aus der Retina und ein starkes mit RNA aus der Linse. M: 100 bp-Marker. [B in Zusammenarbeit mit Dr. G. Söhl].

#### 4.4.3 Herstellung stabil Connexin23 exprimierender HeLa-Zelllinien

Da Cx23 nur vier der in anderen Connexinen konservierten sechs extrazellulären Cysteinreste enthält, waren die Eigenschaften von Cx23 Kanälen von besonderem Interesse. Daher wurden zwei verschiedene stabil Cx23 exprimierende HeLa Zelllinien hergestellt. Die eine exprimiert ein Fusionsprotein aus Cx23 und eGFP (Cx23eGFP) während eine zweite Zelllinie Cx23 wt und eGFP als getrennte Proteine mit Hilfe einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) von einer gemeinsamen mRNA translatiert (Cx23IRESeGFP). Die Expression von Cx23 in den beiden erzeugten Zelllinien wurde über Northernblot-Analyse und Immunoblot mittels eGFP spezifischen Antikörpern bestätigt. So zeigte sich in der Northernblot-Analyse nach Hybridisierung mit einer Cx23-Sonde in Cx23eGFP HeLa-Zellen ein Transkript von ca. 1,9 kb und in Cx23IRESeGFP HeLa-Zellen von etwa 2,2 kb (Abb. 4.34 C). Diese entsprachen den erwarteten Größen.



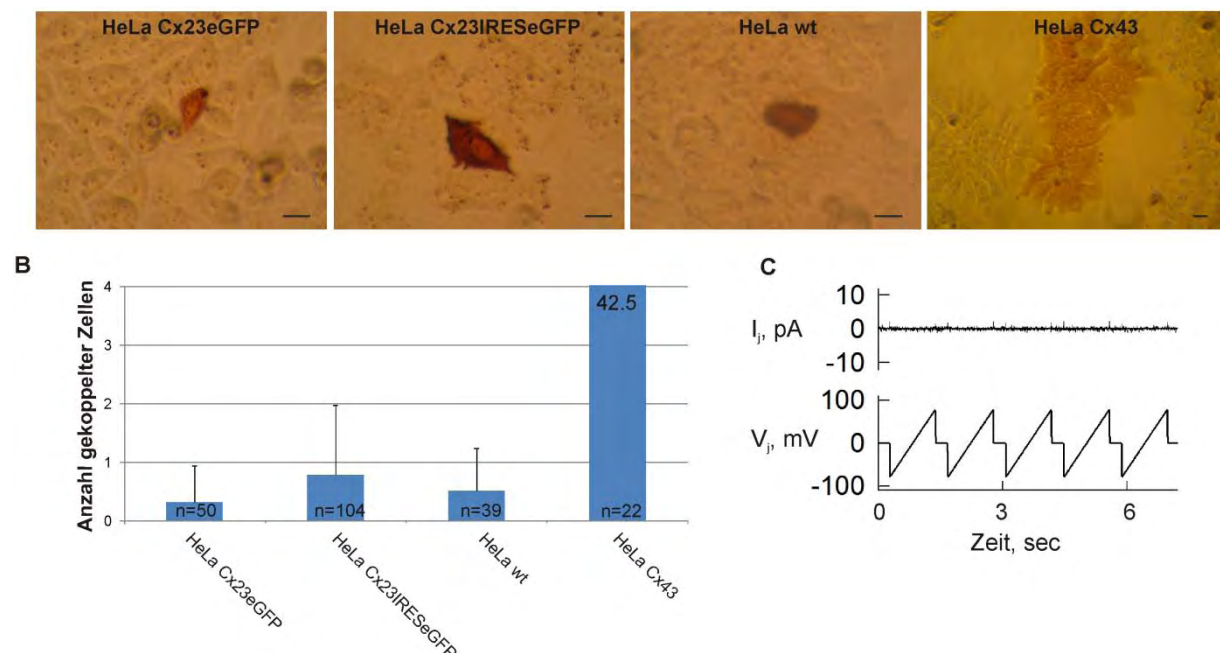
**Abbildung 4.34: Expressionsanalysen von Cx23eGFP und Cx23IRESeGFP in stabil transfizierten HeLa-Zellen.** Fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigen die Lokalisation des Cx23eGFP Fusionsproteins in der Membran von HeLa Zellen (**A**). Das eGFP Fluoreszenzsignal ist über die gesamte Zelloberfläche gleichmäßig verteilt. In Cx23IRESeGFP HeLa-Zellen liegt das freie eGFP ubiquitär im Zytoplasma vor (**B**). Eine Northernblot Analyse (links) der Gesamt-RNA (rechts) aus beiden Zelllinien zeigt mit einer Cx23-spezifischen Sonde ein 1,9 kb Signal für Cx23eGFP und die mit 2,2 kb entsprechend größere mRNA von Cx23IRESeGFP (**C**). Das Cx23eGFP Protein wurde mithilfe eines eGFP-spezifischen Antikörpers in Immunoblotanalysen nachgewiesen. Neben dem bei ca. 49 kDa erwarteten Signal weist der Antikörper zwei weitere Banden bei ca. 30 kDa und 40 kDa nach (**D**). Diese sind in Wildtyp und Cx23IRESeGFP HeLa-Zellen nicht vorhanden. Das freie eGFP in Cx23IRESeGFP Zellen ergibt eine Bande bei etwa 26 kDa (mittlere Spur).

Mangels spezifischer Antikörper konnte das Cx23 Protein nicht direkt nachgewiesen werden, weshalb das Cx23eGFP Fusionsprotein in Proteinlysaten der entsprechenden HeLa Zelllinien mittels Westernblot gegen eGFP untersucht wurde. Wie Abbildung 4.34 D zeigt ergibt sich aus HeLa-Cx23eGFP Zellen eine starke Bande bei etwa 49 kDa, was der Größe des Fusionsproteins entspricht. Zusätzlich sind jedoch auch Signale bei ca. 40 kDa und 30 kDa zu erkennen, die in Kontrolllysaten aus HeLa wt nicht vorhanden sind. Hierbei handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte des Fusionsproteins. Für HeLa-Cx23IRESeGFP wird spezifisch eine Bande mit der für eGFP charakteristischen Größe von 26 kDa erkannt. So konnte die Expression des Cx23eGFP Fusionsproteins auf RNA und Proteinebene gezeigt werden. Die Expression von Cx23 in Cx23IRESeGFP HeLa Zellen wurde auf RNA-Ebene und indirekt über die Expression des auf der gleichen mRNA kodierten eGFP bestätigt.

Um die intrazelluläre Lokalisation von Cx23 in HeLa-Zellen zu untersuchen wurde das Fusionsprotein aus Cx23 und eGFP verwendet. Dieses war bei stabilen Cx23eGFP HeLa-Zellen in der Membran lokalisiert, jedoch nicht in der für Connexine typischen punktierten Verteilung (vergl. Elfgang et al., 1995). Stattdessen war das Fluoreszenzsignal für eGFP gleichmäßig über die Oberfläche der Zellen verteilt (Abb.4.34 A).

#### 4.4.4 Eigenschaften von Connexin23 Voll- und Halbkanälen

Die Fähigkeit von Cx23, funktionelle Gap Junction Kanäle zu bilden, wurde einmal mittels Mikroinjektion des kleinen Spurmoleküls Neurobiotin in einzelne Zellen einer Zellschicht getestet, das über Gap Junction Kanäle in benachbarte Zellen diffundieren kann (Elfgang et al., 1995). Neurobiotin wurde nachgewiesen mithilfe von Avidin-gekoppelter Peroxidase, die das Substrat Diaminobenzidin (DAB) in ein braun ausfallendes Produkt umsetzt. Die Analyse des Neurobiotintransfers zeigte, dass sowohl Cx23eGFP- als auch Cx23IRESeGFP-HeLa-Zellen Neurobiotin nicht besser an ihre Nachbarzellen weitergeben als HeLa-Wildtypzellen. Als Kontrolle für den Erfolg der Neurobiotinmikroinjektion wurden Cx43-HeLa-Zellen verwendet, die wie erwartet einen deutlichen Transfer in Nachbarzellen erster, zweiter und dritter Ordnung zeigten (Abb. 4.35 A/B).



**Abbildung 4.35: Analysen der Gap Junction vermittelten Kopplung zwischen Cx23 exprimierenden HeLa-Zellen.** Der Transfer von Neurobiotin wurde in Cx23eGFP, Cx23IRESeGFP, Cx43, und Wildtyp HeLa-Zellen getestet. Neurobiotin wurde mithilfe einer Avidin-gekoppelten Peroxidase und des Substrats Diaminobenzidin (DAB) nachgewiesen (A). Neurobiotin-positive Zellen wurden ausgezählt und statistisch ausgewertet (B). Weder Cx23eGFP noch Cx23IRES-eGFP HeLa-Zellen zeigten einen Transfer von Neurobiotin, der sich signifikant von dem in kopplungsdefizienten HeLa-Wildtyp Zellen unterscheidet. Cx43 HeLa-Zellen zeigten eine starke Kopplung. Elektrische Kopplung wurde mittels double Voltage Clamp Analyse zwischen Cx23eGFP HeLa-Zellen untersucht (C). Wiederholte Spannungsänderungen ( $V_j$ ) bewirkten keine Veränderungen des Stromes zwischen den Zellen ( $I_j$ ). [C in Zusammenarbeit mit Prof. F. Bukauskas, New York].

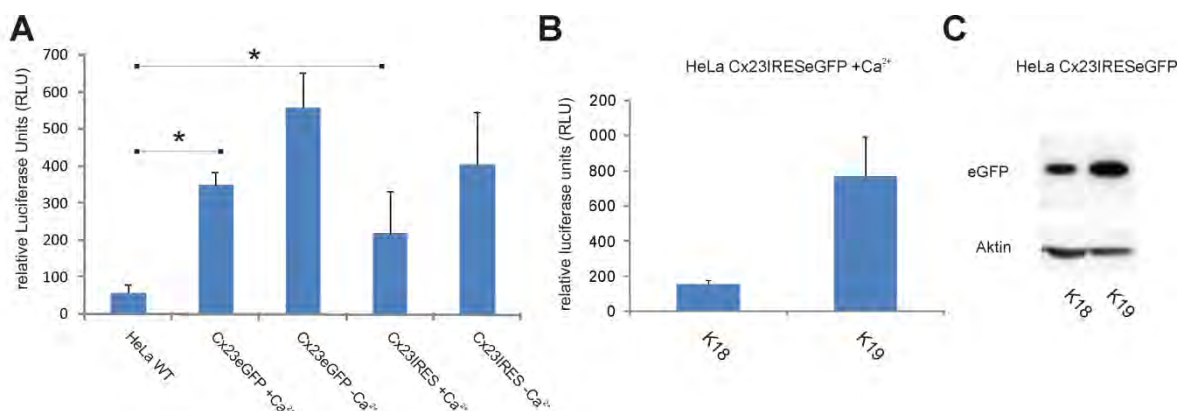


## 4. Ergebnisse

Zusätzlich wurde an Zellpaaren von Cx23eGFP bzw. Cx23IRESeGFP exprimierenden HeLa-Zellen die elektrische Kopplung untersucht. In sieben von acht untersuchten Cx23eGFP (Bsp. in Abb. 4.35 C) und vier von vier Cx23IRESeGFP untersuchten Zellpaaren konnte keine Gap Junction vermittelte Kopplung nachgewiesen werden. Die Kopplung im einzelnen Cx23eGFP Zellpaar konnte anhand der Spannungssensitivität und Einzelkanalleitfähigkeit auf das in HeLa Zellen schwach exprimierte humane Cx45 zurückgeführt werden (nicht gezeigt).

Somit konnte keine Funktion von Cx23 Gap-Junction Kanälen in stabilen Cx23-HeLa-Zelllinien nachgewiesen werden. Neben der Funktion als Gap Junction Kanal wird für einige Connexine auch eine Funktion als Halbkanal in der Membran verschiedener Zellen vorgeschlagen (siehe Kang et al., 2008). Die gleichmäßige Verteilung von Cx23eGFP in der Membran von HeLa Zellen ist ein Hinweis, dass Cx23 eine Funktion als Halbkanal haben könnte. Die Funktion von Connexin Halbkanälen ist meist abhängig von einer verringerten extrazellulären Calciumkonzentration und kann neben der Aufnahme von Gap Junction permeablen Farbstoffmolekülen wie DAPI und Propidiumjodid (Bukauskas et al., 2006) über die Abgabe von ATP aus Connexin exprimierenden Zellen bestimmt werden (vergl. Dobrowolski et al., 2007). Eine Analyse der Aufnahme von DAPI oder Propidium Jodid ergab keine Unterschiede in der Farbstoffaufnahme zu HeLa-Wildtyp Zellen (Analyse Prof. F. Bukauskas, New York, nicht gezeigt).

Zusätzlich wurden Cx23eGFP, Cx23IRESeGFP und HeLa-Wildtyp-Zellen zur Bestimmung der ATP-Abgabe in „Hank's balanced salt solution“ (HBBS) mit Calcium bzw. ohne Calcium und mit Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) inkubiert. Die ATP Konzentration des Überstandes wurde nach 20 Minuten bei 37°C durch Inkubation mit Luciferase luminometrisch bestimmt.



**Abbildung 4.36: ATP-Abgabe stabil Cx23 exprimierender HeLa Zellen.** Wildtyp, Cx23eGFP und Cx23IRESeGFP HeLa-Zellen wurden für 20 Minuten mit Calcium (+Ca<sup>2+</sup>) und ohne Calcium (-Ca<sup>2+</sup>) inkubiert. Die Menge an freigesetztem ATP wurde mittels luminometrischer Bestimmung der Aktivität der Luciferase im Verhältnis zur Proteinmenge der jeweiligen Zellen (RLU) bestimmt. **(A)** In Gegenwart von Calcium zeigten Cx23 exprimierende Zellen bereits eine signifikant erhöhte Abgabe von ATP ( $p < 0,005$ ). Stimulation durch Inkubation in Calcium-freiem Medium führte zu einer weiteren Erhöhung der Menge an freigesetztem ATP, die jedoch nicht signifikant ist ( $p > 0,1$ ). **(B)** Die Menge an abgegebenem ATP steht mit der Menge an exprimiertem Cx23 in Zusammenhang, bestimmt über Immunoblot gegen eGFP **(C)**. [A und B in Zusammenarbeit mit Dr. R. Dobrowolski, Bonn].

Die Menge abgegebener ATP's von Cx23 exprimierenden HeLa Zellen, war in allen Fällen, mit und ohne Calcium, signifikant größer als in Wildtyp HeLa-Zellen (Abb. 4.36). Cx23eGFP bzw. Cx23IRSeGFP exprimierende HeLa-Zellen geben also auch ohne vorherige Stimulation durch Entzug des extrazellulären Calciums ATP ab. In Calcium-freiem HBBS war die Menge an abgegebenem ATP zwar größer als in Gegenwart von Calcium, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Zusammen weisen diese Ergebnisse auf eine Funktion von Cx23 in der Linse als Halbkanal bildendes Protein hin.

## 5. Diskussion

### 5.1 Die Cx57-DTRfrtCre Mauslinie

Die Cx57-DTRfrtCre Mauslinie wurde erzeugt, um ein neues Werkzeug für die Erforschung der Funktion der Horizontalzellen zu erhalten. Mit dieser Mauslinie ergeben sich zwei verschiedene experimentelle Strategien: Einmal die Ablation der Horizontalzellen mithilfe des DT/DT-Rezeptor Systems und zum anderen die spezifische Ausschaltung gefloxter Gene in Horizontalzellen mittels des Cre/loxP-Systems.

#### 5.1.1 Erzeugung und Primäranalyse

Die Cx57-DTRfrtCre Mauslinie wurde mithilfe homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen erzeugt, deren Erfolg über PCR- und Southernblot-Analysen nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.3 und 4.4). Die Rekombinationsrate von etwa 4% entsprach den Erwartungen aus vorherigen Arbeiten mit dem Cx57-Lokus und den entsprechenden Homologie-Bereichen (vergl. Dissertation S. Hombach, 2004). Die Blastozysteninjektion eines der ES-Zellklone ergab mehrere keimbahngängige Chimären (Abb. 4.5), deren Nachkommen, wie für die Ausschaltung des Cx57-Gens beschrieben (vergl. Hombach et al., 2004), auch im homozygoten Zustand lebensfähig waren und keine äußerlichen Unterschiede zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren aufwiesen. Die gezielte Veränderung des Cx57-Lokus konnte in den resultierenden Nachkommen der Chimären mittels Southernblot-Analysen über ein 7,2 kb großes *Scal*-Restriktionsfragment bestätigt werden (Abb. 4.7). Das Entfernen der von frt-Stellen umgebenen Sequenz für DTReGFP mithilfe einer ubiquitär exprimierten FLP-Rekombinase ergab die Cx57-Cre Mauslinie, was mittels eines 8,7 kb großen *Scal*-Fragmentes in der Southernblot-Analyse gezeigt wurde (Abb.4.7). Zur Identifizierung der verschiedenen Genotypen wurde basierend auf der Cx57-LacZ Genotypisierungs-PCR (Dissertation S. Hombach, 2004) eine PCR-Strategie entwickelt, mit deren Hilfe alle verschiedenen veränderten Cx57-Allele nachgewiesen werden sollten. Drei der vier möglichen Allele konnten in einem gemeinsamen Ansatz nachgewiesen werden (Cx57-wt, Cx57-DTR, Cx57-Cre), während die Kombination der Starter für alle vier Allele in einem Ansatz trotz identischer Reaktionsbedingungen nicht möglich war (zusätzlicher Nachweis des Cx57-lacZ Allels). Eine Analyse der fünf verwendeten Starter mithilfe des Autodimer Algorithmus (Vallone und Buttler, 2004) zeigte keine Hinweise auf Dimerbildung oder Haarnadelstrukturen zwischen den Startern. Dennoch kann bei einer PCR mit einer größeren Anzahl verschiedener Primer eine besondere Anpassung der Reaktionsbedingungen erforderlich sein (Henegariu et al., 1997). Da die verschiedenen veränderten Allele von Cx57 sich mithilfe zweier separater PCR-Reaktionen jedoch zuverlässig nachweisen ließen (Abb. 4.6), wurde auf eine weitere Anpassung verzichtet. Die gewünschte Veränderung des Cx57-Lokus und das Entfernen des DTReGFP mittels FLP-Rekombinase konnten somit in der neuen Cx57-DTRfrtCre Mauslinie gezeigt werden.

Transkriptanalysen gaben über ein 320 bp großes RT-PCR Amplikon mit DT-Rezeptor spezifischen Startern erste Hinweise auf die Expression des DT-Rezeptors in der Netzhaut von Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren (Abb. 4.8 A). Auch die Transkription der Cre-Rekombinase konnte in der Retina von Cx57<sup>Cre/+</sup> Mäusen über ein 420 bp großes Amplikon in RT-PCR Analysen nachgewiesen werden (Abb. 4.8 B). Neben Cx57<sup>Cre/+</sup> war dies jedoch ebenfalls in Cx57<sup>DTR/+</sup> zu finden. In diesem Genotyp ist aufgrund eines Polyadenylierungssignals hinter der kodierenden Sequenz des Fusionsproteins aus DT-Rezeptor und eGFP und vor der Sequenz für die Cre-Rekombinase keine Expression der Cre-Rekombinase zu erwarten. Mit cDNA aus Cx57<sup>+/+</sup> Tieren entstand dagegen kein Cre-spezifisches Signal. Da eine Kontamination mit genomischer DNA anhand einer Intron überspannenden Aktin-Kontrolle (Abb. 4.8 C) und einer zusätzlichen Analyse auf ein nicht in der Retina exprimiertes Connexin (Cx33; Chang et al., 1996) ausgeschlossen werden konnte, ist anzunehmen, dass das Polyadenylierungssignal zwischen DT-Rezeptor und Cre-Rekombinase nicht in allen Fällen erkannt wird und es zum Durchlesen des Transkriptes kommt. Daraus resultiert ein Cre-spezifisches Amplikon mittels RT-PCR Analysen auch in Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren. Northernblot-Analysen könnten zeigen, ob tatsächlich eine nachweisbare Menge eines DTReGFP-Cre Transkriptes in der Retina vorhanden ist. Dieses Transkript sollte jedoch ohne eine zusätzliche Ribosomeneintrittsstelle (IRES) nicht zur Translation der Cre-Rekombinase führen und somit keine Auswirkungen auf die Verwendung der Cx57-DTRfrcCre Mauslinie haben. Mittels Antikörpern gegen eGFP wurde vergeblich versucht, das DT-Rezeptor/eGFP Fusionsprotein in der Retina nachzuweisen (vergl. Kap. 4.1.3.3). Dies ist vermutlich auf eine zu geringe Anzahl an DT-Rezeptor Molekülen in der Membran von Horizontalzellen zurückzuführen. Dasselbe Fusionsprotein aus DT-Rezeptor und eGFP konnte auch in einer vorhergehenden Arbeit nur in einem kleinen Teil von dendritischen Zellen nachgewiesen werden, führte aber zur Ablation aller Zellen dieses Typs (Bennett et al., 2005). Die Horizontalzell-spezifische Expression des DT-Rezeptors wurde in der Cx57-DTRfrcCre Mauslinie indirekt über die spezifische Ablation der Horizontalzellen der Retina mittels DT (Abb. 4.9 und 4.12) gezeigt (siehe auch Kap. 5.1.2). Die Erzeugung der Cx57-DTRfrcCre Mauslinie war damit erfolgreich und zeigte die erwünschte Expression des DT-Rezeptors in der Retina.

### 5.1.2 Ablation der Horizontalzellen der Retina

Anhand der neuen Cx57-DTRfrcCre Mauslinie wurde die induzierbare Ablation der Horizontalzellen in der Retina mithilfe des DT-Rezeptor/DT-Systems untersucht. Eine erste Versuchsreihe mit einer mittleren Dosis DT (100 ng täglich, über sieben Tage) zeigte, dass Horizontalzellen in Cx57<sup>DTR/lacZ</sup> und Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren mittels DT vollständig ablatiert werden können (Abb. 4.9). Der Nachweis der Horizontalzellablation erfolgte mittels zweier verschiedener Ansätze: Über das Cx57lacZ-Allel aus der Cx57KO Mauslinie (Hombach et al., 2004) können Horizontalzellen mittels  $\beta$ -Galaktosidase-

aktivität nachgewiesen werden; nach DT-Injektion war kein Substratniederschlag mehr in der Retina der Cx57<sup>DTR/lacZ</sup> und Cx57<sup>DTR/+</sup> Tiere zu erkennen (Abb. 4.9). Über das Markerprotein Calbindin werden Horizontalzellen mittels Immunfluoreszenzanalyse angefärbt; Calbindin-positive Zellen fehlten in dem für Horizontalzellen typischen Bereich der Retina in DT-injizierten Cx57<sup>DTR/lacZ</sup> und Cx57<sup>DTR/+</sup> Mäusen. Beide Methoden lieferten somit übereinstimmende Ergebnisse (siehe 4.1.5 und 4.1.6).

Nach dem zunächst verwendeten Injektionsprotokoll kam es jedoch unerwartet zum Tod vieler DT-behandelter Cx57<sup>DTR/lacZ</sup> und Cx57<sup>DTR/+</sup> Tiere (Abb. 4.16). Auf mögliche Gründe hierfür wird in Kapitel 5.1.4 genauer eingegangen. Geringere oder kürzer angewendete Dosen waren jedoch für eine vollständige Ablation der Horizontalzellen nicht ausreichend (Abb. 4.9 und 4.10). Eine Aufteilung der Dosis auf zweimal drei Tage mit zwei Wochen Unterbrechung war dagegen erfolgreich. Dies führte einerseits zu einer nahezu vollständigen Ablation der Horizontalzellen, was sowohl qualitativ als auch quantitativ gezeigt werden konnte (Abb. 4.11 und Tab. 4.2), andererseits zeigten die so behandelten Cx57<sup>DTR/+</sup> Tiere keine offensichtlichen Krankheitssymptome oder Sterblichkeit (Abb. 4.16). Diese Injektionsprozedur erscheint somit geeignet, die Horizontalzellen in der Retina der Cx57-DTRfrtCre Mauslinie nahezu komplett zu ablatieren, ohne der Gesundheit der Tiere zu schaden.

Die hier letztendlich verwendete Dosis von je 100 ng DT an drei aufeinander folgenden Tagen gefolgt von einer Unterbrechung der Behandlung für zwei Wochen und erneut drei Injektionen an drei aufeinander folgenden Tagen (3 x + 3 x) liegt im Vergleich zu anderen Arbeiten, in denen das DT/DT-Rezeptor System zur Ablation eines bestimmten Zelltyps in einem kompletten Organismus verwendet wurde, in einem mittleren Bereich. So wurden zur Ablation verschiedener Zellen des Immunsystems der Maus Dosen zwischen einmalig 40 ng DT (Kissenpfennig et al., 2005; Bennett et al., 2005) bzw. 80 ng DT (Jung et al., 2002) einerseits und 100 ng DT dreimal täglich über eine Woche (Buch et al., 2005) andererseits verwendet. Auch in der Retina wurde das DT/DT-Rezeptor-System bereits in der Literatur erfolgreich angewendet. Hier wurde die spezifische Expression des Rezeptors in Melanopsin positiven Ganglienzellen dazu genutzt, diese zu ablatieren. Nach zwei oder drei Injektionen von je 1 µg DT im Abstand von drei Tagen konnten Melanopsin-exprimierende Ganglienzellen zu 90 % ablatiert werden (Hatori et al., 2008). Zusammen mit der vorliegenden Arbeit zeigt dies, dass DT die Blut-Retina Schranke effektiv überwinden kann. Die hier zur Ablation von Horizontalzellen verwendete Dosis DT ist jedoch mit je 100 ng pro Injektion 10-fach geringer als für Melanopsin-exprimierende Ganglienzellen (Hatori et al., 2008) oder 3-fach geringer als für Oligodendrozyten (Buch et al., 2005). Vereinzelt nicht ablatierte Horizontalzellen (<1%) in DT-behandelten Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren (Abb. 4.11) und die Tatsache, dass die halbe Dosis (3 x 100 ng DT) nicht für eine vollständige Ablation der Horizontalzellen ausreicht (Abb. 4.10), deuten darauf hin, dass die hier verwendete Dosis (3 x + 3 x) nahe an der kleinstmöglichen notwendigen und damit der optimalen Dosis liegt.

### 5.1.3 Veränderung der Retina nach Ablation der Horizontalzellen

Nach der Ermittlung der Injektionsprozedur wurden Horizontalzell-ablatierte Retinae auf morphologische Veränderungen untersucht. Die Behandlung mit DT führt selektiv zur Ablation der Horizontalzellen. Große Populationen anderer Zelltypen wie Photorezeptoren (siehe Abb. 4.12 Durchlichtbilder), Bipolar- (Abb. 4.13 PKC-Nachweis) Amakrin- und Ganglienzellen (Abb. 4.14 CaMKII-Nachweis) waren nicht von der Ablation betroffen. Die Expression des menschlichen DT-Rezeptors scheint demnach in der Retina auf Horizontalzellen beschränkt zu sein, was dem Muster der Aktivität des Cx57-Promotors in der Retina entspricht (Hombach et al., 2004).

Welche Auswirkungen hat die Ablation der Horizontalzellen auf die Morphologie der Retina? Der grobe Aufbau der Netzhaut aus ihren nukleären und plexiformen Schichten war eine Woche nach der letzten Injektion nicht verändert (Abb. 4.12). Auch die äußere plexiforme Schicht, in der unter anderem die dendritischen und axonalen Fortsätze der Horizontalzellen liegen, war noch vorhanden. Hierin unterscheidet sich die Auswirkung der induzierten Ablation über das DT/DT-Rezeptor-System von vorhergehenden Arbeiten, in denen eine Ablation oder Misslokalisierung der Horizontalzellen im Verlauf der Retinaentwicklung gefunden wurde. So führte die Expression des großen T-Antigens unter der Kontrolle des in Horizontalzellen sowie in einigen Amakrinzellen aktiven Phenylethanolamin-N-Methyltransferase Promotors zu einem nahezu vollständigen Verlust der Horizontalzellen und der gesamten äußeren plexiformen Schicht in der zweiten postnatalen Woche (Hamang et al., 1993). In einer anderen Arbeit führte die Horizontalzell-spezifische konditionale Deletion des Lim1-Transkriptionsfaktors mithilfe des Cre/loxP-Systems zu einer Misslokalisierung der Horizontalzellen am unteren Rand der inneren nukleären Schicht statt der äußeren plexiformen Schicht, was ebenfalls zu einer deutlichen Verringerung in der Dicke der äußeren plexiformen Schicht führte, welche an einigen Stellen komplett verschwunden war (Poche et al., 2007). Diese Veränderungen sind möglicherweise durch Fehlen der Horizontalzellen im Laufe der späten Retinaentwicklung entstanden. Durch die Induzierbarkeit des DT/DT-Rezeptor-Systems werden solche Effekte bei dem Cx57-DTRfrtCre Mausmodell umgangen.

Neben der groben Morphologie der Retina wurden zusätzlich die Kontakte der Photorezeptoren mit Bipolar- und Horizontalzellen in der äußeren plexiformen Schicht untersucht. In Immunfluoreszenzanalysen mit Calbindin-spezifischen Antikörpern (Abb. 4.10, 4.11 und 4.12) zeigten sich eine Woche nach der Ablation der Horizontalzellen in der äußeren plexiformen Schicht Calbindin positive Strukturen auf Höhe der dendritischen Endigungen der Horizontalzellen. Diese konnten in transmissions-elektronenmikroskopischen Aufnahmen als dendritische oder axonale Reste von Horizontalzellen identifiziert werden, die innerhalb der synaptischen Endigungen der Photorezeptoren nach Ablation der Zellkörper zurückblieben (Abb. 4.15). Diese waren jedoch meist degradiert (siehe Stäbchen Abb. 4.15 C/D) und wesentlich weniger

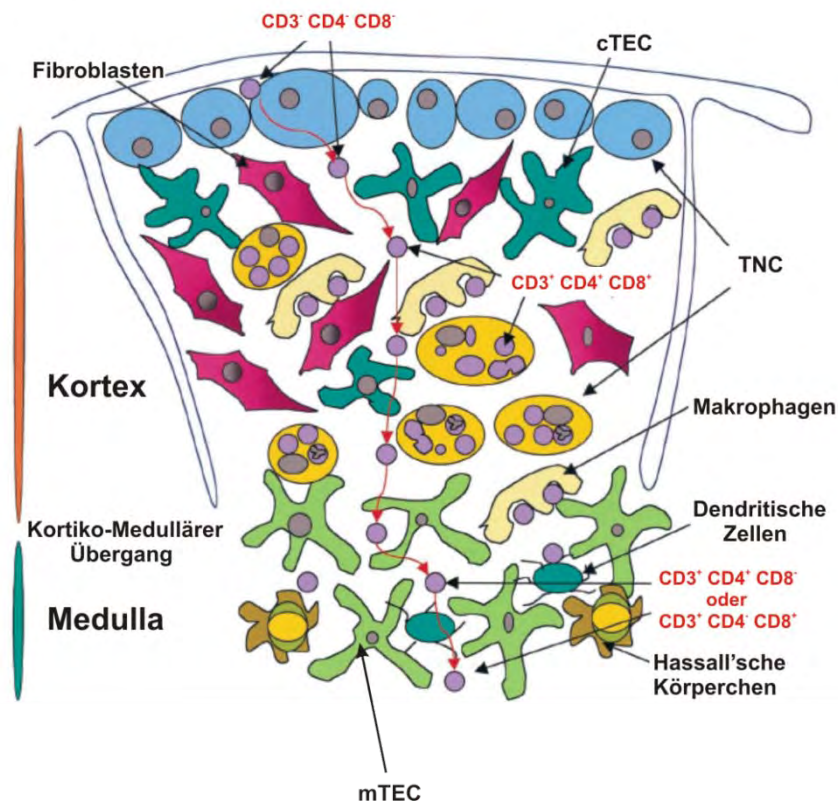
zahlreich als dies in einer nicht ablatierten Retina der Fall ist (siehe Zapfen Abb.4.15 A/B). Insgesamt war die Zahl der Fortsätze deutlich reduziert.

Die invaginierenden Fortsätze der Bipolarzellen wurden ebenfalls genauer untersucht. In Immunfluoreszenzanalysen konnten diese feinen Strukturen sowohl in Wildtyp als auch in Horizontalzell-ablatierter Retina aufgrund der zu geringen Auflösung lichtmikroskopischer Aufnahmen nicht klar gezeigt werden (Abb. 4.13 C/F). Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen deuten jedoch auf einen Verlust der direkten Kontakte der Bipolarzellen zu Bändersynapsen in Stäbchen und Zapfen von Horizontalzell-ablatierter Retina hin (Abb. 4.15). Der Verlust dieses Kontaktes konnte in nachfolgenden physiologischen Untersuchungen auch im sog. Elektroretinogramm (ERG) gezeigt werden (Prof. U. Janssen-Bienhold, persönliche Mitteilung). Über ein ERG werden die Summenpotentiale der Antworten aller am Sehvorgang beteiligten Zellen auf einen definierten Lichtblitz gemessen, wobei sich die Reaktion in drei Teile, die A-, die B- und die C-Welle aufteilen lässt. So ist die Reaktion der Photorezeptoren für die A-Welle verantwortlich, während die B-Welle vermutlich die Reaktion nachgeschalteter Neurone widerspiegelt. Die C-Welle wird vermutlich durch nicht-neuronale Reaktionen in Glia- oder Pigmentepithelzellen verursacht (Steinberg et al., 1991). Eine Unterbrechung des Kontaktes zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen sollte somit deutliche Auswirkungen auf die B-Welle im Elektroretinogramm haben. Tatsächlich zeigten 3 x + 3 x (vergl. Kap. 4.1.5) mit DT behandelte Cx57<sup>DTR/+</sup> Mäuse einen nahezu kompletten Verlust der B-Welle. Auch die A-Welle war reduziert (Prof. U. Janssen-Bienhold, persönliche Mitteilung). Die Struktur der synaptischen Triade und damit die Signalweiterleitung zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen scheint daher nach Ablation der Horizontalzellen zerstört zu sein. Dies wurde zuvor auch nach Onkogen-induzierter Ablation von Horizontalzellen in deren Entwicklung gezeigt (Hammang et al., 1993; Peachy et al., 1997). Horizontalzellen sind damit vermutlich essentiell für den Aufbau (Peachy et al., 1997) und den Erhalt (diese Arbeit) der synaptischen Triade der Photorezeptoren. Da Horizontalzellen über eine negative Rückkopplung zu den Photorezeptoren deren Funktion beeinflussen (Kamermans und Spekrijse, 1999), könnte der Verlust der Horizontalzellen das Gleichgewicht an dieser Synapse stören. Auch eine Veränderung des pH-Wertes im synaptischen Spalt durch Horizontalzellen (Molina et al., 2004; Kreitzer et al., 2007) könnte eine wichtige Bedeutung für den Erhalt der synaptischen Triade der Photorezeptoren haben. Nach diesen Resultaten ist zu vermuten, dass der Verlust der Horizontalzellen und damit der synaptischen Kontakte zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen nach Ablation mittels des DT/DT-Rezeptor Systems ähnlich wie nach Ablation der Horizontalzellen in deren Entwicklung (Hammang et al., 1993; Peachey et al., 1997) zu einem starken Verlust der visuellen Sensitivität führt. Dies bedeutet, dass diese Mäuse sind vermutlich blind sind.

### 5.1.4 Effekte von DT-Behandlung auf den Thymus

Eine Expression von Cx57 wurde in der Analyse der Cx57-lacZ Reportermaus (Dissertation S. Hombach, 2004) neben der Retina auch in der embryonalen Niere und dem Thymus nachgewiesen. In der Niere adulter Mäuse ist keine Cx57-Expression zu finden, weshalb dieses Organ im Rahmen dieser Arbeit an adulten Mäusen nicht weiter untersucht wurde. Im Thymus konnte jedoch in Cx57<sup>DTR/+</sup> Mäusen eine Veränderung nach DT-Behandlung festgestellt werden.

Der Thymus als primäres lymphatisches Organ dient vor allem bei Heranwachsenden der Ausbildung reifer T-Lymphozyten, den Trägern der zellulären Immunabwehr und der Toleranzbildung. Diese wandern aus dem Knochenmark über die subkapsuläre Zone in den Kortex des Thymus ein (Phänotyp: CD3<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>). Im außen liegenden Kortex beginnt die Reifung der Thymozyten mit der Neuordnung der T-Zell Rezeptor Gene (Phänotyp: CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>). Es folgen die positive Selektion auf eine erfolgreiche Rekombination und die Ausbildung eines T-Zell Rezeptors im Übergang zur Medulla, dem innenliegenden Thymusmark, und die negative Selektion zur Vermeidung von Reaktionen auf körpereigene Antigene in der Medulla. Thymozyten differenzieren schließlich in CD4 einfach positive T-Helfer Zellen (Phänotyp: CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>) oder CD8 einfach positive zytotoxische T-Zellen (Phänotyp: CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>), welche schließlich den Thymus verlassen (Pezzano et al., 2001). Eine wichtige Rolle während der Reifung spielen dabei die unterschiedlichen Epithelzellen in Kortex (cTEC) und Medulla (mTEC) (vergl. Abb. 5.1).



**Abbildung 5.1: Entwicklung von Thymozyten im Thymus.** Sich entwickelnde Thymozyten wandern aus dem Knochenmark als CD3<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup> und CD8<sup>-</sup> Vorläuferzellen in den Kortex des Thymus ein.



Dieser enthält neben Fibroblasten verschiedene Thymusepithelzellen (cTEC). Eine Form der cTEC stellen die sog. Thymusammenszellen (TNC) dar, in denen ein Teil der Entwicklung der Thymozyten stattfindet. Diese entwickeln sich zunächst zu CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Thymozyten, welche stark proliferieren. Im Übergang zur Medulla findet die Rekombination der T-Zell-Rezeptorgene statt, wobei Thymozyten ohne einen resultierenden funktionellen Rezeptor apoptotisch werden und von Makrophagen resorbiert werden. In der Medulla findet dann eine negative Selektion an medullären Thymusepithelzellen (mTEC), Makrophagen und dendritischen Zellen statt, bei der Thymozyten mit Rezeptoren gegen körpereigene Antigene aussortiert werden. Dazu liegen in der Medulla die als Hassall'sche Körperchen bezeichneten Strukturen, welche ebenfalls der Resorption dienen. Erfolgreich rekombinierte und differenzierte Thymozyten wandern anschließend als CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Helfer Zellen oder als CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup> und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen aus dem Thymus in die peripheren Gewebe aus. (verändert nach Pezzano et al., 2001).

Der Cx57-Promotor ist im Thymus nur in äußerst wenigen Zellen in der Medulla aktiv, zu deren genauer Identität es bisher nur anfängliche Untersuchungen beruhend auf der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität in der Cx57-LacZ Mauslinie gibt (Dissertation S. Hombach, 2004). Zunächst wurde eine Rolle in einem speziellen G8.8 (Ep-CAM) positiven Subtyp von mTECs vermutet, welcher die Fähigkeit besitzt, eine Vielzahl gewebespezifischer Antigene aus der Peripherie zu exprimieren. Dies ist in der Ausbildung der Toleranz gegen körpereigene Antigene von großer Bedeutung (Derbinski et al., 2001). Eine Expression von Cx57-LacZ in G8.8 positiven mTEC konnte jedoch nicht gezeigt werden (Dissertation S. Hombach, 2004). Stattdessen trat vereinzelt lacZ-Expression in CD45 positiven Thymozyten oder Makrophagen auf. Die genaue Bestimmung des Cx57 positiven Zelltyps in der Medulla steht jedoch noch aus.

In dieser Arbeit wurde die Expression des DT-Rezeptors unter der Kontrolle des Cx57-Promotors genutzt, gezielt Cx57 exprimierende Zellen dieses unbekanntes Zelltyps im Thymus der Maus zu ablatieren. Aufgrund der geringen Anzahl Cx57-lacZ positiver Zellen in diesem Organ (nur etwa einige hundert; Dissertation S. Hombach, 2004) wurde jedoch angenommen, dass dies keine größeren Auswirkungen auf den gesamten Thymus haben sollte. Überraschenderweise führte eine Injektion von 100 ng DT pro Tag über den Zeitraum von einer Woche jedoch in einigen Fällen zu einer drastischen Reduktion in der Größe des Thymus um etwa 90 % und der Anzahl CD4/CD8 doppelt positiver Zellen (Abb. 4.17 und 4.19), die weit über die Anzahl der lacZ-positiven Zellen hinaus geht. Eine direkte Wirkung von DT auf Thymozyten und damit eine Expression des DT-Rezeptors in einer größeren als der bisher bekannten Population im Thymus wurde mithilfe einer Behandlung isolierter Thymozyten mit 1  $\mu$ g/ml DT ausgeschlossen (Abb. 4.20).

Ein indirekter Einfluss auf die Größe des Thymus und die Entwicklung CD4/CD8 doppelt positiver Thymozyten wurde zuvor für Östrogen und den zugehörigen Rezeptor beschrieben. So führt das Fehlen des Östrogen-Rezeptors in der Maus zu einem um 35-55 % verkleinerten Thymus und einer drastischen Reduktion der Anzahl CD4 einfach und CD4/CD8 doppelt positiver Thymozyten um 70-80 % (Yellayi et al., 2000). Eine Behandlung mit synthetischem Östrogen über intraperitoneale Injektion führte ebenfalls zu einer Verkleinerung des Thymus um bis zu 80 % und betraf auch hier die Entwicklung CD4/CD8 doppelt positiver Thymozyten (Rijhsinghani et al., 1996; Zoller und Kersh, 2006). Auch eine Herunterregulation des Glukokortikoidrezeptors mittels antisense

Transkripten führte zu einer reduzierten Größe des Thymus und wirkte ebenfalls auf die Entwicklung CD4/CD8 doppelt positiver Zellen (King et al., 1995). Zusätzlich bewirkt auch die Ausschüttung von Glukokortikoiden sowie verschiedener Zytokine eine entsprechende Verringerung der Größe des Thymus und eine Reduktion der Anzahl CD4/CD8 doppelt positiver Thymozyten (Gruver und Sempowski, 2008). Auslöser hierfür können auch Infektionen (Savino, 2006), Unterernährung oder Sepsis sein (Gruver und Sempowski, 2008). Aufgrund der geringen Anzahl Cx57- und damit DT-Rezeptor-exprimierender Zellen im Thymus und einer Vielzahl von anderen Effekten, die eine Verkleinerung des Thymus bewirken können, ist anzunehmen, dass es sich hierbei um einen Sekundäreffekt handelt. Denkbar wäre z.B. ein Versagen der Leber, welche in DT-behandelten Cx57<sup>DTR/+</sup> Mäusen deutliche Veränderungen zeigte (vergl. Abb. 4.17).

Die Verkleinerung des Thymus durch den Tod CD4/CD8 doppelt positiver Thymozyten war in den meisten untersuchten Tieren auch mit starken Krankheitssymptomen bis hin zum Tod verbunden. In allen untersuchten kranken oder toten Mäusen war der Thymus verkleinert. Dies führt zu der Frage, woran einige siebenmal mit DT behandelte Cx57<sup>DTR/+</sup> Tiere sterben. Eine Verkleinerung des Thymus an sich sollte nicht zum Tod der Maus führen (Rijhsinghani et al., 1996). Ein Stopp der Produktion neuer Thymozyten über einen längeren Zeitraum könnte Auswirkungen auf die Zahl und Diversität der T-Zellen in der Peripherie und damit die Immunabwehr der Tiere haben (Gruver und Sempowski, 2008). Da die DT-behandelten Cx57<sup>DTR/+</sup> Mäuse in einer nicht völlig keimfreien Umgebung gehalten wurden, könnte dies Erkrankungen wie Maushepatitis (MHV) ausbrechen lassen. Die hier beobachteten Effekte traten allerdings wesentlich schneller auf, als für einen Immundefekt zu erwarten wäre, und in der Milz als peripheres lymphatisches Organ zeigten sich keine Auswirkungen auf die Größe des Organs, die Anzahl der isolierten Zellen und den Anteil an CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Zellen (Analyse S. Temme und Prof. N. Koch, Bonn). Dies spricht gegen einen Immundefekt als Folge der DT-Behandlung. Eine Untersuchung der Thymozyten aus anderen lymphatischen Geweben wie den Lymphknoten oder eine DT-Behandlung unter keimfreien Bedingungen könnten jedoch weiteren Aufschluss darüber geben.

Eine grobe Betrachtung der Niere von Cx57<sup>DTR/+</sup> Mäusen nach DT Injektion zeigte keine Veränderung dieses Organs. Die Leber war in diesen Tieren jedoch wesentlich heller und blutärmer als in entsprechenden wt-Kontrollen (Abb. 4.17). In der Leber von juvenilen und adulten Cx57lacZ-Mäusen wurde bisher keine Expression der  $\beta$ -Galaktosidase nachgewiesen (Dissertation S. Hombach, 2004), weshalb eine Expression des DT-Rezeptors und damit auch eine direkte Wirkung der DT-Behandlung nicht zu erwarten war. Auf eine Leberentzündung ausgelöst durch MHV gab es morphologisch keine Hinweise. Ob die Veränderung der Leber also einen Phänotyp darstellt, welcher möglicherweise zum Tod der DT-behandelten Cx57<sup>DTR/+</sup> Tiere führte, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Auch eine Expression des DT-Rezeptors in einem weiteren wichtigen Zelltyp in einem anderen Gewebe kann nicht völlig ausgeschlossen

werden, weshalb Veränderungen weiterer Organe im Folgenden genauer untersucht werden müssen.

Die Variabilität des beobachteten Phänotyps erschwerte eine solche Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit. So führte die Behandlung von Cx57<sup>DTR/+</sup> und Cx57<sup>DTR/lacZ</sup> Tieren siebenmal mit 100 ng DT pro Tag (7 x 100 ng) nur bei etwa 40 % der DT behandelten Tiere mit einem DTR-Allel zu einer Reduktion der Größe des Thymus (Tab. 4.3) und zum Erkranken der Tiere. Hierfür sind mehrere Gründe denkbar, von denen einige ausgeschlossen werden konnten:

1. Die hier beobachteten Auswirkungen der DT-Behandlung waren erwartungsgemäß von der Expression des DT-Rezeptors abhängig und keine unerwünschte Nebenwirkung, da ausschließlich Tiere mit einem Cx57-DTR Allel, jedoch keine Wildtyp-Tiere erkrankten (Abb. 4.16).
2. Das Geschlecht der Tiere hatte keinen Einfluss, da beide Geschlechter etwa gleich häufig betroffen waren.
3. Der genetische Hintergrund der verwendeten Mauslinie (bei den Versuchstieren handelte es sich um eine Mischung aus C57BL/6 und 129SV) konnte als Faktor ebenfalls ausgeschlossen werden, da selbst bei Geschwistertieren gleichen Genotyps Unterschiede in der Verkleinerung des Thymus auftraten.
4. Der Thymus hat im Laufe der Entwicklung unterschiedliche Bedeutung. Die Aktivität und relative Größe des Thymus sind bei der Maus etwa vier bis sechs Wochen nach der Geburt am größten, was der Pubertät beim Menschen entspricht, während mit zunehmendem Alter ein Großteil durch Fett und Bindegewebe ersetzt wird (Müller-Hermelink et al., 1982; Steinmann, 1986). Ein Einfluss des Alters auf die Wirkung der DT-Behandlung auf den Thymus von Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren konnte jedoch im Rahmen einer gleichzeitigen DT-Behandlung von Tieren unterschiedlichen Alters (zwischen 4 Wochen und 6 Monaten) ausgeschlossen werden, da sich kein entsprechender Zusammenhang zeigte (nicht gezeigt).
5. Eine mögliche Quelle für die Unterschiede in der Wirkung auf den Thymus könnte auch in der Injektionsprozedur liegen. Bei intraperitonealer Injektion kann die effektiv verabreichte Dosis teilweise schwanken. Da in allen 7 x 100 ng DT behandelten Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren die Horizontalzellen der Retina nahezu vollständig ablatiert wurden, ist gezeigt, dass DT in den Blutkreislauf der Tiere und damit über die Blut/Retina Schranke ins Auge gelangt ist (Tab. 4.3). Der Thymus ist jedoch im Gegensatz zu den Neuronen der Retina ein stark proliferatives Gewebe mit ständiger Einwanderung von Thymozytenvorläufern aus dem Knochenmark, so dass viele Zellen nachgebildet werden könnten. (Pezzano et al., 2001; Gäbler et al., 2007). Daher ist für eine entsprechende Wirkung im Thymus möglicherweise eine konstant hohe Dosis notwendig, während sich in der Retina die Wirkung jeder einzelnen Dosis addiert und Schwankungen der täglichen Dosis nicht ins Gewicht fallen. Durch Schwankungen der effektiven Dosis bei der intraperitonealen Injektion könnte die DT-Konzentration zwischenzeitlich sinken, und

die Zellen im Thymus würden sich erholen. Dies könnte so die Variabilität des Thymus-Phänotyps erklären.

Zur Untersuchung der Ablation der Horizontalzellen und deren Auswirkungen auf die Morphologie der Retina von Mäusen wurde in dieser Arbeit ein Injektionsprotokoll entwickelt, das die Effekte von DT auf den Thymus vermeiden konnte (siehe 4.1.5). Durch Unterbrechung der Injektion für zwei Wochen zwischen zwei dreitägigen Behandlungen mit 100 ng DT wurde dabei möglichen anderen betroffenen Geweben Zeit zur Regeneration gegeben. Mithilfe dieses Protokolls war es möglich, die negativen Auswirkungen der DT-Injektion auf die Gesundheit der Tiere zu umgehen und zuverlässig offensichtlich gesunde Horizontalzell-ablatierte Mäuse zu erzeugen. Für die Untersuchung des Effektes der DT-abhängigen Ablation in anderen Organen wäre jedoch der umgekehrte Weg von Interesse. So könnte die Verwendung einer deutlich höheren Dosis (z.B. mehrfach 1 µg täglich oder 100 ng DT dreimal täglich) Ungenauigkeiten der effektiven Dosen ausgleichen und eine zuverlässigere Wirkung auf den Thymus erzielen. Eine entsprechende Dosis zeigte in einer vorherigen Arbeit (Buch et al., 2005) keine unspezifischen Nebenwirkungen. Um unerwünschte Nebeneffekte zu vermindern wäre auch die Verwendung von osmotischen ALZET-Pumpen (Charles River, Sulzfeld) denkbar. Eine Prozedur, welche zuverlässig den entsprechenden Phänotyp hervorruft, könnte dann die Aufklärung der Gründe für den Tod DT-behandelter Cx57<sup>DTR/+</sup> Mäuse ermöglichen.

### 5.1.5 Bewertung der Cx57-DTRfrtCre Mauslinie

Die in dieser Arbeit erzeugte neue transgene Mauslinie konnte erfolgreich zur Ablation von DT-Rezeptor exprimierenden Zellen in der Retina eingesetzt werden. Dabei ist der Zeitpunkt in der Entwicklung der Maus wählbar und kompensatorische oder unspezifische Effekte während der Retinaentwicklung (vergl. Verlust der äußeren Plexiformen Schicht in Peachy et al., 1997) wurden so ausgeschlossen. Die Expression des DT-Rezeptors unter dem Cx57-Promotor erwies sich in Horizontalzellen zur Ablation als stark genug, wenn auch das Fusionsprotein aus DT-Rezeptor und eGFP nicht direkt nachweisbar war. Unerwartet war die Auswirkung der DT-Behandlung auf andere Organe. So hatte eine DT-Behandlung von Cx57<sup>DTR/+</sup> Mäusen eine drastische Reduktion der Größe des Thymus und eine Veränderung der Leber zur Folge. Im Thymus handelte es sich trotz nachgewiesener Expression von Cx57 vermutlich um einen Sekundäreffekt. Die Auswirkung auf die Leber konnte noch nicht ausreichend untersucht werden, könnte jedoch möglicherweise den Tod einiger Tiere erklären und ein Hinweis auf eine bisher unbekannte Expression von Cx57 in der Leber sein. Die Wirkung auf andere Organe als die Retina konnte mithilfe eines entsprechenden Injektionsprotokolls umgangen werden, so dass es möglich war zuverlässig offensichtlich gesunde Horizontalzell-ablatierte Mäuse zu erzeugen. Eine Analyse der Morphologie der Retina sowie deren Funktion im ERG zeigten jedoch, dass in Horizontalzell-ablatierten Tieren die Signalweiterleitung

zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen vermutlich unterbrochen ist. Somit sind diese Tiere nicht geeignet, den Einfluss der Rückkopplung der Horizontalzellen auf die Signalverarbeitung in der synaptischen Triade der Photorezeptoren zu untersuchen. Eine Untersuchung kurz nach oder während der DT-Behandlung könnte der Degeneration der synaptischen Triade zuvorkommen und so dennoch die Bedeutung der Rückkopplung der Horizontalzellen aufklären. Dazu müsste jedoch zunächst der genaue Zeitpunkt der Ablation bzw. der Apoptose der Horizontalzellen festgestellt werden. Zusätzlich könnte die Zerstörung des Kontaktes zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen infolge der Horizontalzell-Ablation essentielle Funktionen von Horizontalzellen zum Erhalt dieser Struktur aufzeigen.

### 5.1.6 Die Cx57-Cre Mauslinie

Die zweite Anwendung der Cx57-DTR<sup>frt</sup>Cre Mauslinie ist die Deletion gefloxter Gene mithilfe der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Cx57-Promotors (Cx57-Cre). Dazu konnte die von *frt*-Stellen umgebene kodierende Sequenz für das DTR-eGFP Fusionsprotein mittels FLP-Rekombinase erfolgreich entfernt werden (Abb. 4.7). Die Expression der mRNA für die Cre-Rekombinase in der Retina von Cx57<sup>Cre/+</sup> Mäusen wurde mittels RT-PCR Analysen nachgewiesen (Abb. 4.8) und deren Funktion anhand einer Cre-Reporter Mauslinie, der ROSA26-STOP<sup>flox</sup>YFP (kurz: ROSY) Mauslinie, analysiert (Kap. 4.1.8). In dieser Mauslinie wurde eine gefloxt Stop-Kassette gefolgt von der kodierenden Region des verstärkt gelb-fluoreszierenden Proteins (eYFP) in den ROSA26-Lokus eingebracht (Srinivas et al., 2001). Die Aktivität der Cre-Rekombinase führt zum Entfernen der Stop-Kassette, was wiederum die Expression des eYFP Reportergens unter der Kontrolle des ubiquitären ROSA26-Promotors ermöglicht (Soriano, 1999). Alle Zellen mit Expression der Cre-Rekombinase und alle Nachkommen solcher Zellen sollten eine Expression des eYFP-Reporterproteins aufweisen. In der Retina eines Cx57<sup>Cre/+</sup> ROSA26<sup>flox-YFP/+</sup> Tieres war dies der Fall (Kap. 4.1.8). Hier konnte eYFP in einem lebenden Retina-Präparat einer Cx57<sup>Cre/+</sup> ROSA26<sup>flox-YFP/+</sup> Maus durch seine Eigenfluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 4.21 A). Dies zeigt die gewünschte Aktivität der Cre-Rekombinase in Horizontalzellen in der Cx57Cre Mauslinie. Zusätzlich ist die Expressionsstärke des eYFP unter dem ROSA26-Promotor in Horizontalzellen stark genug dieses direkt nachzuweisen. In Kryoschnitten wurde das eYFP-Protein in Horizontalzellen mittels Immunfluoreszenzanalysen nachgewiesen (Abb. 4.21 B-D). Anhand der Morphologie der angefärbten Zellen und einer Ko-Immunfärbung mit Calbindin-spezifischen Antikörpern wurden diese als Horizontalzellen identifiziert. Neben den Horizontalzellen waren in diesen Immunfluoreszenzanalysen in einer Cx57<sup>Cre/+</sup> ROSA26<sup>flox-YFP/+</sup> Maus jedoch auch vereinzelt Zellen in der äußeren nukleären Schicht schwach angefärbt (Abb. 4.21 B). Ob dies auf die Expression der Cre-Rekombinase zurückzuführen ist, muss mithilfe von Cx57<sup>+/+</sup> ROSA26<sup>flox-YFP/+</sup> Kontrollen untersucht werden, die zum Zeitpunkt der Analysen nicht zur Verfügung standen. Für

eine Aktivität des Cx57-Promotors oder Expression des Cx57-Proteins in einem Zelltyp in der äußeren nukleären Schicht der Photorezeptoren gibt es jedoch bisher keine Hinweise (Hombach et al., 2004; Ciolofan et al., 2007). Auch eine Ablation eines Zelltyps in der äußeren nukleären Schicht wurde in elektronenmikroskopischen Analysen DT-behandelter Retina nicht beobachtet (Analysen U. Janssen-Bienhold; nicht gezeigt). Eine Expression in einem Vorläufer dieses Zelltyps im Verlauf der Entwicklung der Retina wäre möglich, was zur Expression von eYFP in allen daraus resultierenden Zellen führen würde. So ist der Cx57-Promotor bereits in einzelnen, unregelmäßig in der Retina verteilten Zellen am embryonalen Tag 16.5 aktiv (Dissertation S. Hombach, 2004).

Insgesamt war die FLP-vermittelte Deletion der DT-Rezeptor Sequenz erfolgreich und führte zur Expression und Funktion der Cre-Rekombinase in Horizontalzellen. Ob diese die gewünschte Spezifität besitzt und damit zur Horizontalzell-spezifischen Deletion gefloxter Gene eingesetzt werden kann, bedarf weiterer Analysen.

## **5.2 Kanaleigenschaften von Cx57 in HeLa-Zellen**

Die Aktivität des Cx57 Promotors konnte bisher nur in äußerst wenigen Zelltypen in nur drei verschiedenen Geweben der Maus nachgewiesen werden (Hombach et al., 2004). Diese spezialisierte Expression legt die Vermutung nahe, dass Cx57 Kanäle besondere Eigenschaften haben müssen, die von anderen Mitgliedern der Connexin-Familie nicht übernommen werden können.

### **5.2.1 Die Cx57eGFP HeLa Zelllinie**

Um die Kanaleigenschaften von Cx57 in seiner gespleißten auf zwei Exone verteilten Form (vergl. Hombach et al., 2004 entgegen Manthey et al., 1999) genauer untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit eine stabile HeLa Zelllinie hergestellt, welche ein Fusionsprotein aus Cx57 und eGFP exprimiert. Die Expression des Fusionsproteins wurde mittels Fluoreszenz-, Northernblot- und Immunoblot-Analysen bestätigt (Abb. 4.23). Eine Fluoreszenz des Cx57eGFP Fusionsproteins zeigte sich in stabil transfizierten HeLa Zellen in der Plasmamembran, wo sowohl punktuelle Signale in Form von Plaques als auch eine einheitlichen Fluoreszenz auftraten. Einzelne, vermutlich vesikuläre Signale waren im Zytosol zu erkennen, jedoch keine Signale im Kern. Die Bildung von Gap Junction Plaques wurde auch funktionell bestätigt. So wurde zwischen Zellpaaren mit einem gemeinsamen Cx57eGFP-Plaques eine elektrische Kopplung gemessen (siehe Kap. 4.2.5). Zusätzliche, nicht in Plaques auftretende Cx57eGFP-Signale in der Plasmamembran deuten auf Cx57-Halbkanäle hin, deren Funktion ebenfalls in dieser Zelllinie nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.29). Für die Herstellung stabil Cx57 exprimierender Zelllinien in dieser und vorhergehenden Arbeiten (Diplomarbeit S. Latt, 2003; Dissertation S. Hombach, 2004; Dissertation K. Wellershaus, 2006) stellte diese Halbkanalaktivität möglicherweise ein Problem dar. So gelang es hier

nicht eine stabile Cx57-wt exprimierende Zelllinie zu erzeugen, obwohl eine transiente Expression von Cx57 nachgewiesen werden konnte (Kap. 4.2.3). Auch die hier charakterisierte Cx57eGFP Zelllinie zeigte Probleme bei der Stabilität der Expression von Cx57 (vergl. Kap. 4.2.2). Beides lässt sich vermutlich auf die Aktivität von Cx57 Halbkanälen zurückführen. So ist die Öffnung des Cx57-Halbkanals von einer Verringerung der extrazellulären Calciumkonzentration und einer Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes abhängig (vergl. Kap. 4.2.6). In der normalen Kultur von HeLa-Zellen wird zum Ablösen der Zellen von der Kulturschale eine Lösung ohne Calcium und mit einem alkalischen pH-Wert verwendet (Elfgang et al., 1995). Ebenso wie die Inkubation in Calcium-freiem Medium mit 5 mM Ammoniumchlorid (Abb. 4.29) könnte dies zum Öffnen der Cx57-Halbkanäle, damit zum Anschwellen der Zellen und schließlich zu deren Tod führen (vergl. Abb. 4.29), was die Schwierigkeiten bei der Herstellung stabiler Cx57 Transfektanten erklären würde. Entsprechend stabilisierte eine Erhöhung der Calcium-Konzentration während des Ablösens (Prof. F. Bukauskas, New York, persönliche Mitteilung) und im Kulturmedium (vergl. Kap. 4.2.2) die Expression in der Cx57eGFP HeLa-Zelllinie.

### 5.2.2 Kanaleigenschaften von Cx57

Die Kanaleigenschaften von Cx57 wurden in einer Arbeit von Manthey et al. (1999) in stabil Cx57 exprimierenden HeLa Zellen bereits untersucht. Dabei wurde jedoch eine ausschließlich auf Exon 2 kodierte Form von Cx57 verwendet, welche in der Retina nicht nachgewiesen werden konnte (Hombach et al., 2004). Stattdessen wird dort eine gespleißte Form des Proteins exprimiert, wodurch nach Spleißen eines dritten Exons an Exon 2 die letzten 25 Aminosäurereste der ursprünglichen Form gegen zwölf neue ausgetauscht werden (Hombach et al., 2004). Zusätzlich wurden in dieser Arbeit drei weitere Punktmutationen in der ursprünglichen Cx57 Sequenz identifiziert, welche zu einem Austausch von drei weiteren Aminosäurereste in zytoplasmatischer Schleife (K110R) und C-Terminus (I272V, A330T) führen. In den für die Kanaleigenschaften wichtigen Transmembrandomänen sowie den extrazellulären Schleifen und dem N-Terminus (Gemel et al., 2006; Kronengold et al., 2003a und 2003b) unterschieden sich die beiden Cx57-Sequenzen jedoch nicht. Entsprechend ähnlich ist auch die Spannungsabhängigkeit beider Isoformen (vergl. Manthey et al. 1999; Abb. 4.27). Sie hat die Form einer Glockenkurve mit ihrem Maximum bei 0 mV. Die Einzelkanalleitfähigkeit dagegen unterschied sich stärker. Hier wurden 58 pS für die retinale Form im Vergleich zu 28 pS bei Manthey et al. (1999) gemessen. Die Einzelkanalleitfähigkeit der retinalen Form entspricht dabei fast exakt der für Gap Junctions von Horizontalzellen des Barsches bestimmten Einzelkanalleitfähigkeit von 50-60 pS (McMahon et al., 1989) und damit wesentlich eher den physiologisch gemessenen Eigenschaften der Connexine der Horizontalzellen. Die meisten elektrophysiologischen Analysen wurden an der stabilen Cx57eGFP-Zelllinie durchgeführt, die wichtigsten Ergebnisse (Einzelkanalleitfähigkeit,

Spannungsabhängigkeit oder pH-Abhängigkeit) konnten jedoch an transienten Transfektanten des pMJ-Cx57IRESeGFP Vektors (vergl. Kap. 4.2.3) bestätigt werden (Analysen Prof. F. Bukauskas, New York, nicht gezeigt). Das C-terminal an Cx57 fusionierte eGFP hatte in diesem Fall keine Auswirkungen auf die Permeabilität und Regulation von Cx57-Gap Junctions, wie dies für das Öffnen und Schließen von Gap Junction Kanälen eines Fusionsproteins aus Cx43 und eGFP der Fall war (vergl. Contreras et al., 2003).

Eine interessante Eigenschaft von Cx57 Kanälen, die in dieser Arbeit aufgedeckt wurde, ist die extreme pH-Abhängigkeit der Cx57 vermittelten Kopplung. Der größte Teil der Cx57eGFP-Kanäle ist bei einem pH-Wert unter 7,3 geschlossen. Bei Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes auf 7,4-7,6 wird jedoch ein wesentlich größerer Anteil geöffnet (Abb. 4.28). Diese Eigenschaft wurde in den Untersuchungen von Manthey et al. (1999) nicht beobachtet. Bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit von Cx43 Kanälen wurde eine Beteiligung des C-Terminus bereits gezeigt (Morley et al., 1997). Dabei wird eine Veränderung der Interaktion von C-Terminus und zytoplasmatischer Schleife im sog. Ball-an-Kette Modell vermutet (Morley et al., 1996). Der pH-Wert, bei dem die meisten anderen Connexine geschlossen werden, liegt jedoch deutlich niedriger (Morley et al., 1996; Francis et al., 1999). Für Cx57 kann dies eine Anpassung an die Gegebenheiten in Horizontalzellen darstellen, deren intrazellulärer pH-Wert in mehreren Untersuchungen bei etwa 7,3-7,4 liegt (Haugh-Scheidt et al., 1998; Takahashi et al., 1993; Dixon et al., 1996). In diesem Bereich ist der Cx57-Kanal am empfindlichsten gegenüber pH-Wert Änderungen (Abb. 4.28) und könnte schon mit kleinen Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes reguliert werden. Eine Alkalisierung des extrazellulären pH-Wertes als Antwort auf Depolarisierung der Horizontalzellen oder Behandlung mit Glutamat wurde an isolierten Horizontalzellen des Rochens bzw. des Welses bereits beobachtet (Molina et al., 2004; Kreitzer et al., 2007). Auch bei der lichtabhängigen Veränderung der Kopplung zwischen Horizontalzellen konnte eine Beteiligung des pH-Wertes, wenn auch im A-Typ der Kaninchen-Retina, gezeigt werden (Hampson et al., 1994). Dies weist auf eine Regulation der Cx57-vermittelten Gap Junction Kopplung über den intrazellulären, möglicherweise auch lokalen pH-Wert hin.

Viele Connexin Isoformen bilden neben Gap Junction Kanälen zusätzlich Halbkanäle in der Plasmamembran, deren physiologische Bedeutung bisher nur teilweise geklärt ist (vergl. Spray et al., 2006). Für das Connexin der Horizontalzellen wurde bereits von Kamermans et al. (2001) eine Funktion als Halbkanal in der Rückkopplung von Horizontalzellen zu den Photorezeptoren vorgeschlagen. Zunächst wurde angenommen, dass es sich hierbei um Cx26 handelt (Janssen-Bienhold et al., 2001), was jedoch in darauf folgenden Untersuchungen widerlegt werden konnte (Deans und Paul, 2001). Durch die Identifizierung von Cx57 als wichtigstes Connexin in Horizontalzellen (Hombach et al., 2004) wurde dieses Connexin als Halbkanalbildner vorgeschlagen. So wurde im Zebrafisch ein Cx57-verwandtes Protein in den dendritischen Spitzen der Horizontalzellen nachgewiesen (Shields et al., 2007). In der Maus ist das Vorkommen



von Cx57 in der synaptischen Triade der Photorezeptoren jedoch noch nicht sicher gezeigt. Eine Untersuchung mithilfe Cx57-spezifischer Antikörper deutet zwar darauf hin (Ciolofan et al., 2007), Analysen der Antikörperspezifität unter Verwendung der Cx57-KO Mäuse lassen jedoch an der Spezifität der Antikörper zweifeln (Dissertation K. Wellershaus, 2006). In Cx57eGFP-HeLa Zellen konnte eine Halbkanalaktivität nachgewiesen werden (Abb. 4.29), welche jedoch abhängig von der extrazellulären Calciumkonzentration und ebenso wie die Aktivität der Cx57-Gap Junction Kanäle abhängig vom intrazellulären pH-Wert war. Auf der Seite der Photorezeptoren spielen Calciumkanäle eine wichtige Rolle in der Rückkopplung von Horizontalzellen (Verweij et al., 1996), weshalb eine niedrige extrazelluläre Calciumkonzentration zwischen Horizontalzellen und Photorezeptoren, wie für die Aktivität von Cx57-Halbkanälen notwendig, eher unwahrscheinlich ist. Zusätzlich zeigten Untersuchungen des Center-Surround Antagonismus von Ganglienzellen in der Cx57-KO Maus keine Veränderungen durch den Verlust von Cx57 (Dedek et al., 2007). Zusammen widerspricht dies trotz einiger Hinweise auf einen Cx57-Halbkanal einer entsprechenden Funktion von Cx57 in Horizontalzellen. In anderen Geweben, wie der embryonalen Niere oder dem Thymus, ist eine Bedeutung von Cx57-Halbkanälen jedoch nicht auszuschließen.

### 5.2.3 Besonderheiten von Cx57

Für verschiedene Connexine wird eine Rolle des C-Terminus in der Genregulation im Zellkern vermutet (Dang et al., 2003). Der C-Terminus des Horizontalzell-spezifischen Zebrafisch-Connexins Cx55.5 wird vermutlich über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) als separates nicht membranständiges Protein exprimiert und ist in transfizierten NIH3T3 Zellen teilweise kernlokalisiert (Ul-Hussain et al., 2008). In der hier untersuchten stabil Cx57eGFP exprimierenden HeLa-Zelllinie ist das C-terminale Fusionsprotein aus Cx57 und eGFP jedoch nicht im Kern lokalisiert (Abb. 4.23 A), und auch in transient Cx57IRES-eGFP transfizierten N2A-Zellen war das Signal für Cx57 in Immunfluoreszenzanalysen mit Cx53.8-Antikörpern (Cx57-Ortholog des Karpfen, Janssen-Bienhold et al., eingereicht) auf die Membran und das Zytoplasma beschränkt. Für eine ähnliche Bedeutung des Cx57 C-Terminus, wie bei Cx55.5 beschrieben, gibt es somit keine Hinweise.

Der mit 262 Aminosäureresten besonders lange C-Terminus von Cx57 könnte dagegen eine andere Bedeutung haben. Die wichtigste Besonderheit von Cx57 ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit die extreme pH-Abhängigkeit von Cx57-Kanälen in einem vergleichbar hohen pH-Bereich mit einem  $pK_a$ -Wert von 7,42. Im Vergleich liegt der  $pK_a$ -Wert von Cx43-Kanälen bei 6,78 (Morley et al., 1996) und der  $pK_a$  von Cx46 bei 7,13 (Francis et al., 1999). Dies könnte, wie bereits beschrieben, eine Anpassung an den intrazellulären pH-Wert von Horizontalzellen darstellen, welcher etwa bei 7,3-7,4 liegt. Für Cx43 wurde eine Beteiligung des C-Terminus an der pH-abhängigen Schließung der Kanäle gezeigt (Morley et al., 1997), so dass ein Ball-an-Kette Modell unter Beteiligung

mehrerer protonierbarer Histidinreste in zytoplasmatischer Schleife und C-Terminus vorgeschlagen wurde (Duffy et al., 2002). Der Cx57-C-Terminus enthält eine ganze Reihe von Histidin-Resten, die bei einem ähnlichen Mechanismus wie für Cx43 eine Rolle spielen könnten.

Zusätzlich wird die Kopplung von Horizontalzellen durch verschiedene Neurotransmitter lichtabhängig reguliert. So können Stickstoffmonoxid, Dopamin und Retinsäure die Kopplung von Horizontalzellen reduzieren (vergl. Weiler et al., 2000). Diese Regulation könnte neben dem pH-Wert (Hampson et al., 1994) über eine Phosphorylierung von Cx57 vermittelt sein. So enthält der Cx57 C-Terminus eine große Anzahl von Konsensus-Sequenzen für verschiedene Kinasen: unter anderem sechs für die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängige Kinase (CaMKII), sieben für die Proteinkinase A (PKA) und 13 Erkennungssequenzen für die Proteinkinase C (PKC). *In vitro* wurde eine Phosphorylierung des Cx57 C-Terminus mittels PKA, PKC und Kreatin Kinase 2 (CK2) bereits nachgewiesen (Dissertation S. Hombach, 2004). Der im Vergleich zu allen anderen Connexinen besonders lange C-Terminus von Cx57 könnte somit eine Anpassung an die Regulierung der Cx57-vermittelten Kopplung in Horizontalzellen darstellen.

### 5.3 Cx36-Interaktion mit CaMKII

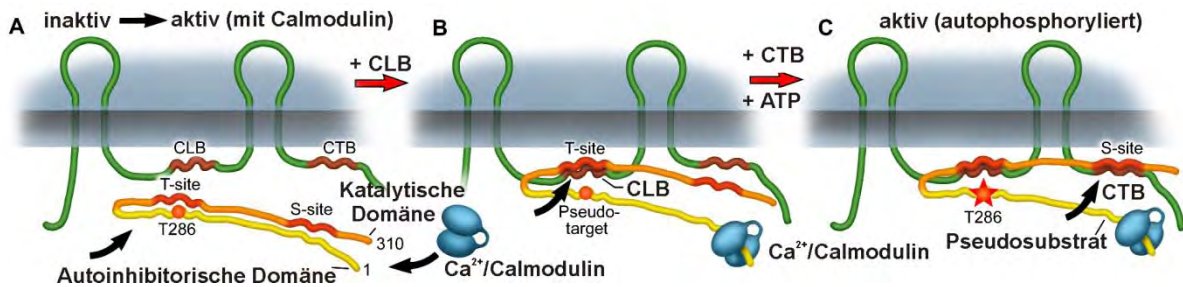
Vor Beginn dieser Arbeit wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängige Kinase (CaMKII) als neuer möglicher Interaktionspartner des neuronalen Connexins Cx36 identifiziert (Dr. C. Alev und Dr. S. Urschel, nicht gezeigt). Diese Kinase spielt eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Langzeitpotenzierung (LTP) an chemischen Synapsen (Lisman et al., 2002). Aktiviert wird die CaMKII durch ein Ansteigen der intrazellulären Calciumkonzentration über Calmodulin, welches in seiner Calcium-gebundenen Form an die CaMKII bindet. Dadurch wird die autoinhibitorische Domäne des Enzyms, welche eine der Sequenz möglicher Substrate entsprechende Region enthält (Pseudosubstrat Stelle), von der katalytischen Domäne gelöst und das Enzym damit aktiv. Durch Ablösen von Calmodulin wird die Kinase wieder inaktiviert. Bei der CaMKII handelt es sich um einen zirkulären Komplex aus zweimal sechs Untereinheiten (Kolodziej et al., 2000), so dass bei länger andauernder Aktivierung eine Untereinheit der Kinase eine andere an Threonin286 phosphorylieren kann. Man spricht von Autophosphorylierung (Hanson et al., 1994). Dadurch wird eine Interaktion mit der sogenannten T-Stelle verhindert, welche im inaktiven Zustand Threonin286 abschirmt, und die Kinase bleibt auch nach Ablösen von Calmodulin aktiv. Die Fähigkeit der dauerhaften Aktivierung der CaMKII, abhängig von einer Folge von Erhöhungen der Calciumkonzentration, gibt eine wichtige molekulare Grundlage der Langzeitpotenzierung und damit der Ausbildung von Erinnerungen (Lisman et al., 2002; Hudman und Schulman, 2002). Man spricht bei diesem Mechanismus auch von einem molekularen Schalter (Lisman und McIntyre 2001).

### 5.3.1 Bindung von Cx36 an CaMKII

In dieser Arbeit wurde anhand von *in vitro* Bindeexperimenten gezeigt, dass zwei Regionen in der zytoplasmatischen Schleife (Cx36CL) bzw. dem C-Terminus (Cx36CT) von Cx36 die Bindung des Connexins an die CaMKII vermitteln. So sind Fusionsproteine beider zytoplasmatischer Domänen in der Lage, CaMKII effektiv zu binden, während Deletionskonstrukte ohne die entsprechenden Bindestellen eine deutlich geringere Affinität zur CaMKII aufweisen. Eine Restaffinität der Deletionskonstrukte zur CaMKII, die im Vergleich zu GST alleine immer noch vorhanden ist, kann möglicherweise auf weitere an der Interaktion beteiligte Bereiche in der zytoplasmatischen Schleife und dem C-Terminus zurückgeführt werden. Beide Bindestellen in Cx36CT und Cx36CL weisen eine hohe Sequenzidentität zu zwei Bereichen der autoinhibitorischen Domäne der CaMKII auf. Cx36CT-B (Aminosäurereste 272-292) zeigt eine hohe Sequenzübereinstimmung zur Pseudosubstratstelle, Cx36CL-B (Aminosäurereste 99-119) zur Region um das wichtige Threonin286 (Abb. 5.2). Die Bindung zwischen CaMKII und Cx36 ist Calcium-abhängig. Eine Beteiligung von Calmodulin in diesem System konnte jedoch nicht untersucht werden, da vermutlich aus der *in vitro* Translation Verunreinigungen mit Calmodulin in allen Ansätzen zur *in vitro* Bindung vorhanden waren. Durch Autophosphorylierung ließ sich die Menge an gebundener CaMKII deutlich steigern (Abb. 4.30).

Die Cx36CL-Bindestelle zeigt neben der Homologie zur CaMKII eine hohe Sequenzübereinstimmung mit einer Untereinheit des NMDA-Rezeptors, eines Glutamaterezeptors (Strack et al., 2000). Diese Untereinheit (NR2B) ist an chemischen Synapsen in der Lage, an die T-Stelle der CaMKII zu binden und diese ohne Autophosphorylierung dauerhaft zu aktivieren (Bayer et al., 2001). Durch Aktivierung des NMDA-Rezeptors kommt es zusätzlich zu einer Translokation der CaMKII aus dem Zytoplasma an die sog. postsynaptische Dichteregion (PSD) (Shen und Meyer, 1999; Dosemeci et al., 2001). Die Bindung an den NMDA-Rezeptor positioniert die CaMKII damit direkt an der PSD, wo sie in ihrer aktiven Form die Funktion der Synapse verändern kann (Lisman et al., 2002). Ähnlich wie der NMDA-Rezeptor sind die beiden Binderegionen in Cx36 in der Lage, die CaMKII zu aktivieren, was durch Aktivierung der CaMKII mit den entsprechenden Bindepeptiden gezeigt werden konnte (Abb. 4.31 D). Auch für eine Translokation der CaMKII hin zu Cx36-Gap Junctions gibt es Hinweise (Dr. Georg Zoidl, unveröffentlicht). Für die Interaktion der beiden Proteine lässt sich damit folgendes Modell aufstellen (Abb. 5.2): Durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin löst sich die autoinhibitorische Domäne der CaMKII von der katalytischen Domäne (Abb. 5.2 A), wodurch die T-Stelle zur Bindung frei wird. Gleichzeitig kommt es zur Translokation der CaMKII hin zu Gap Junctions. Dort bindet die zytoplasmatische Schleife mit ihrer Pseudosubstrat-Stelle (Cx36CL-B) an die T-Stelle der CaMKII (Abb. 5.2 B). Nach Autophosphorylierung der CaMKII wird die Bindung mit anderen Substraten/Proteinen ermöglicht, was auch zu

einer deutlich verbesserten Bindung an Cx36CT-B führt (Abb. 5.2 C). Die so gebundene und aktive Kinase ist dann in der Lage, weitere Proteine zu phosphorylieren.



**Abbildung 5.2: Modell der Interaktion von Cx36 und CaMKII.** (A) Nach lokaler Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bindet  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin an die entsprechende Bindestelle der CaMKII. Diese überlappt mit der Pseudo-substratstelle in der autoinhibitorischen Domäne (gelb). (B) Dadurch wird das sog. Tor der CaMKII geöffnet, wobei T-Stelle (T-site) und Substratstelle (S-site) der katalytischen Domäne (orange) zugänglich werden. Dies ermöglicht die Bindung der zytoplasmatischen Schleife von Cx36 (grün) über die entsprechende Bindestelle (CLB) unabhängig von der Autophosphorylierung der CaMKII. (C) Autophosphorylierung der CaMKII verbessert die Bindung von Cx36CT an die S-Stelle (S-site) der CaMKII (verändert nach Alev et al., eingereicht).

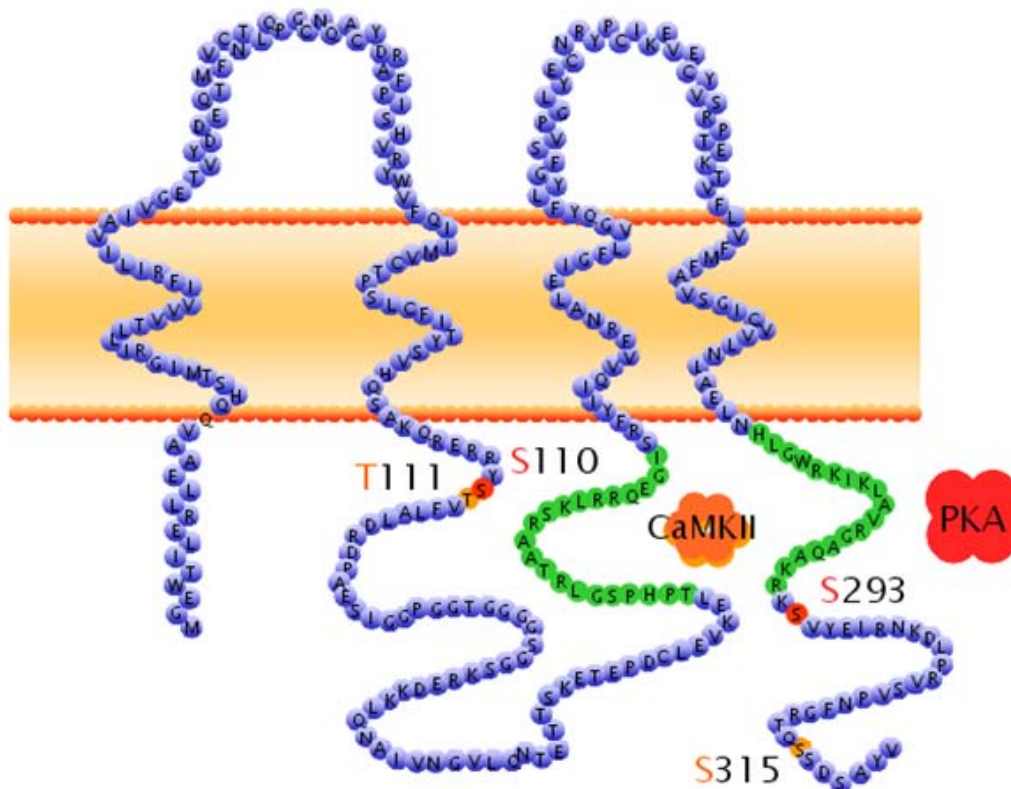
### 5.3.2 Phosphorylierung von Cx36 durch die CaMKII

Zu diesen Proteinen gehört auch Cx36 selbst. So enthält jede der beiden großen zytoplasmatischen Bereiche je zwei CaMKII Konsensus-Sequenzen (Analyse Dr. C. Alev; siehe auch Abb. 5.3). *In vitro* konnte eine Phosphorylierung beider Bereiche durch die CaMKII nachgewiesen werden (Abb. 4.31 A/B). Punktmutationen der vier vermuteten Phosphorylierungsstellen zeigten, dass in der zytoplasmatischen Schleife von Cx36 zwei direkt benachbarte Aminosäuren (S110, T111) durch CaMKII etwa gleich stark phosphoryliert werden, während dies im C-Terminus nahezu ausschließlich für S315 der Fall ist (Abb. 4.31 C).

An chemischen Synapsen verändert die CaMKII die Funktion der Synapse durch Phosphorylierung der GluR1 Untereinheit, was die Leitfähigkeit des  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazole Propionsäure (AMPA)-Rezeptors erhöht (Barria et al., 1997; Mammen et al., 1997; Derkach et al., 1999). Welche Auswirkung könnte nun die Phosphorylierung von Cx36 auf die Funktion von Gap Junctions haben? Die CaMKII abhängige Phosphorylierung von Cx36 wurde bisher *in vivo* nicht eindeutig gezeigt, jedoch war die CaMKII an der Wiederherstellung der elektrischen Kopplung durch Modafinil im Thalamus nach Inhibition durch Gap Junction Blocker beteiligt (Urbano et al., 2007). Weitere Hinweise lieferte auch ein Experiment mit der neuronalen RT4-AC Zelllinie, die ein Fusionsprotein aus Cx36 und eGFP exprimiert. Durch künstliche Erhöhung der Calciumkonzentration mittels Ionomycin wurde eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung von Cx36eGFP erreicht (Dr. S. Urschel, unveröffentlicht). Diese Erhöhung der Calciumkonzentration aktiviert jedoch möglicherweise nicht nur die CaMKII. Cx36 wird in der Retina zusätzlich durch die Proteinkinase A (PKA) lichtabhängig phosphoryliert (Urschel et al., 2006). Die für beide Kinasen identifizierten

Phosphorylierungsstellen in Cx36 überlappen teilweise (vergl. Abb. 5.3). So phosphoryliert die PKA Cx36 an S110 und S293 (Urschel et al., 2006), während dies bei der CaMKII S110/T111 und S315 sind. Daher sind sowohl eine Funktionssteigerung durch eine Zusammenarbeit beider Kinasen als auch entgegengesetzte Auswirkungen der PKA und CaMKII Phosphorylierung denkbar. PKA Phosphorylierung alleine reduziert die Cx36 bzw. Cx35 (Fisch) vermittelte Kopplung (Urschel et al., 2006; Ouyang et al., 2005).

Interessanterweise kehrt eine Deletion der letzten sieben Aminosäuren und damit auch von Serin315 die Wirkung der PKA-Phosphorylierung um (Cx35; Ouyang et al., 2005). Es ist also denkbar, dass die CaMKII durch Phosphorylierung an S315 die Struktur von Cx36 und damit die Auswirkung der Regulation durch PKA verändern könnte. Die CaMKII hätte damit eine Art Schalterfunktion für Cx36 Gap Junction Kanäle, wodurch deren Leitfähigkeit erhöht werden könnte. Ist diese Veränderung dauerhaft, könnte man von Langzeitpotenzierung einer elektrischen Synapse sprechen. Hierfür gibt es bereits Hinweise in der gemischt chemischen und elektrischen Synapse der Mauthner Zellen in Fischen (Yang et al., 1990; Pereda und Faber, 1996; Pereda et al., 1998). Die CaMKII könnte über die hier *in vitro* gezeigte Phosphorylierung von Cx36 eine wichtige Rolle in der Langzeitpotenzierung elektrischer Synapsen spielen.



**Abbildung 5.3: Phosphorylierungsstellen in Cx36.** Die Phosphorylierungsstellen von CaMKII (gelb) und PKA (rot) sind in der Sequenz von Cx36 dargestellt. Für Serin 110 (S110) wurde eine Phosphorylierung durch beide Kinasen gezeigt, während Threonin 111 (T111) und Serin 315 (S315) ausschließlich von der CaMKII und Serin293 (S293) ausschließlich durch PKA phosphoryliert werden. In grün sind die an der Bindung von Cx36 an die CaMKII beteiligten Bereiche in Cx36 zytoplasmatischer Schleife und C-Terminus dargestellt.

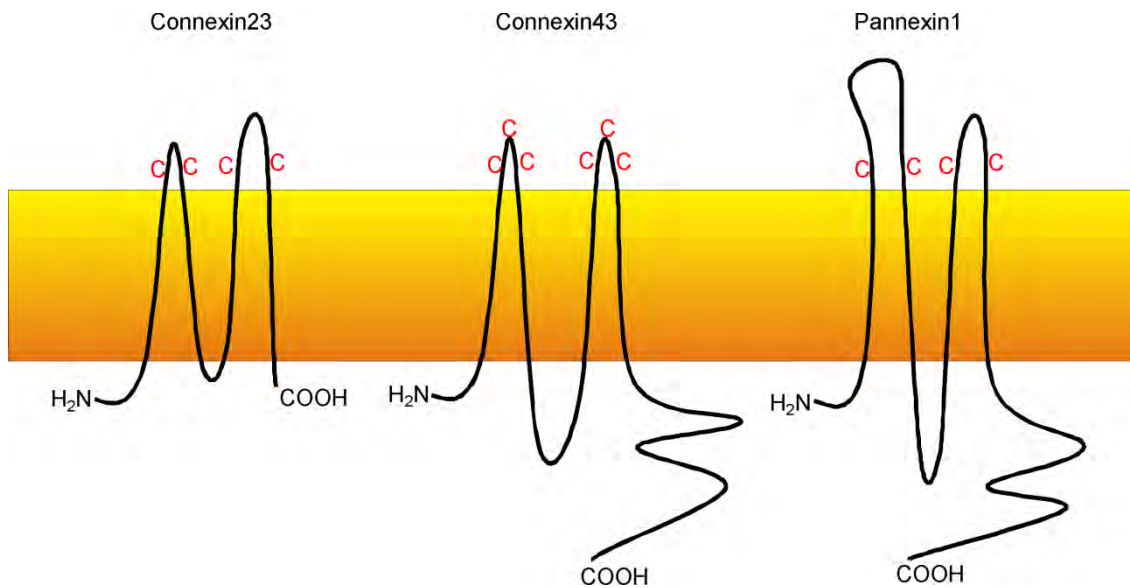
## 5.4 Analyse von Vorkommen und Kanaleigenschaften von mCx23

### 5.4.1 Sequenzanalyse von Cx23

Bisher wurden zwanzig Connexine in der Maus identifiziert und auf ihr Expressionsmuster und ihre physiologischen Eigenschaften hin untersucht (Willecke et al., 2002). Cx23 wurde als eines der letzten Connexine entdeckt (Gustincich et al., 2003; Söhl und Willecke, 2003) und zeigt in seiner Sequenz einige wichtige Besonderheiten.

Bei Cx23 handelt es sich um das kleinste aller Connexine mit besonders kurzer zytoplasmatischer Schleife (12 Aminosäurereste) und kurzem C-Terminus (13 Aminosäurereste) (Abb. 4.32 B). Diese Regionen sind zwischen den Connexinen besonders variabel mit 33 - 55 Aminosäureresten für die zytoplasmatische Schleife und 18 (Cx26) - 262 (Cx57) Aminosäureresten für den C-Terminus (Willecke et al., 2002; Hombach et al., 2004). Beide Regionen werden jedoch mit wichtigen Funktionen in Zusammenhang gebracht. So beruht eine Hypothese für den Mechanismus des Schließens von Connexin Halb- und Vollkanälen auf der Interaktion von C-Terminus und zytoplasmatischer Schleife im sog. Ball-an-Kette (Ball and Chain) Modell (Homma et al., 1998; Liu et al., 2006). Dieses Modell ist für Cx23 mit seinen äußerst kurzen intrazellulären Domänen nur schwer vorstellbar. Eine Veränderung der Anzahl von Kanälen in der Plasmamembran mithilfe interagierender Proteine, wie es für die pH-abhängige Internalisierung von Cx43 vorgeschlagen wurde (Duffy et al., 2004), ist für Cx23 ebenfalls unwahrscheinlich, da die kurzen zytoplasmatischen Bereiche vermutlich nur wenig Interaktionen im Zytoplasma zulassen. Wie auch für Cx26 mit seinem ebenfalls recht kurzen C-Terminus ist daher für Cx23 ein Verschluss nach dem Irisblenden Modell (Unwin und Ennis, 1984) zu vermuten. Möglich wäre jedoch auch eine Regulation von Cx23 in einem heteromeren Kanal über das jeweils andere Connexin. Die Bildung von heteromeren Kanälen von Cx23 ist jedoch bisher nicht untersucht. Die Kürze der zytoplasmatischen Domänen ist neben den Konsequenzen für physiologische Vorgänge auch für die Untersuchung des Proteins über Cx23-spezifische Antikörper von Bedeutung, da diese bei Connexinen meist gegen die zytoplasmatischen Bereiche gerichtet sind. Eine Herstellung Cx23-spezifischer Antikörper könnte so erschwert werden.

Die zweite Besonderheit von Cx23 ist das Fehlen des jeweils mittleren der drei Cysteinreste in den beiden extrazellulären Schleifen, wobei die zweite extrazelluläre Schleife zusätzlich verlängert ist (Abb. 4.32 C und Abb. 5.4). Dieses Motiv ist damit den Pannexinen und Innexinen ähnlicher als den Connexinen (Phelan und Starich, 2001; Panchin 2005). Dennoch zeigt die Sequenz von Cx23 eine deutliche Homologie zu den übrigen Connexinen statt zu Pannexinen oder Innexinen. In phylogenetischen Untersuchungen wurde Cx23 so auch der Familie der Connexine als das ursprünglichste Connexin zugerechnet (Iovine et al., 2008).



**Abbildung 5.4: Strukturvergleich von Connexinen und Pannexinen mit Cx23.** Die grobe Struktur der zytoplasmatischen (unten) und extrazellulären Domänen (oben) sowie der Transmembrandomänen von Cx23, Cx43 und Px1 sind im Vergleich dargestellt. Die extrazellulären Domänen von Px1 und Cx23 sind im Vergleich zu Cx43 vergrößert und enthalten nur zwei statt der drei konservierten Cysteinreste (C) in jeder extrazellulären Schleife von Cx43. Die zytoplasmatischen Domänen von Cx23 sind im Vergleich zu Cx43 und Px1 deutlich kürzer.

Da Connexine nach vorherrschender Hypothese durch konvergente Entwicklung neben den Innexinen und Pannexinen entstanden sein sollen (Alexopoulos et al., 2004; Hua et al., 2003), ist es vorstellbar, dass diese ursprünglichen Connexine wie die Innexine eine auf vier Cysteinen beruhende Kopplung über die extrazellulären Schleifen ausbildeten. Aus diesen könnte sich schließlich in Vertebraten eine neue Art der Kopplung über sechs Cysteinreste entwickelt haben. Die übrigen Gap Junction Proteine mit weiterhin vier Cysteinresten, die Pannexine und auch Cx23, übernahmen dann möglicherweise andere Funktionen, unabhängig von Gap Junction vermittelter Kopplung. So spielt Px1 eine wichtige Rolle bei der ATP-abhängigen ATP-Ausschüttung z.B. in Erythrozyten (Lokovei et al., 2006) und auch für Cx23 wäre nach den hier vorliegenden Ergebnissen eine Funktion als ATP-permeabler Halbkanal denkbar. Cx23 wäre somit ein Relikt aus der frühen Entwicklung der Connexine.

#### 5.4.2 Konservierung von Cx23 in Vertebraten

Die Genstruktur von Cx23 mit drei Exonen von 39 bp, 183 bp und 396 bp ist zwischen Spezies, in denen ein Transkript gefunden wurde, hoch konserviert und findet sich so auch in vielen anderen Genomen von Vertebraten (Tab. 4.4). Eine Ausnahme stellen die Cx23 Sequenzen im Genom von Primaten dar. Diese enthalten einige Mutationen, die zum frühzeitigen Stopp der Translation führen würden. So enthält die Cx23 Sequenz im Rhesusaffen zwei Punktmutationen in Exon 2 und wird entsprechend in der NCBI-Datenbank nicht als Transkript vorhergesagt. In der genomischen Sequenz für Cx23 von Schimpanse und Mensch liegt eine Stopp-Mutation kurz nach Beginn von Exon 3. Diese

könnte jedoch gleichzeitig als neuer Spleißakzeptor dienen, wodurch ein um vier Aminosäurereste kürzeres Protein entstehen würde (Abb. 4.32 D). Eine Expression dieses Transkriptes konnte jedoch weder in RT-PCR noch in Northernblot-Analysen gezeigt werden. Diese Stopp-Mutationen, der fehlende Nachweis eines Cx23 Transkriptes in Primaten, sowohl in der Datenbank als auch in Analysen an einem menschlichen Auge und das in allen anderen Spezies konservierte Spleißmuster legen nahe, dass es sich bei Cx23 in Primaten um ein Pseudogen handelt. Die Funktion von Cx23 in der Linse (siehe weiter unten) könnte hier von anderen Connexinen wie Cx46 oder Pannexinen übernommen werden, die wie Cx23 ebenfalls in der Lage sind, Halbkanäle zu bilden (Valiunas und Weingart, 2000; Dahl und Locovei, 2006). Da Pannexine Halbkanäle wie Cx23 Halbkanäle Calcium-unabhängig sind (Dahl und Locovei, 2006), wären diese die wahrscheinlicheren Kandidaten. Warum Cx23 in den meisten anderen Vertebraten vom Zebrafisch bis zur Maus hoch konserviert ist, während es in Primaten durch Mutationen inaktiviert wurde, bleibt jedoch offen.

### **5.4.3 Expression von Cx23 in der Maus**

Neben der Sequenz ist auch der Expressionsort von Cx23 zwischen sehr verschiedenen Spezies konserviert. So wurde kürzlich die Expression von Cx23 während der Entwicklung der Linse von Zebrafisch und Maus beschrieben (Iovine et al., 2008; Puk et al., 2008). RT-PCR Analysen in dieser Arbeit konnten dies bestätigen, und es zeigte sich eine Übereinstimmung zwischen dem Beginn der Cx23 Expression und dem Beginn der Differenzierung von Linsenepithelzellen etwa um Tag 11.5 der Embryonalentwicklung in der Maus (vergl. Puk et al., 2008). Zusätzlich konnte die Expression von Cx23 in der Linse adulter Mäuse gezeigt werden (Abb. 4.33). In der Retina ist dabei ebenfalls ein schwaches RT-PCR Signal zu erkennen. Zwar ergaben Analysen mittels *in situ* Hybridisierung während der Embryonalentwicklung auch in der Retina ein Signal für Cx23 (Puk et al., 2008), in entsprechenden Analysen am adulten Auge zeigte sich dieses jedoch nicht (Dr. G. Söhl, nicht gezeigt). Vermutlich ist das RT-PCR Signal aus RNA der Retina von adulten Mäusen auf eine Kontamination mit Linsengewebe während der Retinapräparation zurückzuführen. Cx23 ist damit nach Cx46 und Cx50 das dritte in Linsenfaserzellen exprimierte Connexin (Gong et al., 1997; White et al., 1998). Mutationen und Deletion der entsprechenden Gene führen sowohl im Menschen als auch in der Maus zur Ausbildung von Katarakten und Störungen der Linsenentwicklung (Gong et al., 2007). Eine Mutation in Cx23 dagegen bewirkt im homozygoten Zustand eine komplette Unterbrechung der Linsenentwicklung und den entsprechenden adulten Tieren fehlt die Linse (Puk et al., 2008). Cx23 scheint somit eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Linse zu spielen.



#### 5.4.4 Funktionsanalysen von Cx23 Kanälen

Aufgrund der Sequenzbesonderheiten und der Bedeutung von Cx23 in der Entwicklung der Linse wurde die Funktion von Cx23 Kanälen in stabil transfizierten HeLa-Zelllinien untersucht (Kap. 4.4.3 und 4.4.4). Ein Fusionsprotein aus mCx23 und eGFP gelangte in die Plasmamembran von HeLa Zellen. Dies war dagegen bei einem entsprechenden Konstrukt mit Zebrafisch Cx23a nicht der Fall; es erreicht nicht die Plasmamembran (Iovine et al., 2008). Doch auch mCx23 bildet in der Plasmamembran nicht das für die meisten anderen Connexine typische punktierte Muster, das auf Gap Junction Plaques hinweist (Elfgang et al., 1995). Seine Verteilung erinnert vielmehr an die Lokalisierung von Px1 und Px3 in NRK Zellen, von denen gezeigt werden konnte, dass beide Proteine an den extrazellulären Domänen glykosyliert werden, was ein Docken zu Gap-Junction Kanälen verhindert (Penuela et al., 2007, Boassa et al., 2007). Eine entsprechende Glykosylierungsstelle in Cx23 konnte mithilfe des entsprechenden Algorithmus (NGlyc1.0, Blom et al., 2004) jedoch nicht identifiziert werden.

Wie schon durch die intrazelluläre Verteilung angedeutet, konnte weder mittels Tracer Transfer noch in elektrophysiologischen Analysen eine Cx23 vermittelte Kopplung in transfizierten HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Ob Cx23 in Linsenfasern in der Lage ist funktionelle Gap Junctions zu bilden, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Dabei ist anzumerken, dass in Cx46/Cx50 Doppel-Knock-Out Mäusen keine Gap Junction Plaques mehr gebildet werden (Xia et al., 2006), was gegen eine eigenständige Funktion von Cx23 Kanälen spricht. Sollte Cx23 also eine Rolle in der Gap Junction vermittelten Kopplung spielen, so vermutlich zusammen mit Cx46 oder Cx50.

Viele Connexine und Pannexine wie Cx30, Cx45, Cx46, Cx50 oder Px1 (Dahl und Locovei, 2006; Valiunas und Weingart, 2000; Valiunas, 2002) sind in der Lage funktionale Halbkanäle in *Xenopus* Oozyten oder Säugerzelllinien zu bilden und spielen eine Rolle in parakinen Signalwegen. Die Aktivität der meisten Connexin Halbkanäle ist dabei umgekehrt proportional zur extrazellulären Calciumkonzentration. Eine Ausnahme bilden die Connexine Cx32 (De Vyust et al., 2006), Cx30.2 sowie sein menschliches Ortholog Cx31.9 (Buckauskas et al., 2006) und Halbkanäle von Pannexinen (Dahl und Locovei, 2006). Cx23 exprimierende HeLa Zellen zeigten in dieser Arbeit eine signifikant erhöhte Abgabe von ATP im Vergleich zu HeLa-Wildtyp Zellen, die ebenfalls nicht abhängig von der extrazellulären Calciumkonzentration war (Abb. 4.36). Farbstoffaufnahme konnte dagegen nicht beobachtet werden. Diese Diskrepanz zwischen Farbstoffaufnahme und ATP Abgabe, die z.B. für Cx43 so nicht beobachtet wurde (Kang et al., 2008), könnte mehrere Gründe haben. Zum einen ist die luminometrische Bestimmung der ATP Konzentration im Vergleich zur Bestimmung der Farbstoffaufnahme viel sensitiver. Cx23 Halbkanäle könnten jedoch auch unterschiedlich permeabel für die recht verschiedenen Moleküle ATP und DAPI bzw. Propidiumjodid sein. So hat ATP eine molekulare Masse von 507 und ist vierfach negativ geladen. DAPI und Propidiumjodid haben zwar mit 279 bzw. 415 ein etwas geringeres Molekulargewicht

als ATP, jedoch sind beide zweifach positiv geladen. Ob Cx23 Halbkanäle tatsächlich selektiv permeabel für unterschiedlich geladene Moleküle sind, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Neben der Funktion als Gap Junction Kanal und Halbkanal können Connexine zusätzlich als Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle spielen (Pochnow und Dermietzel, 2008). Da die Entwicklung der Linsenepithelzellen mit Streckung und Verlängerung der Zellen verbunden ist, wäre eine Beteiligung von Cx23 als Adhäsionsmolekül denkbar. Zur Klärung dieses Zusammenhangs könnte eine Cx23-HeLa Zelllinie der in Puk et al. (2008) beschriebenen Mutation beitragen. Diese Mutation liegt in der ersten Transmembrandomäne von Cx23 und hätte somit vermutlich Auswirkungen auf die Permeabilität oder die korrekte Faltung des Proteins, was Rückschlüsse auf die Funktion in der Linse zuließe. Insgesamt weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine Funktion von Cx23 als Calcium unabhängiger Halbkanal in differenzierenden Linsenfaserzellen während der Linsenentwicklung hin. Damit ergibt sich ein erster Hinweis auf die Funktion dieses kleinsten Connexins in der Linse der Maus.

### **5.5 Ausblick**

#### **5.5.1 Die Cx57-DTRfrtCre Mauslinie**

Die Auswirkungen der Ablation Cx57-exprimierender Zellen in der adulten Maus mittels des hier verwendeten Systems aus DT und DT-Rezeptor auf die Retina, den Thymus, aber auch andere Organe konnten in dieser Arbeit noch nicht vollständig geklärt werden. Daher sind Untersuchungen notwendig, die einige der hierbei aufgeworfenen Fragen klären sollten.

##### **5.5.1.1 Die Retina**

Die Ablation der Horizontalzellen, die unter Verwendung der Cx57-DTRfrtCre-Mauslinie erreicht wurde, zeigte in der Analyse der synaptischen Triade von Photorezeptoren, Bipolarzellen und Horizontalzellen eine Unterbrechung des Kontakts zwischen den beiden übrigen Zelltypen (Kap. 4.1.6). Dies hatten auch physiologische Untersuchungen mittels Elektoretinogramm gezeigt. Eine Analyse der Signalverarbeitung ohne den Einfluss der Horizontalzellen in einer ansonsten intakten Retina ist daher nicht möglich. Der Mechanismus, der zum Verlust dieses Kontaktes führt, könnte jedoch Aufschluss über die Abhängigkeit der synaptischen Triade von den Horizontalzellen geben und sollte genauer untersucht werden. Dazu wäre eine Zeitreihe geeignet, in der zu verschiedenen Zeitpunkten während einer z.B. vier- bis siebentägigen Behandlung mit DT die Morphologie der synaptischen Triade betrachtet werden könnte (vergl. Kap. 4.1.6). Die Auswirkungen einer einmaligen intravitrealen Injektion direkt ins Auge der Maus (vergl. Göz et al., 2008) sollten untersucht werden. Dies hätte den Vorteil, dass die

effektiv in der Retina wirkende Dosis zwischen verschiedenen Tieren besser vergleichbar wäre. Zur Bestimmung des genauen Zeitpunktes der Horizontalzell-Apoptose, auf die die anderen an der Triade beteiligten Zellen vermutlich reagieren, wäre eine Untersuchung mittels TUNNEL Assay (Roche, Basel, CH) während verschiedener Zeitpunkte der DT-Behandlung sinnvoll. Wäre der Zeitpunkt der Ablation der Zellen eingegrenzt, könnte zu diesem Zeitpunkt die Auswirkung auf die Physiologie der Photorezeptoren untersucht werden. Dies könnte elektrophysiologisch geschehen, indem z.B. das Membranpotential untersucht wird. Die Unterbrechung des ON-Zapfen oder Stäbchen Signalweges durch Ablation der Horizontalzellen hat auch Auswirkungen auf das Sehen der Mäuse. Daher sollte die Funktion der bildgebenden Lichtwahrnehmung mit einem Verhaltensexperiment untersucht werden. Dazu eignet sich zum Beispiel der sog. visuelle Cliff-Test, bei dem eine Maus von einer erhöhten Position aus auf zwei verschiedene tiefer gelegene Bereiche gelangen kann. Der eine Bereich zeigt ein deutlich sichtbares Muster auf der Oberfläche, während der andere durchscheinend ist und somit die Illusion einer größeren Höhe vermittelt. Die Wahl des Bereiches, auf welchen die Mäuse zuerst heruntersteigen, ließe dann Rückschlüsse auf die Sehfähigkeit der Maus zu (Crawley, 2000). Auf diese Weise könnte geklärt werden ob die Ablation der Horizontalzellen schließlich zum Erblinden der Tiere führt.

### 5.5.1.2 Andere Organe

Die Behandlung von Cx57<sup>DTR/+</sup> Mäusen mit 100 ng DT täglich über eine Woche hatte entgegen aller Erwartungen auch Auswirkungen auf andere Organe. Es war eine Veränderung der Leber zu erkennen, welche histologisch untersucht werden sollte. So könnten Veränderungen in der Morphologie der Leber nach DT-Behandlung anhand von Paraffinschnitten aufgezeigt werden, um Rückschlüsse auf die DT-Wirkung zuzulassen. Um die Ursache der Veränderung zu bestimmen, sollte zunächst geklärt werden, ob der DT-Rezeptor in der Leber exprimiert wird. Dazu wäre eine erneute Analyse der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der Cx57-lacZ Maus nötig. Eine Expression in einer Cx57-Cre Reportermauslinie könnte Anhaltspunkte für eine Expression in der Entwicklung der Leber geben. Die Expression des DT-Rezeptors sowie von Cx57 in der Leber könnte durch RT-PCR-Analysen gezeigt werden. Ein direkter Nachweis des Rezeptors wird vermutlich ebenso wie in der Retina problematisch, sollte jedoch dennoch mithilfe von eGFP-spezifischen Antikörpern versucht werden. Auch eine Analyse verschiedener leberspezifischer Blutwerte (z.B. Aspartat-Aminotransferase AST, Alanin-Aminotransferase ALT oder  $\gamma$ -Glutamyltransferase GGT) könnte Aufschluss über eine Fehlfunktion der Leber geben (Conigrave et al., 2003). Zuletzt kann auch die Auswirkung des DT auf eine Kultur von Hepatozyten (vergl. Dissertation H. Nießen, 1999) direkt untersucht werden. Über den Vergleich zwischen Wildtyp- und Cx57<sup>DTR/+</sup> Hepatozyten könnte eine mögliche direkte Wirkung auf die Leber nachgewiesen werden.

Neben der Leber war vor allem der Thymus von DT-behandelten Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren betroffen. Die Veränderung im Thymus könnte einen Sekundäreffekt der DT-Behandlung darstellen, ausgelöst z.B. durch eine erhöhte Ausschüttung von Glukokortikoiden. Zum Nachweis dieses Zusammenhangs könnte eine Analyse der Konzentration verschiedener Hormone (z.B. Corticosteron) und Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$ , LIF, IL-6) im Blut von DT-behandelten Cx57<sup>DTR/+</sup> Tieren beitragen. Cx57 ist sowohl in der adulten Maus, als auch während der Embryonalentwicklung im Thymus nachzuweisen (Dissertation S. Hombach, 2004). Eine immunhistologische Färbung gegen verschiedene Oberflächenantigene von Thymozyten (Thy-1), Makrophagen (F4/80), dendritischen Zellen (CD11c) oder Thymusepithelzellen (z.B. Keratin-5) zusammen mit einer lacZ-Färbung an Gewebe aus der Cx57-lacZ Mauslinie wäre hilfreich den genauen Cx57-positiven Zelltyp eingrenzen. Auch eine Kombination mit verschiedenen Cx57-Cre Reportermauslinien (ROSA26-STOPfloxlacZ oder ROSA26-STOPfloxYFP) könnte Aufschluss über den betroffenen Zelltyp geben. Im Fall der Cx57-Cre ROSA26-STOPfloxYFP Mauslinie (Srinivas et al., 2001) ist die Fluoreszenz des Reportergens direkt nachweisbar, so dass anhand von FACS-Analysen in Kombination mit verschiedenen Oberflächenantigenen der Zelltyp identifiziert werden kann.

### 5.5.2 Die Cx57-Cre Mauslinie

Die Erzeugung der Cx57-Cre Mauslinie aus der Cx57-DTRfrcCre Mauslinie im Rahmen dieser Arbeit war erfolgreich. Die Aktivität der Cre-Rekombinase wurde in Horizontalzellen über eine ROSA26-STOPfloxYFP Reportermauslinie nachgewiesen, eine Analyse der Aktivität in anderen Zelltypen der Retina oder in anderen Geweben steht jedoch noch aus. So sollte zunächst sowohl unter Verwendung der ROSA26-STOPfloxYFP (Srinivas et al., 2001) als auch der ROSA26-STOPfloxlacZ (Soriano, 1999) Reportermauslinien die Aktivität der Cre-Rekombinase im Thymus und in der Niere gezeigt werden. Zusätzlich sollte sie in allen weiteren Organen ausgeschlossen werden. Ein Vergleich mit der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in der Cx57lacZ Mauslinie könnte Cre-Expression im Laufe der Mausentwicklung aufzeigen.

Die Expression des eYFP Proteins unter dem ROSA26 Promotor war nach Cx57-Cre induzierter Rekombination stark genug, um die Fluoreszenz des Proteins direkt nachweisen zu können. Diese könnte für eine Isolierung der Horizontalzellen aus einer dissoziierten Retina (Feigenspan et al., 2001) ausreichen. Somit könnten, falls die Expression der Cx57-Cre Rekombinase in der Retina spezifisch ist, die Horizontalzellen angereichert und ihr Transkriptom oder Proteom untersucht werden. Dies bietet die Möglichkeit, eine cDNA-Bibliothek (vergl. Sim et al., 1979) aus mRNA der Horizontalzellen zu synthetisieren, anhand derer sich die Expression bisher unbekannter Proteine identifizieren lässt. Auch die bisher nur vermutete Expression bestimmter Rezeptoren oder Ionenkanäle könnte so aufgeklärt werden. Bereits bekannte in Horizontalzellen exprimierte Proteine könnten so genauer untersucht werden, deren

Expressionsniveau in Lysaten der gesamten Retina für bisherige Analysen nicht ausreichte. Connexin57 wäre ein solches Protein. Mithilfe neuer Cx57-spezifischer Antikörper (anti-Cx53.8 U. Janssen-Bienhold, unveröffentlicht) könnte so z.B. die Phosphorylierung von Cx57 in Horizontalzellen untersucht werden. Eine Einschränkung für die Untersuchung von bestimmten Proteinen in Horizontalzellen stellt bislang die Prozedur der Retinadissoziation dar. Die Dissoziation führt teilweise zu einem mechanischen Verlust der dendritischen und axonalen Fortsätze der Zellen. Mithilfe Cx57 spezifischer Antikörper konnte jedoch auch an dissoziierten Horizontalzellen eine Cx57-spezifische Färbung erreicht werden (Janssen-Bienhold et al., eingereicht), was auf den Erhalt wenigstens eines Teils des Cx57-Proteins hindeutet. So könnte eine ausreichende Menge von Cx57 zur Untersuchung erhalten bleiben.

Die Aktivität der Cre-Rekombinase unter dem Promotor von Cx57 soll für den Fall, dass diese die gewünschte Spezifität in der Retina aufweist, zur Zelltyp-spezifischen Deletion verschiedener Gene in Horizontalzellen genutzt werden. Dies ermöglicht beispielsweise die Untersuchung des Einflusses der Glutamatrezeptoren auf die Depolarisierung der Horizontalzellen (Hack et al., 2001; Schultz et al., 2001). Entsprechende konditionale Knock-Out Mauslinien sind vorhanden (GluRA-GluRD: Zamanillo et al, 1999; Shimshek et al, 2006; Sanchis-Segura et al, 2006; Fuchs et al., 2007). Horizontalzellen exprimieren mehrere Typen von GABA-Rezeptoren (Feigenspan und Weiler, 2004), deren Bedeutung bisher nicht geklärt ist. Ein Ausschalten eines dieser Rezeptoren in Horizontalzellen mithilfe gefloxter konditionaler Mausmutanten (Vicini et al, 2001; Wulff et al., 2007) über die Cx57-Cre Mauslinie könnte so Aufschluss über die Bedeutung der GABA-vermittelten Signale für Horizontalzellen geben. Eine wichtige Einschränkung bei der Untersuchung solcher Effekte stellt jedoch die Cx57-Cre Mauslinie selbst dar. So ist das Transgen für die Cre-Rekombinase in dieser Maus über homologe Rekombination in den Cx57-Lokus eingebracht worden. Da jedoch bereits der Knock-Out von Cx57 im heterozygoten Zustand Auswirkungen auf das Membranpotential dieser Zellen hat (Shelley et al., 2006) muss dieser Umstand auch für die Cx57-Cre Mauslinie mit beachtet werden, da sie einen heterozygoten Knock-Out von Cx57 darstellt. Dennoch kann eine spezifische Expression der Cre-Rekombinase in Horizontalzellen der Retina ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung dieser Zellen darstellen.

### 5.5.3 Connexin57

Die Kanaleigenschaften von Connexin57 wurden anhand der in dieser Arbeit erzeugten Cx57eGFP HeLa-Zelllinie bereits größtenteils bestimmt. Die Veränderung der Kopplung über den intrazellulären pH-Wert wirft dabei die Frage nach dem Mechanismus auf, über den diese Regulation geschieht. Für Cx43 gibt es Hinweise auf eine Beteiligung bestimmter Histidin-Reste in der zytoplasmatischen Schleife und dem C-Terminus an der pH-abhängigen Regulation. Eine Möglichkeit, diese Hypothese für Connexin57 zu analysieren, wäre die Erzeugung von Punktmutanten oder Deletionsmutanten von Cx57,

in denen die entsprechenden Aminosäurereste gegen durch Protonen unveränderliche Reste ausgetauscht oder entfernt würden. Ein Einfluss auf die pH-Regulation in einer entsprechenden HeLa-Zelllinie könnte dann Rückschlüsse auf die beteiligten Domänen geben. Des Weiteren sollte die Regulierung der Cx57-vermittelten Kopplung durch verschiedene Proteinkinasen genauer untersucht werden. Dazu eignet sich die in dieser Arbeit erzeugte Cx57eGFP HeLa-Zelllinie, da sich die Kanaleigenschaften von Cx57eGFP und Cx57IRESeGFP exprimierenden Zellpaaren nicht unterscheiden (Prof. F. Bukauskas, persönliche Mitteilung). Für die Interaktion mit verschiedenen Kinasen könnte ein C-terminal angehängtes eGFP jedoch stören. Da die Erzeugung einer Cx57IRESeGFP Zelllinie in mehreren Versuchen nicht erfolgreich war, wurde in dieser Arbeit bereits ein Vektor hergestellt, mit dessen Hilfe die Expression von Cx57 bzw. eGFP einzeln unter einem bidirektionalen, Tetrazyklin-induzierbaren Promotor in eukaryotischen Zellen möglich ist (nicht gezeigt). Dieser könnte die Herstellung einer stabilen Cx57-Zelllinie ohne C-terminale eGFP Markierung vereinfachen, anhand derer sich dann der Einfluss verschiedener Kinasen auf die Cx57-vermittelte Kopplung bestimmen ließe.

### 5.5.4 CaMKII

Nach der Untersuchung der Interaktion und Phosphorylierung von Cx36 und CaMKII *in vitro*, schließt sich die Frage an, welche physiologische Bedeutung diese für die Cx36 vermittelte Kopplung in der Retina oder in verschiedenen Regionen des Gehirns hat. Dazu müsste die Auswirkung der CaMKII-Aktivierung auf die Phosphorylierung und die Kopplung *in vivo* untersucht werden. Da eine Induktion durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels Ionomycin möglicherweise auch andere Kinasen aktiviert, stellt die Verwendung einer ständig aktiven Form des Enzyms CaMKII-T286D (vergl. Shen und Meyer, 1999) in Zellkultur eine Alternative dar. Zur Untersuchung der Auswirkung einer Phosphorylierung auf Cx36 wäre auch ein analoger Austausch von Serin-315 in Cx36 gegen Aspartat interessant, wobei zusätzlich die Regulierung durch die PKA verändert sein könnte (vergl. Ouyang et al., 2005).

### 5.5.5 Connexin23

Die Bedeutung von Connexin23 konnte weder im Zebrafisch (Iovine et al., 2008), noch in einer Maus mit einer Cx23 Punktmutation (Puk et al., 2008) noch in dieser Arbeit endgültig geklärt werden. Eine Funktion als eigenständiger Gap Junction Kanal ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit eher unwahrscheinlich. Daher sollte der Frage nachgegangen werden, ob Cx23 zusammen mit Cx46 oder Cx50 Gap Junction Kanäle bildet, deren Eigenschaften sich von reinen Cx46 oder Cx50 Kanälen unterscheiden. Dies wäre in einer stabilen HeLa-Zelllinie möglich, welche eines der Connexine jeweils in Kombination mit Cx23 exprimiert. Den Hinweisen auf eine Halbkanalfunktion von Cx23

sollte ebenfalls nachgegangen werden, z.B. in *Xenopus* Oozyten (vergl. Srinivas et al., 2005). Die Mutation von Cx23 R32Q (Puk et al., 2008) führt vermutlich zum Verlust der Cx23 Funktion. Die Herstellung einer Cx23 exprimierenden Zelllinie mit der R32Q Mutation könnte helfen, diese Funktion aufzuklären, wie mit verschiedenen Mutationen in anderen Connexinen bereits erfolgt (vergl. Cx43 Dobrowolski et al., 2007). Die Expression von Cx23 in der Linse wurde in drei Arbeiten unabhängig voneinander in der Linse gezeigt. Dies schließt jedoch nicht aus, dass dieses Connexin auch in anderen Geweben schwach exprimiert wird. Zur Aufklärung des Expressionsmusters von Cx23 wäre daher eine Reportermauslinie hilfreich, bei der z.B. Exon 1 oder Exon 3 durch die kodierende Region der  $\beta$ -Galaktosidase ersetzt sind. Der Vergleich der Auswirkungen einer solchen Cx23 Gen-Inaktivierung mit der Cx23R32Q Mausmutante könnte weitere Einblicke in die Funktion dieses Connexins geben.

## 6. Zusammenfassung

Connexin57 (Gja10) unterscheidet sich in mehrerer Hinsicht von anderen Connexin-Genen. Seine Expression ist in der adulten Maus auf Horizontalzellen der Retina sowie einige wenige Zellen eines unbekanntem Zelltyps im Thymus begrenzt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Cx57-Promotor zur Erzeugung zweier Mausmutanten verwendet, die eine genauere Untersuchung der Funktion von Horizontalzellen der Retina ermöglichen sollten.

Zum einen wurde die Expression der humanen Form des Diphtherie Toxin-Rezeptors (DTR) unter dem Cx57-Promotor dazu genutzt, in der adulten Maus gezielt Horizontalzellen für das Toxin des *Corynebakterium diphtheriae* zu sensibilisieren, demgegenüber Mäuse ansonsten unempfindlich sind. Durch Behandlung mit unterschiedlichen Dosen Diphtherie Toxin (DT) wurde die vollständige und spezifische Ablation der Horizontalzellen in der Retina erreicht. Diese führte zum Verlust des Kontaktes zwischen Photorezeptor- und Bipolarzellen in der sog. synaptischen Triade, an der auch die Horizontalzellen normalerweise beteiligt sind und für deren Erhalt sie aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Darüber hinaus wurden auch Effekte der DT-Behandlung auf andere Organe beobachtet. So führt die Ablation Cx57 exprimierender Zellen in der Cx57-DTRfrtCre Mauslinie teilweise zum Verlust eines großen Teils der CD4 und CD8 doppelt positiven, sich entwickelnden Thymozyten und einer etwa 90 %igen Reduktion der Größe des Thymus. Zusätzlich hatte DT Auswirkungen auf die Leber, was auf eine bisher nicht gezeigte Expression von Cx57 bzw. des DTR in diesem Organ hindeutet.

Als zweites Werkzeug wurde über FLP-vermittelte Rekombination in Cx57-DTRfrtCre Tieren die Cx57-Cre Mauslinie erzeugt, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Cx57-Promotors exprimiert. Die Funktionalität der Cre-Rekombinase konnte in Horizontalzellen der Retina mithilfe einer ROSA26-STOPfloxYFP Reportermauslinie gezeigt werden. Auf diese Weise ist mit der hier erzeugten Cx57-Cre Mauslinie die Cre-vermittelte Deletion gefloxter Gene in Horizontalzellen möglich.

Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Arbeit physiologische Besonderheiten von Cx57-Kanälen anhand stabil transfizierter HeLa-Zellen identifiziert. Dabei wurde eine Öffnung der Cx57 Kanäle oberhalb eines pH-Wertes von etwa 7,4 und eine Regulierung in einem Bereich von 0,1-0,2 pH-Einheiten gefunden. Der zur Öffnung notwendige und im Vergleich zu anderen Connexine hohe pH-Wert stellt vermutlich eine Anpassung an den intrazellulären pH-Wert der Horizontalzellen dar. Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes um 0,1-0,2 pH-Einheiten könnten zur lichtabhängigen Regulation der Cx57-vermittelten Kopplung zwischen Horizontalzellen der Retina dienen. Zusätzlich wurde eine Aktivierung von Cx57-Halbkanälen in HeLa-Zellen bei niedrigen Calciumkonzentrationen und entsprechendem intrazellulärem pH-Wert festgestellt.

Des Weiteren wurde in *in vitro* Binde- und Phosphorylierungsexperimenten die Interaktion zwischen dem häufigsten neuronalen Connexin der Maus, Connexin36



(Cx36), und der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängiger Kinase (CaMKII) untersucht. Es wurde eine Interaktion der Kinase mit beiden zytoplasmatischen Bereichen von Cx36 gezeigt, welche Gemeinsamkeiten mit der Interaktion der CaMKII und mit dem N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor aufweist. Dies deutet auf einen ähnlichen Mechanismus bei der Regulation von elektrischen und chemischen Synapsen hin.

Schließlich wurde die Expression und Funktion eines weiteren, in der Linse der Maus exprimierten Connexins, Connexin23 (Cx23), untersucht. Anhand von stabil Cx23-exprimierenden HeLa-Zelllinien wurde gezeigt, dass dieses Connexin der Maus keine funktionellen Gap Junction-Kanäle bildet, sondern statt dessen zur Bildung von Calcium-unabhängigen Halbkanälen in der Lage ist, über die ATP abgegeben werden kann. Dies weist auf eine ähnliche Funktion des Cx23 Proteins hin wie bereits für Pannexine beschrieben, mit denen Cx23 auch bestimmte extrazelluläre Cystein-Reste gemeinsam hat.

## 7. Literaturverzeichnis

- Addison PK, Berry V, Holden KR, Espinal D, Rivera B, Su H, Srivastava AK, Bhattacharya SS.** (2006) A novel mutation in the connexin 46 gene (GJA3) causes autosomal dominant zonular pulverulent cataract in a Hispanic family. *Mol Vis.* 12:791-5.
- Alexopoulos H, Böttger A, Fischer S, Levin A, Wolf A, Fujisawa T, Hayakawa S, Gojobori T, Davies JA, David CN, Bacon JP.** (2004) Evolution of gap junctions: the missing link? *Curr Biol.* 14(20):R879-80.
- Attal J, Théron MC, Houdebine LM.** (1999) The optimal use of IRES (internal ribosome entry site) in expression vectors. *Genet Anal.* 15(3-5):161-5.
- Ausubel FM, Brent A; Kingston RE, Moore DD, Seidman JA, Struhl K.** (1989) Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons. New York
- Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S, Panchin Y.** (2004) The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics.* 83(4):706-16.
- Barria A, Derkach V, Soderling T.** (1997) Identification of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *J Biol Chem.* 272(52):32727-30.
- Baruch A, Greenbaum D, Levy ET, Nielsen PA, Gilula NB, Kumar NM, Bogoy M.** (2001) Defining a link between gap junction communication, proteolysis, and cataract formation. *J Biol Chem.* 276(31):28999-9006.
- Bassnett S.** (2002) Lens organelle degradation. *Exp Eye Res.* 74(1):1-6.
- Bauer R, Lörer B, Ostrowski K, Martini J, Weimbs A, Lechner H, Hoch M.** (2005) Intercellular communication: the Drosophila innexin multiprotein family of gap junction proteins. *Chem Biol.* 12(5):515-26.
- Bayer KU, De Koninck P, Leonard AS, Hell JW, Schulman H.** (2001) Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature.* 411(6839):801-5.
- Beardslee MA, Laing JG, Beyer EC, Saffitz JE.** (1998) Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res.* 83(6):629-35.
- Bedner P, Niessen H, Odermatt B, Kretz M, Willecke K, Harz H.** (2006) Selective permeability of different connexin channels to the second messenger cyclic AMP. *J Biol Chem.* 281(10):6673-81.
- 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(4):569-76.
- Benninghoff A.** (2002) Anatomie; makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore.
- Bevans CG, Kordel M, Rhee SK, Harris AL.** (1998) Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J Biol Chem.* 273(5):2808-16.
- Beyer EC, Kistler J, Paul DL, Goodenough DA.** (1989) Antisera directed against connexin43 peptides react with a 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium and other tissues. *J Cell Biol.* 108(2):595-605.
- 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(6 Pt 1):2621-9.
- Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S.** (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics.* 4(6):1633-49.
- Boassa D, Qiu F, Dahl G, Sosinsky G.** (2007) Trafficking dynamics of glycosylated pannexin 1 proteins. *Cell Commun Adhes.* 15(1):119-32.

- Branda CS, Dymecki SM.** (2004) Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell.* 6(1):7-28.
- Breitman ML, Clapoff S, Rossant J, Tsui LC, Glode LM, Maxwell IH, Bernstein A.** (1987) Genetic ablation: targeted expression of a toxin gene causes microphthalmia in transgenic mice. *Science.* 238(4833):1563-5.
- Brownell I, Dirksen M, Jamrich M.** (2000) Forkhead Foxe3 maps to the dysgenetic lens locus and is critical in lens development and differentiation. *Genesis.* 27(2):81-93.
- 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(23):13644-9.
- 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(6):419-26.
- Bukauskas FF, Jordan K, Bukauskiene A, Bennett MV, Lampe PD, Laird DW, Verselis VK.** (2000) Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(6):2556-61.
- Bukauskas FF, Kreuzberg MM, Rackauskas M, Bukauskiene A, Bennett MV, Verselis VK, Willecke K.** (2006) Properties of mouse connexin 30.2 and human connexin 31.9 hemichannels: implications for atrioventricular conduction in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(25):9726-31.
- Bullock W. O., Fernandez J. M., Short J. M.** (1987) XL-1 Blue : a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with b-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376±378.
- Burns ME, Arshavsky VY.** (2005) Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction. *Neuron.* 48(3):387-401.
- Capecchi MR.** (1989) The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 5(3):70-6.
- Chang B, Wang X, Hawes NL, Ojakian R, Davisson MT, Lo WK, Gong X.** (2002) A Gja8 (Cx50) point mutation causes an alteration of alpha 3 connexin (Cx46) in semi-dominant cataracts of Lop10 mice. *Hum Mol Genet.* 11(5):507-13.
- Chang M, Werner R, Dahl G.** (1996) A role for an inhibitory connexin in testis? *Dev Biol.* 175(1):50-6.
- Ciolofan C, Lynn BD, Wellershaus K, Willecke K, Nagy JI.** (2007) Spatial relationships of connexin36, connexin57 and zonula occludens-1 in the outer plexiform layer of mouse retina. *Neuroscience.* 148(2):473-88.
- Conigrave KM, Davies P, Haber P, Whitfield JB.** (2003) Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction.* 98 Suppl 2:31-43.
- Contreras JE, Sáez JC, Bukauskas FF, Bennett MV.** (2003) Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(20):11388-93.
- Crawley JN.** (2000) Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. In: Crawley JN, ed (2000) *What is wrong with my mouse?* 1 ed. New York: Wiley-Liss. pp 65–81.
- Cruciani V, Mikalsen SO.** (2007) Evolutionary selection pressure and family relationships among connexin genes. *Biol Chem.* 388(3):253-64.
- Dahl G, Locovei S.** (2006) Pannexin: to gap or not to gap, is that a question? *IUBMB Life.* 58(7):409-19.
- Dang X, Doble BW, Kardami E.** (2003) The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol Cell Biochem.* 242(1-2):35-8.
- Davenport CM, Detwiler PB, Dacey DM.** (2008) Effects of pH buffering on horizontal and ganglion cell light responses in primate retina: evidence for the proton hypothesis of surround formation. *J Neurosci.* 28(2):456-64.
- 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(1):34-44. Epub 2005 Dec 8.

- Deans MR, Paul DL.** (2001) Mouse horizontal cells do not express connexin26 or connexin36. *Cell Commun Adhes.* 8(4-6):361-6.
- Dedek K, Pandarinath C, Alam NM, Wellershaus K, Schubert T, Willecke K, Prusky GT, Weiler R, Nirenberg S.** (2007) Ganglion cell adaptability: does the coupling of horizontal cells play a role? *PLoS ONE.* 3(3):e1714.
- Degen J, Meier C, Van Der Giessen RS, Söhl 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(4):511-25.
- Delaye M, Tardieu A.** (1983) Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. *Nature.* 302(5907):415-7.
- Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L.** (2001) Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol.* 2(11):1032-9.
- Derkach V, Barria A, Soderling TR.** (1999) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(6):3269-74.
- Dhingra A, Lyubarsky A, Jiang M, Pugh EN Jr, Birnbaumer L, Sterling P, Vardi N.** (2001) The light response of ON bipolar neurons requires G<sub>α</sub>o. *J Neurosci.* 20(24):9053-8.
- Dixon DB, Takahashi K, Bieda M, Copenhagen DR.** (1996) Quinine, intracellular pH and modulation of hemi-gap junctions in catfish horizontal cells. *Vision Res.* 36(24):3925-31.
- Dobrowolski R, Sommershof A, Willecke K.** (2007) Some oculodentodigital dysplasia-associated Cx43 mutations cause increased hemichannel activity in addition to deficient gap junction channels. *J Membr Biol.* 219(1-3):9-17.
- Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O.** (1987) Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature.* 330(6148):576-8.
- Dosemeci A, Tao-Cheng JH, Vinade L, Winters CA, Pozzo-Miller L, Reese TS.** (2001) Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(18):10428-32.
- Duffy HS, Ashton AW, O'Donnell P, Coombs W, Taffet SM, Delmar M, Spray DC.** (2004) Regulation of connexin43 protein complexes by intracellular acidification. *Circ Res.* 94(2):215-22.
- Duffy HS, Sorgen PL, Girvin ME, O'Donnell P, Coombs W, Taffet SM, Delmar M, Spray DC.** (2002) pH-dependent intramolecular binding and structure involving Cx43 cytoplasmic domains. *J Biol Chem.* 277(39):36706-14.
- Dupont E, el Aoumari A, Roustiau-Sévère S, Briand JP, Gros D.** (1988) Immunological characterization of rat cardiac gap junctions: presence of common antigenic determinants in heart of other vertebrate species and in various organs. *J Membr Biol.* 104(2):119-28.
- Dymecki SM.** (1996) A modular set of Flp, FRT and lacZ fusion vectors for manipulating genes by site-specific recombination. *Gene.* 171(2):197-201.
- Ek-Vitorín JF, Calero G, Morley GE, Coombs W, Taffet SM, Delmar M.** (1996) PH regulation of connexin43: molecular analysis of the gating particle. *Biophys J.* 71(3):1273-84.
- Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Fraté H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hülser DF, Willecke K.** (1995) Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol.* 129(3):805-17.
- Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L.** (2006) The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J.* 397(1):1-14.
- Fahrenfort I, Sjoerdsma T, Ripps H, Kamermans M.** (2004) Cobalt ions inhibit negative feedback in the outer retina by blocking hemichannels on horizontal cells. *Vis Neurosci.* 21(4):501-11.
- Falk MM, Gilula NB.** (1998) Connexin membrane protein biosynthesis is influenced by polypeptide positioning within the translocon and signal peptidase access. *J Biol Chem.* 273(14):7856-64.

- Feigenspan A, Janssen-Bienhold U, Hormuzdi S, Monyer H, Degen J, Söhl G, Willecke K, Ammermüller J, Weiler R.** (2004) Expression of connexin36 in cone pedicles and OFF-cone bipolar cells of the mouse retina. *J Neurosci.* 24(13):3325-34.
- Feigenspan A, Teubner B, Willecke K, Weiler R.** (2001) Expression of neuronal connexin36 in All amacrine cells of the mammalian retina. *J Neurosci.* 21(1):230-9.
- Feigenspan A, Weiler R.** (2004) Electrophysiological properties of mouse horizontal cell GABAA receptors. *J Neurophysiol.* 92(5):2789-801
- Fleishman SJ, Unger VM, Yeager M, Ben-Tal N.** (2004) A Calpha model for the transmembrane alpha helices of gap junction intercellular channels. *Mol Cell.* 15(6):879-88.
- 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(5):1187-97.
- Francis D, Stergiopoulos K, Ek-Vitorin JF, Cao FL, Taffet SM, Delmar M.** (1999) Connexin diversity and gap junction regulation by pHi. *Dev Genet.* 24(1-2):123-36.
- Fuchs EC, Zivkovic AR, Cunningham MO, Middleton S, Lebeau FE, Bannerman DM, Rozov A, Whittington MA, Traub RD, Rawlins JN, Monyer H.** (2007) Recruitment of parvalbumin-positive interneurons determines hippocampal function and associated behavior. *Neuron.* 53(4):591-604.
- Gäbler J, Arnold J, Kyewski B.** (2007) Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells. *Eur J Immunol.* 37(12):3363-72.
- Gao J, Sun X, Martinez-Wittinghan FJ, Gong X, White TW, Mathias RT.** (2004) Connections between connexins, calcium, and cataracts in the lens. *J Gen Physiol.* 124(4):289-300.
- Gemel J, Lin X, Veenstra RD, Beyer EC.** (2006) N-terminal residues in Cx43 and Cx40 determine physiological properties of gap junction channels, but do not influence heteromeric assembly with each other or with Cx26. *J Cell Sci.* 119(Pt 11):2258-68.
- Gerido DA, DeRosa AM, Richard G, White TW.** (2007) Aberrant hemichannel properties of Cx26 mutations causing skin disease and deafness. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293(1):C337-45.
- 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(16):931-4.
- Giepmans BN, Verlaan I, Moolenaar WH.** (2001) Connexin-43 interactions with ZO-1 and alpha- and beta-tubulin. *Cell Commun Adhes.* 8(4-6):219-23.
- Gilula NB, Reeves OR, Steinbach A.** (1972) Metabolic coupling, ionic coupling and cell contacts. *Nature.* 235(5336):262-5.
- Goldberg GS, Lampe PD, Nicholson BJ.** (1999) Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nat Cell Biol.* 1(7):457-9.
- Goldberg GS, Moreno AP, Lampe PD.** (2002) Gap junctions between cells expressing connexin 43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP *J Biol Chem.* 277(39):36725-30. Epub 2002 Jul 15.
- Goldberg GS, Valiunas V, Brink PR.** (2004) Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta.* 1662(1-2):96-101.
- Gong X, Cheng C, Xia CH.** (2007) Connexins in lens development and cataractogenesis. *J Membr Biol.* 218(1-3):9-12.
- Gong X, Li E, Klier G, Huang Q, Wu Y, Lei H, Kumar NM, Horwitz J, Gilula NB.** (1997) Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice. *Cell.* 91(6):833-43.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH.** (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(12):7380-4.
- Göz D, Studholme K, Lappi DA, Rollag MD, Provencio I, Morin LP.** (2008) Targeted destruction of photosensitive retinal ganglion cells with a saporin conjugate alters the effects of light on mouse circadian rhythms. *PLoS ONE.* 3(9):e3153.
- Gruver AL, Sempowski GD.** (2008) Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. *J Leukoc Biol.* [Epub ahead of print]

- Güldenagel M, Söhl G, Plum A, Traub O, Teubner B, Weiler R, Willecke K.** (2000) Expression patterns of connexin genes in mouse retina. *J Comp Neurol.* 425(2):193-201.
- Gustincich,S., Batalov,S., Beisel,K.W., Bono,H., Carninci,P., Fletcher,C.F., Grimmond,S., Hirokawa,N., Jarvis,E.D., Jegla,T., Kawasaki,Y., LeMieux,J., Miki,H., Raviola,E., Teasdale,R.D., Tominaga,N., Yagi,K., Zimmer,A., Hayashizaki,Y., and Okazaki,Y.** (2003). Analysis of the mouse transcriptome for genes involved in the function of the nervous system. *Genome Res.* 13, 1395-1401.
- Hack I, Frech M, Dick O, Peichl L, Brandstätter JH.** (2001) Heterogeneous distribution of AMPA glutamate receptor subunits at the photoreceptor synapses of rodent retina. *Eur J Neurosci.* 13(1):15-24.
- 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(6):1197-209.
- Hampson EC, Weiler R, Vaney DI.** (1994) pH-gated dopaminergic modulation of horizontal cell gap junctions in mammalian retina. *Proc Biol Sci.* 255(1342):67-72.
- Hansen L, Yao W, Eiberg H, Funding M, Riise R, Kjaer KW, Hejtmancik JF, Rosenberg T.** (2006) The congenital "ant-egg" cataract phenotype is caused by a missense mutation in connexin46. *Mol Vis.* 12:1033-9.
- Hanson PI, Meyer T, Stryer L, Schulman H.** (1994) Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. *Neuron.* 12(5):943-56.
- Hargrave PA, McDowell JH, Feldmann RJ, Atkinson PH, Rao JK, Argos P.** (1984) Rhodopsin's protein and carbohydrate structure: selected aspects. *Vision Res.* 24(11):1487-99.
- Hargrave PA, McDowell JH.** (1992) Rhodopsin and phototransduction. *Int Rev Cytol.* 137B:49-97.
- Harris AL, Spray DC, Bennett MV.** (1981) Kinetic properties of a voltage-dependent junctional conductance. *J Gen Physiol.* 77(1):95-117.
- Hatori M, Le H, Vollmers C, Keding SR, Tanaka N, Schmedt C, Jegla T, Panda S.** (2008) Inducible ablation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells reveals their central role in non-image forming visual responses. *PLoS ONE.* 3(6):e2451.
- Haugh-Scheidt L, Ripps H.** (1998) pH regulation in horizontal cells of the skate retina. *Exp Eye Res.* 66(4):449-63.
- Haverkamp S, Wässle H.** (2000) Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol.* 424(1):1-23.
- He LQ, Cai F, Liu Y, Liu MJ, Tan ZP, Pan Q, Fang FY, Liang de S, Wu LQ, Long ZG, Dai HP, Xia K, Xia JH, Zhang ZH.** (2005) Cx31 is assembled and trafficked to cell surface by ER-Golgi pathway and degraded by proteasomal or lysosomal pathways. *Cell Res.* 15(6):455-64.
- He S, Weiler R, Vaney DI.** (2000) Endogenous dopaminergic regulation of horizontal cell coupling in the mammalian retina. *J Comp Neurol.* 418(1):33-40.
- Hecht S, Schlaer S, Henri Pirenne MH.** (1942) Engery, Quanta and Vision. *The Journal of General Physiology*, Vol 25, 819-840,
- Heinlein M.** (2002) Plasmodesmata: dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling. *Curr Opin Plant Biol.* 5(6):543-52.
- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH.** (1997) Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques.* 23(3):504-11.
- Hirasawa H, Kaneko A.** (2003) pH changes in the invaginating synaptic cleft mediate feedback from horizontal cells to cone photoreceptors by modulating Ca<sup>2+</sup> channels. *J Gen Physiol.* 122(6):657-71.
- Hombach S, Janssen-Bienhold U, Söhl G, Schubert T, Büssow H, Ott T, Weiler R, Willecke K.** (2004) Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *Eur J Neurosci.* 19(10):2633-40.
- Hombach S.** (2004) Erzeugung Charakterisierung von Knock-In Reporter-Mäusen des Connexin57 und Versuche zur Herstellung spezifischer Antikörper. Dissertation Institut für Genetik, Universität Bonn.

- 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(1):27-32.
- Hsieh CL, Kumar NM, Gilula NB, Francke U.** (1991) Distribution of genes for gap junction membrane channel proteins on human and mouse chromosomes. *Somat Cell Mol Genet.* 17(2):191-200.
- Huang XD, Horackova M, Pressler ML.** (1996) Changes in the expression and distribution of connexin 43 in isolated cultured adult guinea pig cardiomyocytes. *Exp Cell Res.* 228(2):254-61.
- Hubel DH, Wiesel TN.** (1960) Receptive fields of optic nerve fibres in the spider monkey. *J Physiol.* 154:572-80.
- Hudmon A, Schulman H.** (2002) Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J.* 364(Pt 3):593-611.
- Human genome organization (HUGO) Gene Nomenclature Committee**  
<http://www.genenames.org/genefamily/gj.php>
- Ichinose T, Lukasiewicz PD.** (2005) Inner and outer retinal pathways both contribute to surround inhibition of salamander ganglion cells. *J Physiol.* 565(Pt 2):517-35.
- Iida Y, Masuda T.** (1996) Strength of translation initiation signal sequence of mRNA as studied by quantification method: effect of nucleotide substitutions upon translation efficiency in rat preproinsulin mRNA. *Nucleic Acids Res.* 24(17):3313-6.
- Iovine MK, Gumpert AM, Falk MM, Mendelson TC.** (2008) Cx23, a connexin with only four extracellular-loop cysteines, forms functional gap junction channels and hemichannels. *FEBS Lett.* 582(2):165-70.
- Janssen-Bienhold U, Schultz K, Gellhaus A, Schmidt P, Ammermüller J, Weiler R.** (2001) Identification and localization of connexin26 within the photoreceptor-horizontal cell synaptic complex. *Vis Neurosci.* 18(2):169-78.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH.** (1998) The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci.* 18(21):8936-46.
- Jones CE, Atchison DA, Meder R, Pope JM.** (2005) Refractive index distribution and optical properties of the isolated human lens measured using magnetic resonance imaging (MRI). *Vision Res.* 2005 45(18):2352-66.
- 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(6):945-9.
- Jongen WM, Fitzgerald DJ, Asamoto M, Piccoli C, Slaga TJ, Gros D, Takeichi M, Yamasaki H.** (1991) Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca<sup>2+</sup> in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J Cell Biol.* 114(3):545-55.
- Jouhou H, Yamamoto K, Homma A, Hara M, Kaneko A, Yamada M.** (2007) Depolarization of isolated horizontal cells of fish acidifies their immediate surrounding by activating V-ATPase. *J Physiol.* 585(Pt 2):401-12.
- Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, 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(2):211-20.
- Kamermans M, Fahrenfort I, Schultz K, Janssen-Bienhold U, Sjoerdsma T, Weiler R.** (2001) Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science.* 292(5519):1178-80.
- Kamermans M, Fahrenfort I.** (2001) Ephaptic interactions within a chemical synapse: hemichannel-mediated ephaptic inhibition in the retina. *Curr Opin Neurobiol.* 14(5):531-41.
- Kamermans M, Spekrijse H.** (1999) The feedback pathway from horizontal cells to cones. A mini review with a look ahead. *Vision Res.* 39(15):2449-68.
- Kaneko A, Tachibana M.** (1986) Effects of gamma-aminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the turtle retina. *J Physiol.* 373:443-61.
- Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, Nedergaard M.** (2008) Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci.* 28(18):4702-11.

- Kawamura S, Tachibanaki S.** (2008) Rod and cone photoreceptors: molecular basis of the difference in their physiology. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 150(4):369-77.
- King LB, Vacchio MS, Dixon K, Hunziker R, Margulies DH, Ashwell JD.** (1995) A targeted glucocorticoid receptor antisense transgene increases thymocyte apoptosis and alters thymocyte development. *Immunity.* 3(5):647-56.
- Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, Saeland S, Davoust J, Malissen B.** (2005) Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity.* 22(5):643-54.
- Kitamura D, Roes J, Kühn R, Rajewsky K.** (1991) A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature.* 350(6317):423-6.
- Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, Ikawa M, Okabe M, Ikeda T, Itohara S, Kikusui T, Mori K, Sakano H.** (2007) Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature.* 450(7169):503-8.
- Kolb H, Fernandez E, Nelson R.** Webvision, The organization of the retina and visual system <http://webvision.med.utah.edu/>
- Kolb H.** (1974) The connections between horizontal cells and photoreceptors in the retina of the cat: electron microscopy of Golgi preparations. *J Comp Neurol.* 155(1):1-14.
- Kolb H.** (2003) How the retina works. *American Scientist*, Volume 91
- Kolodziej SJ, Hudmon A, Waxham MN, Stoops JK.** (2000) Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase IIalpha and truncated CaM kinase IIalpha reveal a unique organization for its structural core and functional domains. *J Biol Chem.* 275(19):14354-9.
- Kos CH.** (2004) Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr Rev.* 62(6 Pt 1):243-6.
- Koval M, Harley JE, Hick E, Steinberg TH.** (1997) Connexin46 is retained as monomers in a trans-Golgi compartment of osteoblastic cells. *J Cell Biol.* 137(4):847-57.
- Kreitzer MA, Collis LP, Molina AJ, Smith PJ, Malchow RP.** (2007) Modulation of extracellular proton fluxes from retinal horizontal cells of the catfish by depolarization and glutamate. *J Gen Physiol.* 130(2):169-82.
- Kronengold J, Trexler EB, Bukauskas FF, Bargiello TA, Verselis VK.** (2003a) Pore-lining residues identified by single channel SCAM studies in Cx46 hemichannels. *Cell Commun Adhes.* 10(4-6):193-9.
- Kronengold J, Trexler EB, Bukauskas FF, Bargiello TA, Verselis VK.** (2003b) Single-channel SCAM identifies pore-lining residues in the first extracellular loop and first transmembrane domains of Cx46 hemichannels. *J Gen Physiol.* 122(4):389-405.
- Kuffler SW.** (1953) Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J Neurophysiol.* 16(1):37-68.
- Kumar NM, Gilula NB.** (1986) Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J Cell Biol.* 103(3):767-76.
- Kumar NM, Gilula NB.** (1996) The gap junction communication channel. *Cell.* 84(3):381-8.
- Laird DW, Puranam KL, Revel JP.** (1991) Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J.* 273(Pt 1):67-72.
- Laird DW.** (2006) Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J.* 394(Pt 3):527-43.
- Lasansky A.** (1972) Cell junctions at the outer synaptic layer of the retina. *Invest Ophthalmol.* 11(5):265-75.
- Latt S.** (2004) Versuche zur Charakterisierung des Connexin57 in transfizierten Kulturzellen. Diplomarbeit, Institut für Genetik Universität Bonn.
- Ledbetter JA, Herzenberg LA.** (1979) Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol Rev.* 47:63-90.



- Lisman J, Schulman H, Cline H.** (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci.* 3(3):175-90.
- Lisman JE, McIntyre CC.** (2001) Synaptic plasticity: a molecular memory switch. *Curr Biol.* 11(19):R788-91.
- Liu F, Arce FT, Ramachandran S, Lal R.** (2006) Nanomechanics of hemichannel conformations: connexin flexibility underlying channel opening and closing. *J Biol Chem.* 281(32):23207-17.
- Locovei S, Wang J, Dahl G.** (2006) Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett.* 580(1):239-44.
- MacLeod DI.** (1972) Rods cancel cones in flicker. *Nature.* 235(5334):173-4.
- 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(14):3795-6.
- Mammen AL, Kameyama K, Roche KW, Hagan RL.** (1997) Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J Biol Chem.* 272(51):32528-33.
- Manthey D, Bukauskas F, Lee CG, Kozak CA, Willecke K.** (1999) Molecular cloning and functional expression of the mouse gap junction gene connexin-57 in human HeLa cells. *J Biol Chem.* 274(21):14716-23.
- Marquart KH.** (1977) So-called annular gap junctions in bone cells of normal mice. *Experientia.* 33(2):270-2.
- Massey SC, O'Brien JJ, Trexler EB, Li W, Keung JW, Mills SL, O'Brien J.** (2003) Multiple neuronal connexins in the mammalian retina. *Cell Commun Adhes.* 10(4-6):425-30.
- Mathias RT, Rae JL, Baldo GJ.** (1997) Physiological properties of the normal lens. *Physiol Rev.* 77(1):21-50.
- Mathias RT, Rae JL.** (2004) The lens: local transport and global transparency. *Exp Eye Res.* 2004 Mar;78(3):689-98.
- Maxeiner S, Krüger 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(3):689-700.
- McMahon DG, Knapp AG, Dowling JE.** (1989) Horizontal cell gap junctions: single-channel conductance and modulation by dopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(19):7639-43.
- Medina-Martinez O, Jamrich M.** (2007) Foxe view of lens development and disease. *Development.* 134(8):1455-63.
- Milks LC, Kumar NM, Houghten R, Unwin N, Gilula NB.** (1988) Topology of the 32-kd liver gap junction protein determined by site-directed antibody localizations. *EMBO J.* 7(10):2967-75.
- 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(3):1015-9.
- Molina AJ, Verzi MP, Birnbaum AD, Yamoah EN, Hammar K, Smith PJ, Malchow RP.** (2004) Neurotransmitter modulation of extracellular H<sup>+</sup> fluxes from isolated retinal horizontal cells of the skate. *J Physiol.* 560(Pt 3):639-57.
- Morley GE, Ek-Vitorín JF, Taffet SM, Delmar M.** (1997) Structure of connexin43 and its regulation by pHi. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 8(8):939-51.
- Mouse Genome informatics (MGI) <http://www.informatics.jax.org/>
- Müller-Hermelink HK, Steinmann G, Stein H.** (1982) Structural and functional alterations of the aging human thymus. *Adv Exp Med Biol.* 149:303-12.
- Musil LS, Goodenough DA.** (1991) Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol.* 115(5):1357-74.
- Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J.** (2005) Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature.* 434(7029):83-8.

- Nießén H.** (1999) Untersuchung der interzellulären Diffusion von Inositol 1,4,5-triphosphat in Connexin transfizierten humanen HeLa-Zellen und in primären Hepatozyten der Maus. Dissertation, Institut für Genetik, Bonn.
- 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(1):129-36.
- Ouyang X, Winbow VM, Patel LS, Burr GS, Mitchell CK, O'Brien J.** (2005) Protein kinase A mediates regulation of gap junctions containing connexin35 through a complex pathway. *Brain Res Mol Brain Res.* 135(1-2):1-11.
- 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(3):435-43.
- Panchin YV.** (2005) Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. *J Exp Biol.* 208(Pt 8):1415-9.
- 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(1):94-102.
- Payton BW, Bennett MV, Pappas GD.** (1969) Permeability and structure of junctional membranes at an electrotonic synapse. *Science.* 166(913):1641-3.
- 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(4):627-32.
- Peichl L, González-Soriano J.** (1993) Unexpected presence of neurofilaments in axon-bearing horizontal cells of the mammalian retina. *J Neurosci.* 13(9):4091-100.
- Penuela S, Bhalla R, Gong XQ, Cowan KN, Celetti SJ, Cowan BJ, Bai D, Shao Q, Laird DW.** (2007) Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. *J Cell Sci.* 120(Pt 21):3772-83.
- Peracchia C.** (2004) Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochim Biophys Acta.* 1662(1-2):61-80.
- Pereda AE, Bell TD, Chang BH, Czernik AJ, Nairn AC, Soderling TR, Faber DS.** (1998) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II mediates simultaneous enhancement of gap-junctional conductance and glutamatergic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 27;95(22):13272-7.
- Pereda AE, Faber DS.** (1996) Activity-dependent short-term enhancement of intercellular coupling. *J Neurosci.* 16(3):983-92.
- Pezzano M, Samms M, Martinez M, Guyden J.** (2001) Questionable thymic nurse cell. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65(3):390-403.
- Phelan P, Bacon JP, Davies JA, Stebbings LA, Todman MG, Avery L, Baines RA, Barnes TM, Ford C, Hekimi S, Lee R, Shaw JE, Starich TA, Curtin KD, Sun YA, Wyman RJ.** (1998) Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends Genet.* 14(9):348-9.
- Phelan P, Starich TA.** (2001) Innexins get into the gap. *Bioessays.* 23(5):388-96.
- Piatigorsky J.** (1981) Lens differentiation in vertebrates. A review of cellular and molecular features. *Differentiation.* 19(3):134-53.
- Poché RA, Kwan KM, Raven MA, Furuta Y, Reese BE, Behringer RR.** (2007) Lim1 is essential for the correct laminar positioning of retinal horizontal cells. *J Neurosci.* 27(51):14099-107.
- Potapova TV, Aslanidi KB, Belozerskaya TA, Levina NN.** (1988) Transcellular ionic currents studied by intracellular potential recordings in *Neurospora crassa* hyphae. Transfer of energy from proximal to apical cells. *FEBS Lett.* 241(1-2):173-6.
- Prochnow N, Dermietzel R.** (2008) Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochem Cell Biol.* 130(1):71-7.
- Puk O, Löster J, Dalke C, Soewarto D, Fuchs H, Budde B, Nürnberg P, Wolf E, de Angelis MH, Graw J.** (2008) Mutation in a novel connexin-like gene (*Gjf1*) in the mouse affects early lens development and causes a variable small-eye phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49(4):1525-32.

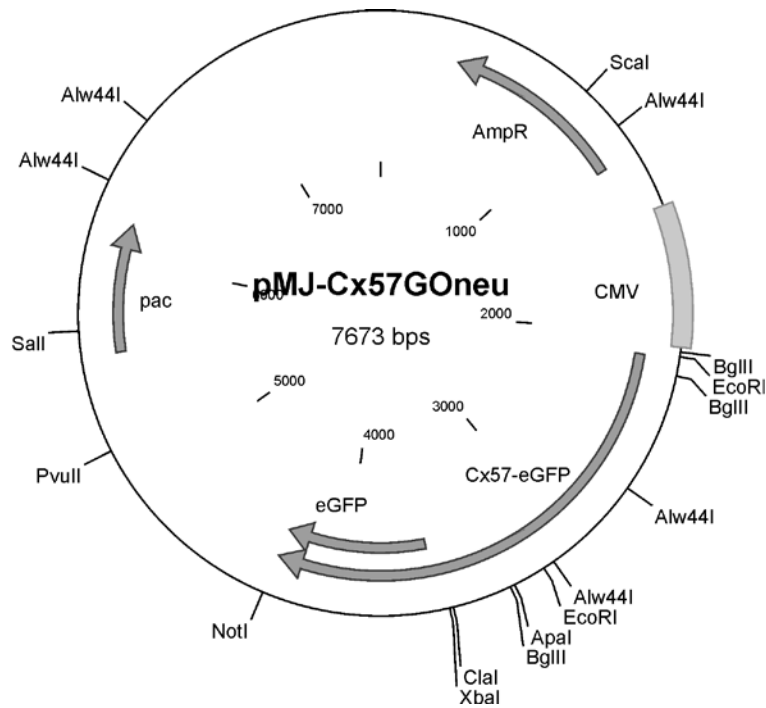
- Ratcliff R, Evans MJ, Doran J, Wainwright BJ, Williamson R, Colledge WH.** (1992) Disruption of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in embryonic stem cells by gene targeting. *Transgenic Res.* 1(4):177-81.
- Revel JP, Karnovsky MJ.** (1967) Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol.* 33(3):C7-C12.
- Revel JP, Yee AG, Hudspeth AJ.** (1971) Gap junctions between electrotonically coupled cells in tissue culture and in brown fat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68(12):2924-7.
- Rijhsinghani AG, Thompson K, Bhatia SK, Waldschmidt TJ.** (1996) Estrogen blocks early T cell development in the thymus. *Am J Reprod Immunol.* 36(5):269-77.
- Rodríguez 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(2):139-40.
- Rong P, Wang X, Niesman I, Wu Y, Benedetti LE, Dunia I, Levy E, Gong X.** (2002) Disruption of Gja8 (alpha8 connexin) in mice leads to microphthalmia associated with retardation of lens growth and lens fiber maturation. *Development.* 129(1):167-74.
- 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(8):746-50.
- Sanchis-Segura C, Borchardt T, Vengeliene V, Zghoul T, Bachteler D, Gass P, Sprengel R, Spanagel R.** (2006) Involvement of the AMPA receptor GluR-C subunit in alcohol-seeking behavior and relapse. *J Neurosci.* 26(4):1231-8.
- Sasaki T, Garant PR.** (1986) Fate of annular gap junctions in the papillary cells of the enamel organ in the rat incisor. *Cell Tissue Res.* 246(3):523-30.
- Savino W.** (2006) The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog.* 2(6):e62.
- Schmidt KF.** (1997) Properties of glutamate-gated ion channels in horizontal cells of the perch retina. *Vision Res.* 37(15):2023-8.
- Schneeweis DM, Schnapf JL.** (1995). Photovoltage of rods and cones in the macaque retina. *Science* 268:1053-1056.
- Schock SC, Leblanc D, Hakim AM, Thompson CS.** (2008) ATP release by way of Connexin 36 hemichannels mediates ischemic tolerance in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 368(1):138-44.
- Schubert AL, Schubert W, Spray DC, Lisanti MP.** (2002) Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry.* 41(18):5754-64.
- Schubert T, Weiler R, Feigenspan A.** (2006) Intracellular calcium is regulated by different pathways in horizontal cells of the mouse retina. *J Neurophysiol.* 96(3):1278-92.
- Schultz K, Janssen-Bienhold U, Weiler R.** (2001) Selective synaptic distribution of AMPA and kainate receptor subunits in the outer plexiform layer of the carp retina. *J Comp Neurol.* 435(4):433-49.
- Sellitto C, Li L, White TW.** (2004) Connexin50 is essential for normal postnatal lens cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45(9):3196-202.
- Severs NJ, Shovel KS, Slade AM, Powell T, Twist VW, Green CR.** (1989) Fate of gap junctions in isolated adult mammalian cardiomyocytes. *Circ Res.* 65(1):22-42.
- 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(12):3176-86.
- Shen K, Meyer T.** (1999) Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science.* 284(5411):162-6.
- Shepherd VA, Orlovich DA, Ashford AE.** (1993) Cell-to-cell transport via motile tubules in growing hyphae of a fungus. *J Cell Sci.* 105 ( Pt 4):1173-8.

- Shields CR, Klooster J, Claassen Y, Ul-Hussain M, Zoidl G, Dermietzel R, Kamermans M.** (2007) Retinal horizontal cell-specific promoter activity and protein expression of zebrafish connexin 52.6 and connexin 55.5. *J Comp Neurol.* 501(5):765-79.
- Shimshek DR, Bus T, Grinevich V, Single FN, Mack V, Sprengel R, Spergel DJ, Seeburg PH.** (2006) Impaired reproductive behavior by lack of GluR-B containing AMPA receptors but not of NMDA receptors in hypothalamic and septal neurons. *Mol Endocrinol.* 20(1):219-31.
- Sim GK, Kafatos FC, Jones CW, Koehler MD, Efstratiadis A, Maniatis T.** (1979) Use of a cDNA library for studies on evolution and developmental expression of the chorion multigene families. *Cell.* 18(4):1303-16.
- Slaughter MM, Miller RF.** (1983) Bipolar cells in the mudpuppy retina use an excitatory amino acid neurotransmitter. *Nature.* 9-15;303(5917):537-8.
- Söhl G, Odermatt B, Maxeiner S, Degen J, Willecke K.** (2004) New insights into the expression and function of neural connexins with transgenic mouse mutants. *Brain Res Brain Res Rev.* 47(1-3):245-59.
- Söhl G, Willecke K.** (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes.* 10(4-6):173-80.
- Söhl G, Willecke K.** (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.* 62(2):228-32.
- Soriano P.** (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet.* 21(1):70-1.
- Spray DC, White RL, de Carvalho AC, Harris AL, Bennett MV.** (1984) Gating of gap junction channels. *Biophys J.* 45(1):219-30.
- Spray DC, Ye ZC, Ransom BR.** (2006) Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia.* 54(7):758-73.
- Srinivas M, Calderon DP, Kronengold J, Verselis VK.** (2006) Regulation of connexin hemichannels by monovalent cations. *J Gen Physiol.* 127(1):67-75.
- Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, William CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F.** (2001) Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol.* 1:4.
- Steinberg RH, Frishman LJ, Sieving PA.** (1991) *Progress in Retinal Research*, Pergamon Press, Oxford.
- Steinmann GG.** (1986) Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol.* 75:43-88.
- Strack S, McNeill RB, Colbran RJ.** (2000) Mechanism and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II targeting to the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem.* 275(31):23798-806.
- Stryer L.** (1991) Visual excitation and recovery. *J Biol Chem.* 266(17):10711-4.
- Suzuki H, Pinto LH.** (1986) Response properties of horizontal cells in the isolated retina of wild-type and pearl mutant mice. *J Neurosci.* 6(4):1122-8.
- Takahashi K, Dixon DB, Copenhagen DR.** (1993) Modulation of a sustained calcium current by intracellular pH in horizontal cells of fish retina. *J Gen Physiol.* 101(5):695-714.
- Terashima T, Ochiishi T, Yamauchi T.** (1994) Immunocytochemical localization of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II isoforms in the ganglion cells of the rat retina: immunofluorescence histochemistry combined with a fluorescent retrograde tracer. *Brain Res.* 650(1):133-9.
- 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(2):205-18.
- Thomas KR, Deng C, Capecchi MR.** (1992) High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. *Mol Cell Biol.* 12(7):2919-23.

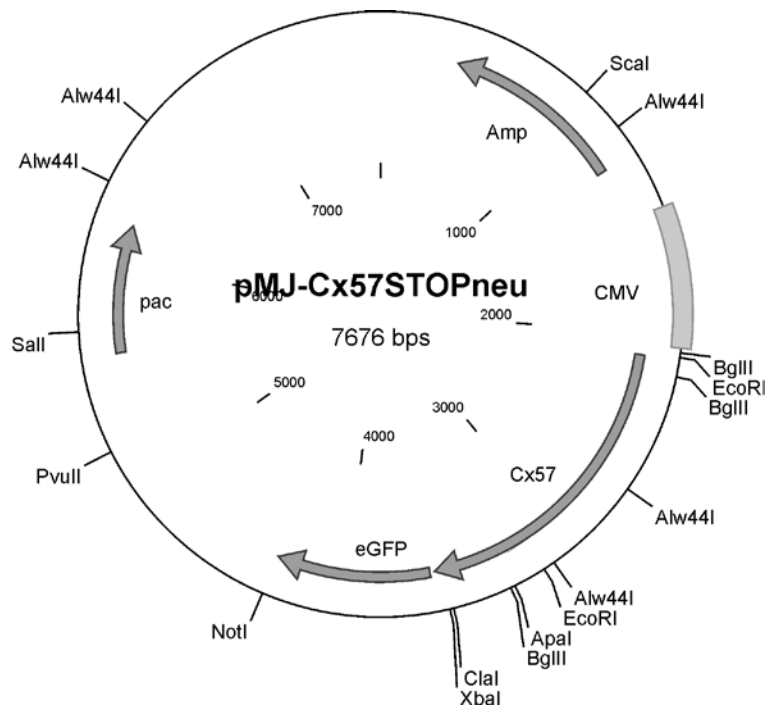
- Thomas T, Jordan K, Simek J, Shao Q, Jedeszko C, Walton P, Laird DW.** (2005) Mechanisms of Cx43 and Cx26 transport to the plasma membrane and gap junction regeneration. *J Cell Sci.* 118(Pt 19):4451-62.
- Thoreson WB.** (2007) Kinetics of synaptic transmission at ribbon synapses of rods and cones. *Mol Neurobiol.* 36(3):205-23. Epub 2007 Jul 10.
- UI-Hussain M, Zoidl G, Klooster J, Kamermans M, Dermietzel R.** (2008) IRES-mediated translation of the carboxy-terminal domain of the horizontal cell specific connexin Cx55.5 in vivo and in vitro. *BMC Mol Biol.* 9:52.
- Unwin PN, Ennis PD.** (1984) Two configurations of a channel-forming membrane protein. *Nature.* 307(5952):609-13.
- Urbano FJ, Leznik E, Llinás RR.** (2007) Modafinil enhances thalamocortical activity by increasing neuronal electrotonic coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(30):12554-9.
- Urschel S, Höher T, Schubert T, Alev C, Söhl G, Wörsdörfer 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(44):33163-71.
- 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(Pt 2):459-68.
- Valiunas V, Weingart R.** (2000) Electrical properties of gap junction hemichannels identified in transfected HeLa cells. *Pflugers Arch.* 440(3):366-79.
- Valiunas V.** (2002) Biophysical properties of connexin-45 gap junction hemichannels studied in vertebrate cells. *J Gen Physiol.* 119(2):147-64.
- Vallone PM, Butler JM.** (2004) AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques.* 37(2):226-31.
- Vanita V, Hennies HC, Singh D, Nurnberg P, Sperling K, Singh JR** (2006) A novel mutation in GJA8 associated with autosomal dominant congenital cataract in a family of Indian origin. *Mol Vis* 12:1217–1222
- VanSlyke JK, Musil LS.** (2005) Cytosolic stress reduces degradation of connexin43 internalized from the cell surface and enhances gap junction formation and function. *Mol Biol Cell.* 16(11):5247-57.
- Verweij J, Kamermans M, Spekrijse H.** (1996) Horizontal cells feed back to cones by shifting the cone calcium-current activation range. *Vision Res.* 36(24):3943-53.
- Vessey JP, Stratis AK, Daniels BA, Da Silva N, Jonz MG, Lalonde MR, Baldrige WH, Barnes S.** (1995) Proton-mediated feedback inhibition of presynaptic calcium channels at the cone photoreceptor synapse. *J Neurosci.* 25(16):4108-17.
- Vicini S, Ferguson C, Prybylowski K, Kralic J, Morrow AL, Homanics GE.** (2001) GABA(A) receptor alpha1 subunit deletion prevents developmental changes of inhibitory synaptic currents in cerebellar neurons. *J Neurosci.* 21(9):3009-16.
- Wei CJ, Francis R, Xu X, Lo CW.** (2005) Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. *J Biol Chem.* 280(20):19925-36.
- Weiler R, He S, Vaney DI.** (1999) Retinoic acid modulates gap junctional permeability between horizontal cells of the mammalian retina. *Eur J Neurosci.* 1999 Sep;11(9):3346-50.
- Weiler R, Pottok 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(1):121-9.
- Weiler R, Pottok M, Schultz K, Janssen-Bienhold U.** (2001) Retinoic acid, a neuromodulator in the retina. *Prog Brain Res.* 131:309-18.
- Wellershaus K.** (2006) Charakterisierung einer konditionalen Cx36-defizienten Mausmutante sowie Vorversuche zur funktionellen Analyse von Horizontalzellen in der Retina. Dissertation, Institut für Genetik Universität Bonn.

- Werblin F.** (1991) Synaptic connections, receptive fields, and patterns of activity in the tiger salamander retina. A simulation of patterns of activity formed at each cellular level from photoreceptors to ganglion cells [the Friedenwald lecture] *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32(3):459-83.
- Werblin FS, Dowling JE.** (1969) Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. *J Neurophysiol.* 32(3):339-55.
- White TW, Goodenough DA, Paul DL.** (1998) Targeted ablation of connexin50 in mice results in microphthalmia and zonular pulverulent cataracts. *J Cell Biol.* 143(3):815-25.
- White TW.** (2002) Unique and redundant connexin contributions to lens development. *Science.* 295(5553):319-20.
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M, Deutsch U, Söhl G.** (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem.* 383(5):725-37.
- Wulff P, Goetz T, Leppä E, Linden AM, Renzi M, Swinny JD, Vekovischeva OY, Sieghart W, Somogyi P, Korpi ER, Farrant M, Wisden W.** (2007) From synapse to behavior: rapid modulation of defined neuronal types with engineered GABAA receptors. *Nat Neurosci.* 10(7):923-9.
- Xia CH, Cheng C, Huang Q, Cheung D, Li L, Dunia I, Benedetti LE, Horwitz J, Gong X.** (2006) Absence of alpha3 (Cx46) and alpha8 (Cx50) connexins leads to cataracts by affecting lens inner fiber cells. *Exp Eye Res.* 83(3):688-96.
- Xia CH, Cheung D, DeRosa AM, Chang B, Lo WK, White TW, Gong X.** (2006) Knock-in of alpha3 connexin prevents severe cataracts caused by an alpha8 point mutation. *J Cell Sci.* 119(Pt 10):2138-44.
- Xie H, Laird DW, Chang TH, Hu VW.** (1997) A mitosis-specific phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in human vascular cells: biochemical characterization and localization. *J Cell Biol.* 137(1):203-10.
- 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(1):245-50.
- Yang XD, Korn H, Faber DS.** (1990) Long-term potentiation of electrotonic coupling at mixed synapses. *Nature.* 348(6301):542-5.
- Yang XL, Wu SM.** (1991) Feedforward lateral inhibition in retinal bipolar cells: input-output relation of the horizontal cell-depolarizing bipolar cell synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(8):3310-3.
- Yau KW.** (1994) Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35(1):9-32.
- Yellayi S, Teuscher C, Woods JA, Welsh TH Jr, Tung KS, Nakai M, Rosenfeld CS, Lubahn DB, Cooke PS.** (2000) Normal development of thymus in male and female mice requires estrogen/estrogen receptor-alpha signaling pathway. *Endocrine.* 12(3):207-13.
- Yen MR, Saier MH Jr.** (2007) Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. *Prog Biophys Mol Biol.* 94(1-2):5-14.
- Zamanillo D, Sprengel R, Hvalby O, Jensen V, Burnashev N, Rozov A, Kaiser KM, Köster HJ, Borchardt T, Worley P, Lübke J, Frotscher M, Kelly PH, Sommer B, Andersen P, Seeburg PH, Sakmann B.** (1999) Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science.* 284(5421):1805-11.
- Zambryski P, Crawford K.** (2000) Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:393-421.
- Zhang JT, Chen M, Foote CI, Nicholson BJ.** (1996) Membrane integration of in vitro-translated gap junctional proteins: co- and post-translational mechanisms. *Mol Biol Cell.* 7(3):471-82.
- Zoller AL, Kersh GJ.** (2006) Estrogen induces thymic atrophy by eliminating early thymic progenitors and inhibiting proliferation of beta-selected thymocytes. *J Immunol.* 176(12):7371-8.

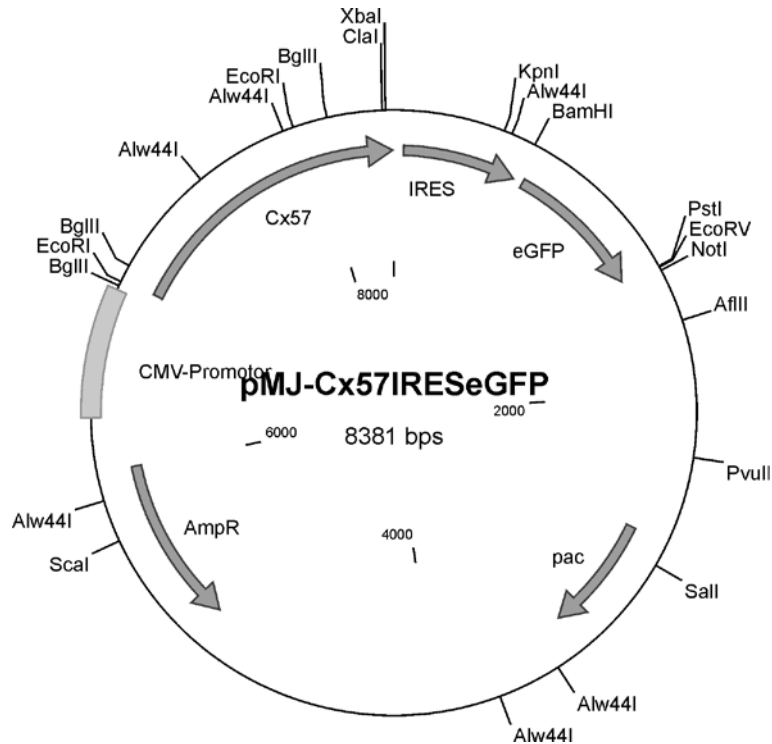
## 8. Anhang

A1: Vektorkarten

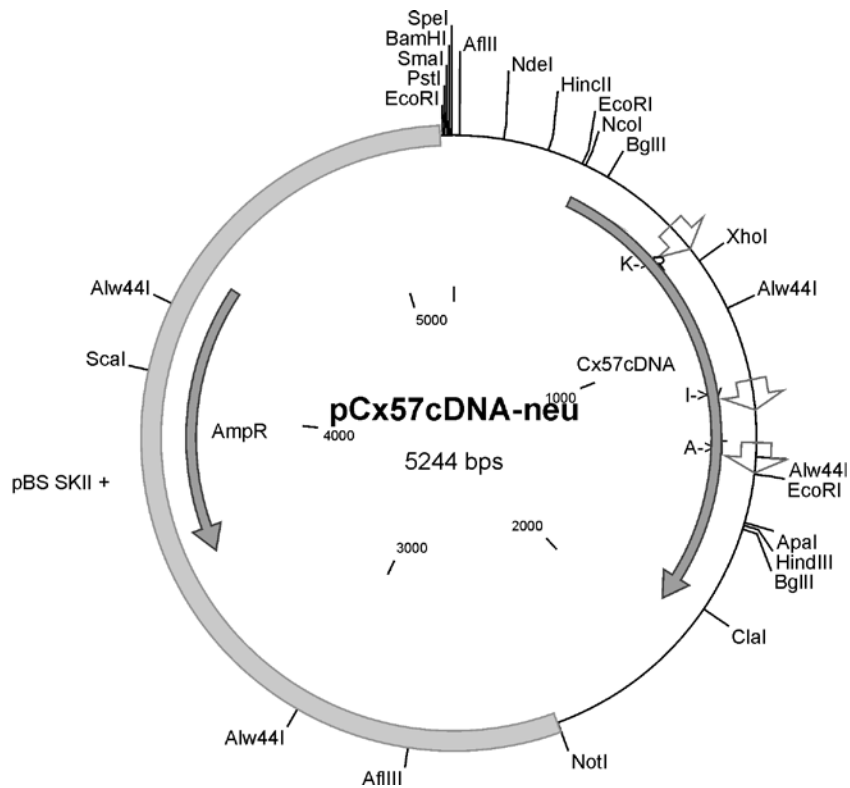
**Der eukaryontische Expressionsvektor pMJ-Cx57GOneu.** Kodiert für ein Fusionsprotein aus Cx57 (korrigierte Sequenz) und eGFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors. AmpR: Ampizilin-Resistenz, pac: Puromyzin-Resistenzkassette.



**Der eukaryontische Expressionsvektor pMJ-Cx57STOPneu.** Kodiert für Cx57 (korrigierte Sequenz) unter der Kontrolle des CMV-Promotors. AmpR: Ampizilin-Resistenz, pac: Puromyzin-Resistenzkassette.

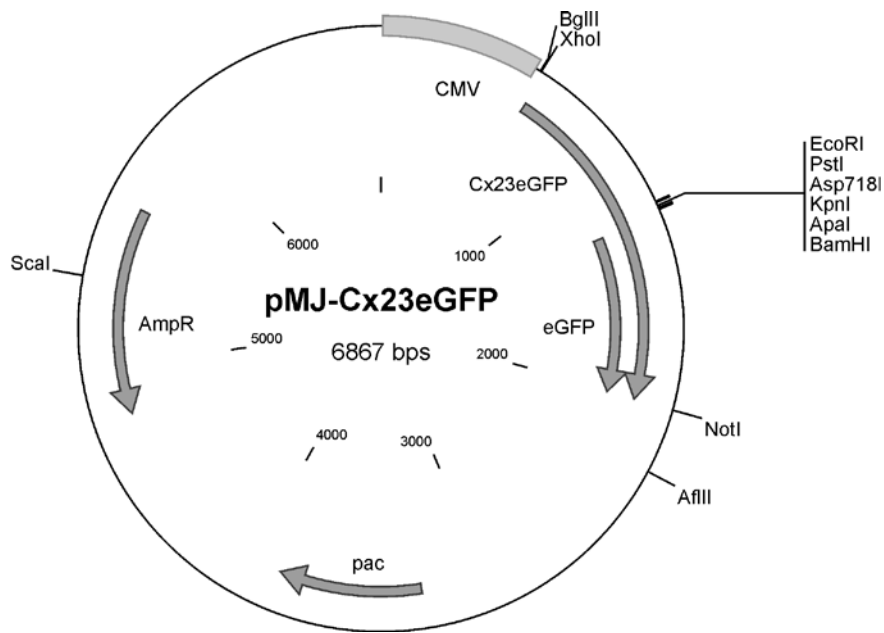


**Der eukaryontische Expressionsvektor pMJ-Cx57IRESeGFP.** Kodiert für Cx57 unter der Kontrolle des CMV-Promotors gefolgt von einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) und der kodierenden Sequenz von eGFP. AmpR: Ampizilin-Resistenz, pac: Puromyzin-Resistenzkassette.

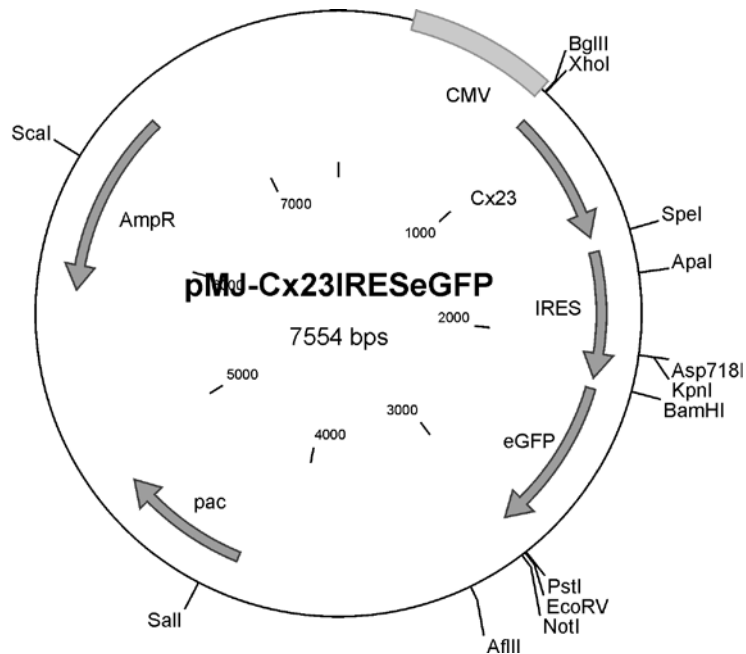


**pCx57cDNAneu.** pBSK-SKII<sup>+</sup> mit cDNA Sequenz von Cx57 (korrigierte Sequenz). Die Positionen von Mutationen in der zuvor verwendeten Sequenz (K110R, I272V und A330T) sind markiert. AmpR: Ampizilin-Resistenzsette.

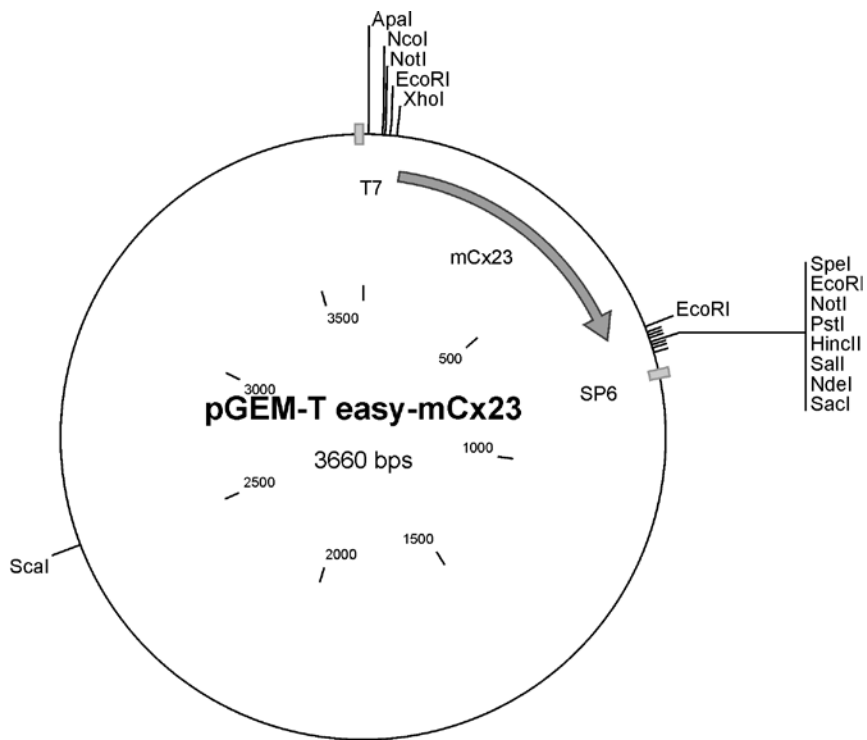




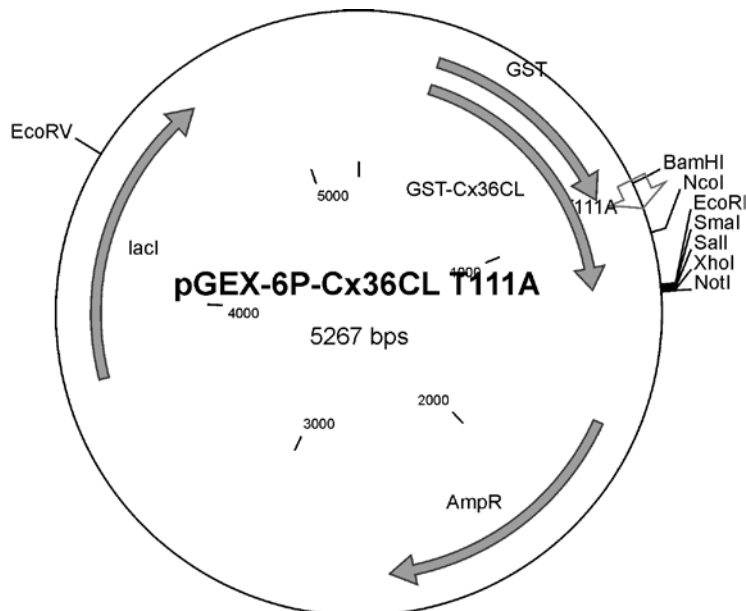
**Der eukaryontische Expressionsvektor pMJ-Cx23eGFP.** Kodiert für ein Fusionsprotein aus Cx23 und eGFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors. AmpR: Ampizilin-Resistenz, pac: Puromyzin-Resistenzkassette.



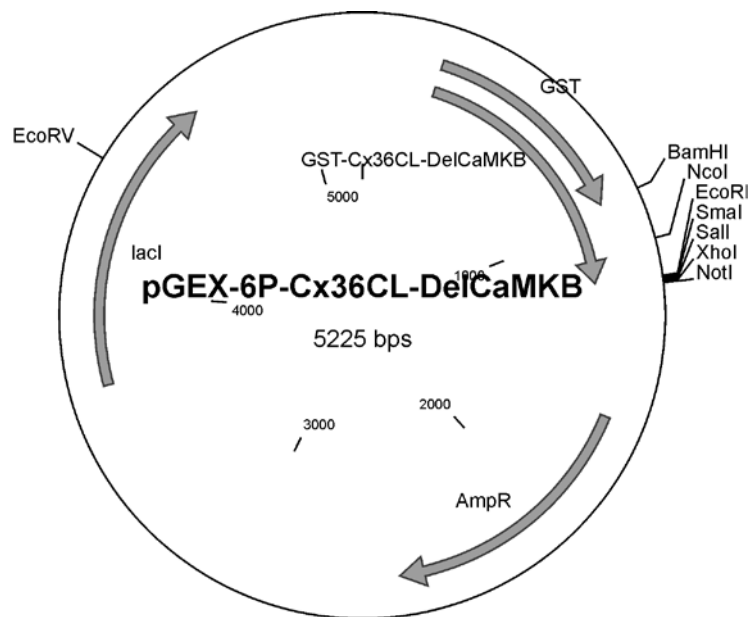
**Der eukaryontische Expressionsvektor pMJ-Cx23IRESeGFP.** Dieser Vektor kodiert für Cx23 unter der Kontrolle des CMV-Promotors gefolgt von einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) und der kodierenden Sequenz von eGFP. AmpR: Ampizilin-Resistenz, pac: Puromyzin-Resistenzkassette.



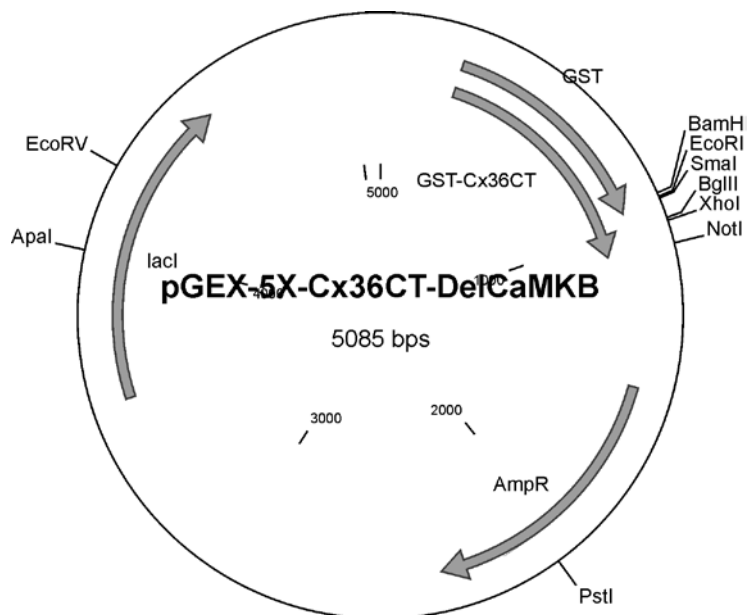
**pGEM-T easy-mCx23.** Enthält die cDNA von mCx23 in pGEM-T easy (Promega, Madison, WI USA).



**pGEX-6P-Cx36CL T111A.** Dieser prokaryontische Expressionsvektor kodiert für ein Fusionsprotein aus der Glutathion-S-Transferase (GST) und der zytoplasmatischen Schleife von Cx36 mit einer Mutation von Threonin111 zu Alanin. lacl: Lac-Repressor, AmpR: Ampizilin-Resistenz.



**pGEX-6P-Cx36CL-DELCaMKB.** Dieser prokaryontische Expressionsvektor kodiert für ein Fusionsprotein aus der Glutathion-S-Transferase (GST) und der zytoplasmatischen Schleife von Cx36 mit einer Deletion einer vermuteten CaMKII-Bindedomäne (Aminosäurereste 99-119). lacI: Lac-Repressor, AmpR: Ampizilin-Resistenz.



**pGEX-6P-Cx36CT-DELCaMKB.** Dieser prokaryontische Expressionsvektor kodiert für ein Fusionsprotein aus der Glutathion-S-Transferase (GST) und des C-Terminus von Cx36 mit einer Deletion einer vermuteten CaMKII-Bindedomäne (Aminosäurereste 272-292). lacI: Lac-Repressor, AmpR: Ampizilin-Resistenz.