

Untersuchungen zur Expression von  
Connexinen und der Funktion Gap Junction-  
vermittelter Kommunikation in embryonalen  
Stammzellen der Maus

**Dissertation**

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

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

vorgelegt von  
Philipp Wörsdörfer

aus Koblenz

Bonn, 2010

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Willecke  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Walter Witke

Erscheinungsjahr: 2010

Tag der Promotion: 22.06.2010

## **Erklärung**

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

Bonn, Januar 2010

---

Philipp Wörsdörfer

## **Danksagung:**

Großer Dank gilt Prof. Dr. Klaus Willecke für die Betreuung dieser Dissertation und für seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Darüberhinaus möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große wissenschaftliche Freiheit bedanken.

Prof. Dr. Walter Witke danke ich für die Übernahme des Koreferats. Dank gilt darüberhinaus PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert und Prof. Dr. Dieter Fürst für die Bereitschaft, der Prüfungskommission als fachangrenzende Gutachterin bzw. fachnaher Gutachter anzugehören.

Einige der während der Anfertigung dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden durch die Kooperation mit folgenden Kollegen erst ermöglicht bzw. erleichtert: Ich danke Dr. Sebastian Temme für die Hilfe bei den FACS-Analysen. Die Untersuchungen zur Zusammensetzung der Connexone in ES-Zellen wurden von Christian Markopoulos durchgeführt. Dr. Gregor Kirfel vom Institut für Zellbiologie gilt mein Dank für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Connexone. Das verwendete transduzierbare Cre-Protein wurde freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Frank Edenhofer am Institut für Rekonstruktive Neurobiologie zur Verfügung gestellt. Dr. Michele Boiani (Max Planck Institut für molekulare Biomedizin, Münster) danke ich für die Bereitstellung der Swiss Webster Mäuse. Besonderer Dank gilt Angela Egert und Prof. Dr. Hubert Schorle vom Institut für Pathologie, die es mir ermöglichten die Isolation embryonaler Stammzellen aus Blastozysten zu erlernen. Dr. Stephan Maxeiner danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Bei Christine Siegmund möchte ich mich für die hervorragende technische Assistenz bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin allen aktuellen und ehemaligen Kollegen am Institut für Genetik, für die stets angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie die vielen schönen Momente während und abseits der Arbeit.

Ferner möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir ständig aufmunternd zur Seite gestanden ist und insbesondere meinen Eltern die nicht zuletzt durch ihre finanzielle Unterstützung ein Hochschulstudium erst möglich gemacht haben.

Abschließend gilt mein herzlicher Dank meiner Lebensgefährtin Kathi für ihre bedingungslose Unterstützung, ihre Geduld und ihren liebevollen Beistand.

# Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Gap Junctions und Connexine	8
1.2 Funktionen der Gap Junctions	11
1.4 Die Entwicklung des murinen Präimplantationsembryos von der Eizelle zur Blastozyste	13
1.5 Connexinexpression während der frühen Embryonalentwicklung	15
1.6 Embryonale Stammzellen	16
1.7 Connexine und Gap Junctions in embryonalen Stammzellen	17
1.8 Postimplantationsentwicklung bis zur Gastrulation	18
1.9 <i>In vitro</i> Differenzierung embryonaler Stammzellen in Embryonalkörperchen	18
1.10 Funktion von Connexinen in ES-Zellen und während der ES-Zelldifferenzierung	20
1.11 Apoptose	21
1.12 Das Cre/loxP-Rekombinationssystem	23
1.13 Transduzierbare Proteine	24
1.14 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	26
<b>2. Material</b>	<b>27</b>
2.1 Verwendete Zelllinien	27
2.2 Allgemeine Labormaterialien und Geräte	28
2.3 Verwendete Oligonukleotid Startermoleküle für die Polymerase Kettenreaktion	29
2.4 Verwendete Antikörper	31
2.4.1 Primäre Antikörper	31
2.4.2 Sekundäre Antikörper	32
2.5 Lösungen und Medien	32
<b>3. Methoden</b>	<b>38</b>
3.1 Kultur embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)	38
3.2 Passagieren von ES-Zellen	38
3.3 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen	38
3.4 Isolation embryonaler Mausfibroblastenzellen	39
3.5 Isolation embryonaler Stammzellen aus Blastozysten transgener C57BL/6 Mäuse	40
3.6 Charakterisierung der isolierten ES-Zellen mittels PCR-Analysen	41
3.7 Cre-Transduktion in Cx43/Cx45flox ES-Zellen	43
3.8 Differenzierung embryonaler Stammzellen	46
3.8.1 Spontane Differenzierung in Embryonalkörperchen	46
3.8.2 Differenzierung in Kardiomyozyten	47
3.8.3 Differenzierung in Neuronen und Astrozyten	47
3.9 Isolation und reverse Transkription der Gesamt-RNA aus HM1 ES-Zellen und Nachweis von Connexin und Pannexin cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion	48
3.9.1 RNA Extraktion aus ES-Zellen	48
3.9.2 Reverse Transkription der isolierten RNA	49
3.9.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur selektiven Amplifikation bestimmter cDNAs	49
3.9.4 Agarose-Gelelektrophorese	51
3.10 Immunoblotanalyse	52
3.10.1 Herstellen von Proteinlysaten	52
3.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	52
3.10.3 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese	53
3.10.4 Western-Blot	54
3.10.5 Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper	54
3.10.6 Elektro-Chemilumineszenz (ECL) Reaktion	55

3.10.7 Entfernen gebundener Antikörper von einer Nitrozellulosemembran	55
3.10.8 Ponceau-Färbung einer Nitrozellulosemembran	55
<b>3.11 Immunfluoreszenzanalysen an Zellkulturen bzw. Kryoschnitten</b>	<b>56</b>
3.11.1 Immunfluoreszenzanalyse an Kulturzellen	56
3.11.2 Immunfluoreszenzanalysen an Schnitten von Embryonalkörperchen	57
<b>3.12 Mikroinjektionsanalyse</b>	<b>57</b>
3.12.1 Mikroinjektion von Neurobiotin	58
3.12.2 Mikroinjektion von Lucifer Yellow	59
3.12.3 Mikroinjektion von Ethidiumbromid	59
<b>3.13 Behandlung von HM1 ES-Zellen mit Gap-Junction Inhibitoren</b>	<b>59</b>
<b>3.14 Apoptose-Testverfahren</b>	<b>60</b>
<b>3.15 Bestimmung der Proliferationsraten</b>	<b>60</b>
<b>3.16 Transfektion von ES-Zellen mit siRNA</b>	<b>61</b>
<b>3.17 <math>\beta</math>-Galaktosidase-Darstellung zum Nachweis der Expression des lacZ Reportergens</b>	<b>62</b>
<b>3.18 Paraffinschnitte von Embryonalkörperchen</b>	<b>62</b>
<b>3.19 Connexonaufreinigung und Co-Immunpräzipitationsanalysen</b>	<b>63</b>
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>64</b>
<b>4.1 Connexin- und Pannexinexpression in embryonalen Stammzellen der Maus</b>	<b>64</b>
4.1.1 Expression von Connexin- und Pannexin-mRNA	64
4.1.2 Expression von Connexin- und Pannexinproteinen	64
4.1.3 Indirekte Untersuchung der Cx30.3-Translation in ES-Zellen mittels X-Gal-Färbung von Cx30.3lacZ ES-Zellen	66
4.1.4 Subzelluläre Lokalisation der Connexinproteine	67
4.1.5 Nachweis der Gap Junction-vermittelten interzellulären Kommunikation	67
4.1.6 Zusammensetzung der Connexone in ES-Zellen	69
<b>4.2 Connexinexpression in C57BL/6-Blastozysten</b>	<b>71</b>
<b>4.3 Untersuchungen zur Funktion Gap Junction-vermittelter Kommunikation in embryonalen Stammzellen der Maus</b>	<b>72</b>
4.3.1 Wirkung pharmakologischer Gap Junction-Inhibitoren auf embryonale Stammzellen	72
4.3.2 Blockade der Gap Junction-vermittelten Kommunikation in ES-Zellen durch Deletion von Cx43 und Herunterregulation von Cx31 und Cx45 mittels siRNA	74
4.3.4 Untersuchungen zur Wirkweise pharmakologischer Gap Junction-Blocker auf embryonale Stammzellen	80
<b>4.4 Herstellung Cx43/Cx45-doppeldefizienter embryonaler Stammzellen.</b>	<b>82</b>
4.4.1 Isolation embryonaler Stammzellen aus Blastozysten	82
4.4.2 Differenzierungspotential der Cx43/Cx45flox ES-Zellen	85
4.4.3 Injektionen der Cx43/Cx45flox ES-Zellen in Blastozysten von swiss webster (CFW) Mäusen	87
4.4.4 Deletion der Connexine Cx43 und Cx45 in Cx43/Cx45flox ES-Zellen	89
4.4.5 Charakterisierung isolierter Klone mittels PCR-Analyse	89
4.4.6 Charakterisierung isolierter Klone mittels Immunoblot- und RT-PCR-Analyse	91
<b>4.5 Morphologisches Erscheinungsbild von Cx43/Cx45del ES-Zellen und Nachweis der Reporterexpression</b>	<b>93</b>
<b>4.6 Gap Junction-vermittelte Kommunikation zwischen Cx43/Cx45del ES-Zellen</b>	<b>94</b>
<b>4.7 Proliferationsrate von Cx43/Cx45flox und Cx43/Cx45del ES-Zellen</b>	<b>95</b>
<b>4.8 Apoptoseraten von Cx43/Cx45flox und Cx43/Cx45del ES-Zellen</b>	<b>97</b>
<b>4.9 <i>In vitro</i> Differenzierungspotential von Cx43/Cx45del ES-Zellen</b>	<b>99</b>
<b>4.10 <i>In vitro</i> Differenzierung von Cx43/Cx45del ES-Zellen in Kardiomyozyten</b>	<b>101</b>
<b>4.11 <i>In vitro</i> Differenzierung von Cx43/Cx45del ES-Zellen in Neuronen und Astrozyten</b>	<b>103</b>

<b>5. Diskussion</b>	<b>105</b>
<b>5.1 Connexinexpression in embryonalen Stammzellen der Maus</b>	<b>105</b>
5.1.1 Zusammensetzung der Connexone in ES-Zellen	108
5.1.2 Gap Junction-vermittelte Kommunikation	109
5.1.3 Connexinexpression in Blastozysten	109
5.1.4 Zusammenfassung der Untersuchungen zur Expression von Connexinen	110
<b>5.2 Analysen zur Funktion der Gap Junction-vermittelten Zell-Zell-Kommunikation in ES-Zellen</b>	<b>113</b>
5.2.1 Pharmakologische Blockade der Gap Junction-vermittelten Zell-Zell-Kopplung	113
5.2.2 Hinweise auf unspezifische Seiteneffekte pharmakologischer Gap Junction-Inhibitoren	114
5.2.3 Deletion von Cx43 und Reduktion der Cx31 und Cx45 mRNA-Menge mittels siRNA	115
5.2.4 Wirkungsweise von 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure auf ES-Zellen	116
<b>5.3 Erzeugung Cx43/Cx45 doppelt defizienter embryonaler Stammzellen</b>	<b>118</b>
5.3.1 Vergleich der Cx43/Cx45flox ES-Zellen mit den Cx43/Cx45-doppeltdefizienten ES-Zellen im Bezug auf Morphologie, Proliferation und Apoptose	119
<b>5.4 Überlegungen zur Funktion von Connexinen in ES-Zellen und während der frühen Embryonalentwicklung</b>	<b>122</b>
<b>5.5 Funktion der Connexine während der ES-Zelldifferenzierung</b>	<b>124</b>
5.5.1 Spontane Differenzierung von Cx43/Cx45-doppeltdefizienten ES-Zellen in Embryonalkörperchen	124
5.5.2 Untersuchungen zur Rolle von Cx43 und Cx45 bei der Kardiomyozyten-differenzierung	125
5.5.3 Untersuchungen zur Rolle von Cx43 und Cx45 bei der neuronalen Differenzierung	128
<b>6. Ausblick</b>	<b>130</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>133</b>
<b>8. Referenzen</b>	<b>135</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>145</b>
<b>9.1 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>145</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Gap Junctions und Connexine

Gap Junction-Kanäle sind interzelluläre Proteinröhren, welche die Zytoplasmata benachbarter Zellen miteinander koppeln und somit eine direkte interzelluläre Kommunikation ermöglichen (Abb.1.1 A). Normalerweise befindet sich zwischen den Plasmamembranen benachbarter Zellen eine Lücke von 30-40 nm. In Bereichen, an welchen Gap Junctions die Zellen verbinden, treten die Membranen jedoch bis auf 2-4 nm aneinander heran (Revel und Karnovski, 1967; Payton et al., 1969) (Abb.1.1 C). Da die benachbarten Zellen dort nur noch durch einen schmalen Spalt (engl. Gap) voneinander getrennt sind, werden diese Strukturen als Gap Junctions (Spaltverbindungen) bezeichnet. Die Proteinuntereinheiten der Gap Junction-Kanäle, die Connexine, sind Transmembranproteine bestehend aus vier Transmembranregionen sowie einer zytoplasmatischen N-terminalen und einer C-terminalen Domäne. Weiterhin besitzen die Proteine zwei extrazelluläre und eine intrazelluläre Schleife (Milks et al., 1988; Fleishman et al., 2004) (Abb.1.1 B). Intramolekulare Disulfidbrückenbindungen zwischen den extrazellulären Schleifen stabilisieren das Connexinprotein (Foote et al., 1998).

Sechs Connexine formen in der Plasmamembran eine hexamere Struktur, die eine wassergefüllte Pore umschließt. Ein solches Hexamer wird als Halbkanal (Connexon) bezeichnet. Zwei Halbkanäle benachbarter Zellen binden aneinander und bilden einen Vollkanal (Kumar und Gilula, 1996). Die Kopplung wird dabei von den extrazellulären Schleifen vermittelt. Intramolekulare Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinresten sorgen hier für eine komplexe  $\beta$ -Faltblattstruktur, welche das Docken der Connexone ermöglicht (Foote et al., 1998). In der Plasmamembran treten die Gap Junctions lokal in Verbänden von bis zu mehreren tausend Kanälen auf, den Gap Junction-Plaques (Caspar et al., 1977).

Die Familie der Connexinproteine umfasst im Genom der Maus 20 und im humanen Genom 21 Isoformen (Söhl et al., 2004), welche nach ihrer theoretischen Molmasse in kDa klassifiziert sind (z.B. besitzt Connexin43 (Cx43) ein theoretisches Molekulargewicht von 43) (Beyer et al., 1987).

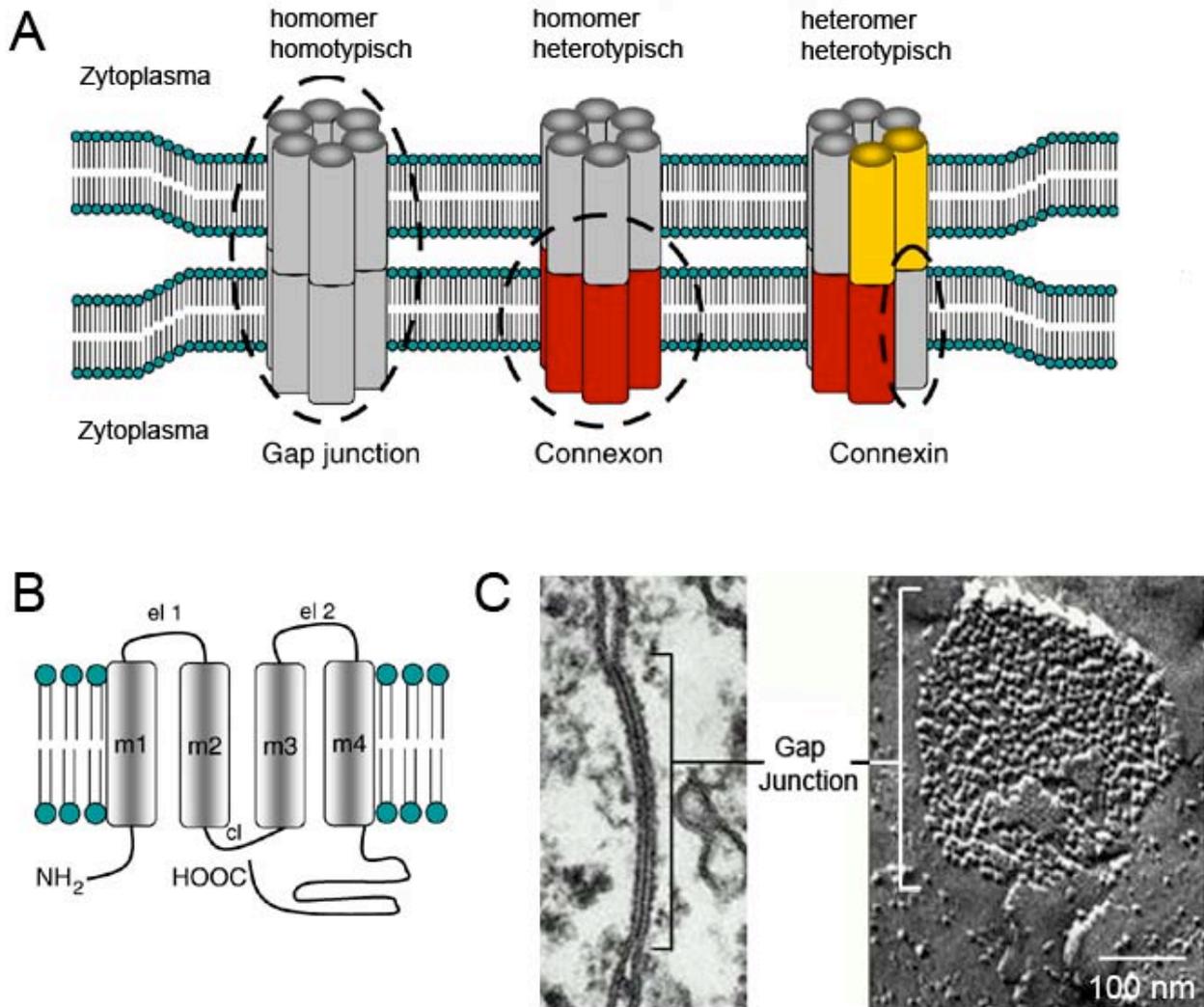
Ein Connexon kann sich aus nur einer Connexinisoform zusammensetzen (homomeres Connexon), kann aber auch aus unterschiedlichen Isoformen aufgebaut sein (heteromeres Connexon). Genauso ist es möglich, dass sich gleich bzw. unterschiedlich aufgebaute

Connexone zu einem Vollkanal verbinden. Man spricht dann von homo- bzw. heterotypischen Gap Junction-Kanälen (Kumar und Gilula, 1996) (Abb.1.1 A). Die Zusammensetzung der Kanäle bestimmt die Eigenschaften der Gap Junctions bezüglich ihrer Permeabilität für bestimmte niedermolekulare Substanzen (Bevans et al., 1998) und ihrer elektrischen Leitfähigkeit (Gros et al., 1996; Desplantez et al., 2007). Darüberhinaus besitzen die Connexinisoformen unterschiedliche Bindungsstellen für Bestandteile des Zytoskeletts (z.B. Tubulin), für Adapterproteine (z.B. ZO-1) sowie für Proteinkinasen (z.B. c-Src) (Duffy et al., 2002; Laird et al., 2006). Somit wird durch die Vielfalt an Kombinationsmöglichkeiten innerhalb eines Connexons bzw. eines Gap Junction-Kanals eine hohe Diversität an Kanaleigenschaften erreicht.

Gap Junction-Plaques sind äußerst plastische Strukturen und die Halbwertszeit ihrer Connexinuntereinheiten ist mit eineinhalb bis fünf Stunden relativ gering (Berthoud et al., 2004). Die Connexine werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und im Trans-Golgi-Netzwerk zu Connexonen zusammengesetzt, von wo aus ein vesikulärer Transport zur Zellmembran stattfindet (Laird et al., 2006). Für Cx26 ist darüberhinaus ein alternativer, direkter Transportweg beschrieben (Ahmad und Evans, 2002). In der Zellmembran können die Halbkanäle zunächst frei diffundieren bis sie in einen Gap-Junction-Plaque integriert werden.

Der Abbau der Connexine beginnt mit einer Internalisierung ganzer Teile eines Gap Junction-Plaques in von einer Doppelmembran umgebenen Vesikeln, den sogenannten annulären Junctions (Marquart et al. 1977). Es folgt die Degradierung über den lysosomalen Weg (Sasaki und Garant, 1986; Severs et al., 1989). Neben dem lysosomalen spielt ebenfalls der proteosomale Abbau eine Rolle, unter anderem im Zusammenhang mit der Degradierung von Connexinproteinen aus dem endoplasmatischen Retikulum (Laird et al., 2006). Darüberhinaus ist ein Rücktransport internalisierter Connexine zurück in die Membran möglich (van Slyke und Musil, 2005).

Gap Junction-Kanäle sind interzelluläre Proteinröhren, deren Öffnungszustand gezielt regulierbar ist. So kann z.B. eine hohe Spannungsdifferenz, eine hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration oder ein niedriger intrazellulärer pH-Wert zum Verschluss von Gap Junction-Kanälen führen (Spray et al., 1984; Morley et al., 1997). Des Weiteren bietet die Phosphorylierung bestimmter Thyrosin-, Serin- oder Threoninreste durch Proteinkinasen, z.B. am C-Terminus einiger Connexine, eine weitere Möglichkeit für die Steuerung des Öffnungsverhaltens von Gap Junction-Kanälen (Moreno et al., 2007).



**Abb.1.1: Gap Junctions, Connexone und Connexine.**

A: schematische Darstellung von Gap Junction-Kanälen. B: schematische Darstellung eines Connexins mit den vier Transmembrandomänen (m1-m4), den extrazellulären Schleifen (el1 und el2), der zyttoplasmatischen Schleife (cl) sowie des N- und C-Terminus (modifiziert nach Wagner, 2008). C: elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gap Junction-Plaques (links: Querschnitt, rechts: Aufsicht) (modifiziert nach Gilula et al., 1974).

## 1.2 Funktionen der Gap Junctions

Gap Junction-Kanäle ermöglichen den direkten Austausch von niedermolekularen Substanzen mit einer Größe von bis zu 1,8 kDa zwischen benachbarten Zellen (Neijssen et al., 2005). So können beispielsweise Ionen, Metabolite und sekundäre Botenstoffe innerhalb eines Zellverbundes diffundieren. Dabei scheinen vor allem zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) sowie Kalziumionen eine wichtige Rolle zu spielen (Goldberg et al., 1999 und 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass auch kleine Peptide (Neijssen et al., 2007) und kleine RNA-Moleküle (siRNAs) durch Gap Junction-Kanäle dringen können (Wolvetang et al., 2007). Somit tragen Gap Junctions zur Homöostase von Geweben bei.

Neben niedermolekularen Substanzen können auch elektrische Impulse über Gap Junctions direkt in einem Zellverbund weitergegeben werden. Dies geschieht z.B. bei der elektrischen Reizweiterleitung im Herzen wodurch eine koordinierte Kontraktion ermöglicht wird (Rohr et al., 2004). Außerdem findet man eine solche Signalübertragung bei neuronalen Zellen. Man spricht in diesem Zusammenhang von elektrischen Synapsen, welche im Gegensatz zu den chemischen Synapsen eine direkte und damit sehr schnelle Weiterleitung von Aktionspotentialen im Gehirn ermöglichen (Benett et al., 2004).

Über die Bildung von Zell-Zell-Kanälen hinaus, erfüllen Connexine auch weitere Funktionen wie die Beteiligung an Zelladhäsion und Migration (Prochnow et al., 2008).

Gerade in den letzten Jahren rückte eine weitere mögliche Funktion von Connexonen in den Fokus des Interesses. Ungedockte Connexin-Halbkanäle können sich unter bestimmten Bedingungen öffnen und somit einen direkten Kontakt zwischen dem Zytoplasma der Zelle und dem extrazellulären Raum herstellen (Evans et al., 2006). Dieser Vorgang konnte z.B. in Astrozyten gezeigt werden. Dort findet eine Adenosintrisphosphat (ATP)-Ausschüttung mittels Cx43-Halbkanälen in den extrazellulären Raum statt, die möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung von interzellulären Kalziumwellen spielt (Kang et al., 2008). Die physiologische Bedeutung von Connexin-Halbkanälen wird zur Zeit kontrovers diskutiert (Spray et al., 2006) und ihre Aufklärung hat gerade erst begonnen.

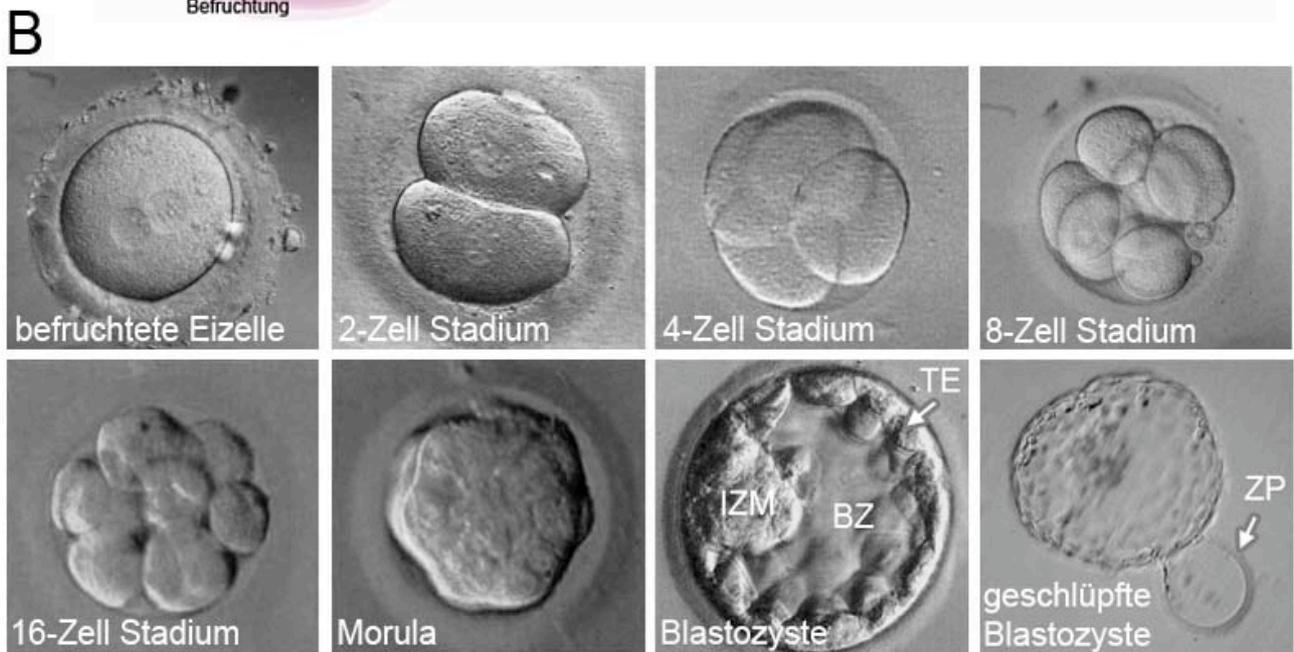
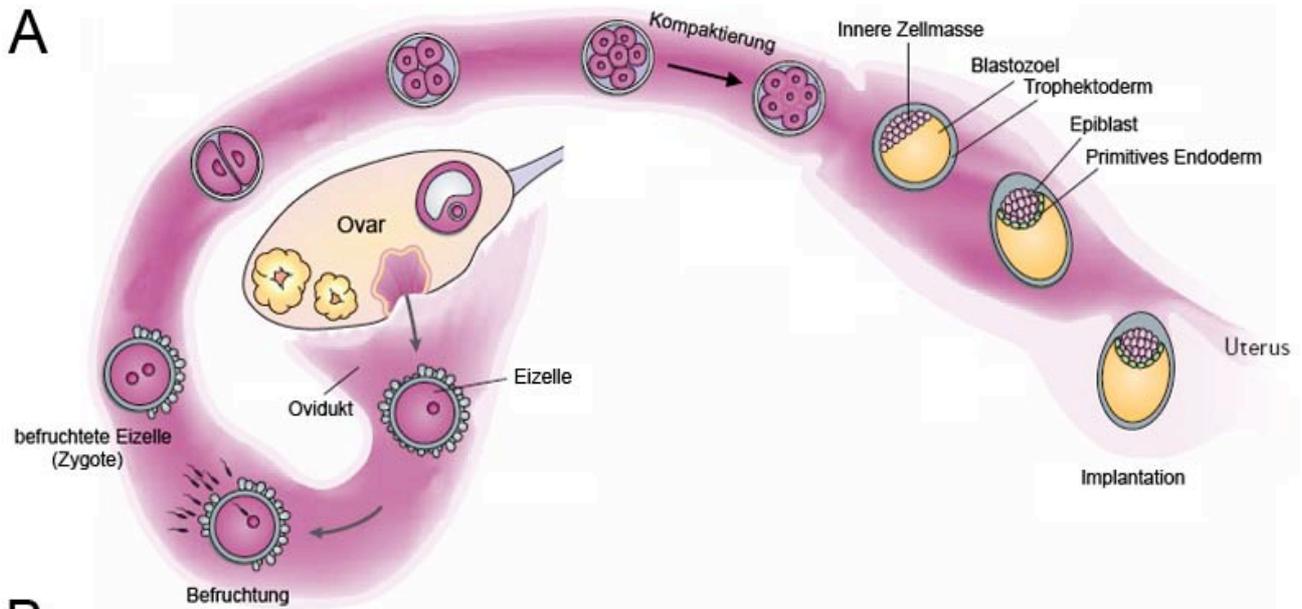
### 1.3 Pannexine

Während Gap Junctions in Vertebraten aus Connexinuntereinheiten aufgebaut sind, vermitteln in Invertebraten die Innexine (**Invertebraten Connexine**) die direkte Zell-Zell-Kommunikation (Phelan et al., 1998). Obwohl Innexine und Connexine unterschiedliche, nicht homologe Genfamilien darstellen, weisen die Proteine gewisse topologische Gemeinsamkeiten auf und erfüllen in den beiden Tierstämmen die gleiche Funktion (Bruzzone et al., 1996; Phelan und Starich, 2001). Später wurden auch in Vertebraten homologe Proteine zu den Innexinen entdeckt (Panchin et al., 2000; Potenza et al., 2003; Bruzzone et al., 2003; Baranova et al., 2004). Aufgrund ihres Vorkommens in allen Stämmen wurden diese „Innexine“ neu klassifiziert und als Pannexine bezeichnet (griechisch pan = alles, ganz und nexus = Verbindung) (Panchin et al., 2000).

Das menschliche Genom wie auch das Mausgenom enthalten drei Pannexingene (Panx1, Panx2 und Panx3), welche spezifisch in bestimmten Geweben ausgeprägt sind. So scheint Panx1 beispielsweise ubiquitär exprimiert zu sein, während sich die Panx2-Ausprägung weitestgehend auf das Gehirn beschränkt (Baranova et al., 2004; Bruzzone et al., 2003; Panchin et al., 2000). Wie die Connexine und Innexine können auch die Pannexine Gap Junction-Kanäle ausbilden, was an mit Panx1 transfizierten, gepaarten *Xenopus*-Oozyten gezeigt werden konnte (Bruzzone et al., 2003). Ob Pannexine in Vertebraten auch *in vivo* an Gap Junction-vermittelter Kommunikation beteiligt sind oder ob sie eine andere physiologische Rolle spielen, ist bisher noch unklar (Bao et al., 2004; Dahl et al., 2006). So wurde beispielsweise gezeigt, dass Pannexin1-Halbkanäle in Assoziation mit P2X7-Rezeptoren in den Zellmembranen vorkommen (Iglesias et al., 2008). Die Panx1-Halbkanäle haben vermutlich eine Bedeutung bei der P2X7-Rezeptor gesteuerten Ausschüttung niedermolekularer Substanzen wie z.B. von ATP oder von dem proinflammatorischen Interleukin-1 $\beta$  in den extrazellulären Raum (Pelegri et al., 2006; Huang et al., 2007; Suadiciani et al., 2009).

#### **1.4 Die Entwicklung des murinen Präimplantationsembryos von der Eizelle zur Blastozyste**

Die Befruchtung der Eizelle findet normalerweise im Eileiter (Ovidukt) in der Nähe der Eierstöcke (Ovarien) statt. Von dort aus wandert die befruchtete Eizelle durch das Ovidukt zum Uterus, was drei bis vier Tage dauert. Während dieser Zeit teilt sich die Eizelle mehrfach, wobei es zu keinerlei Wachstum der Zellen kommt. Daher halbiert sich das Zytoplasma der Zellen bei jeder Teilung und die Gesamtgröße des Embryos bleibt mehr oder weniger konstant. Während des 8-Zell-Stadiums findet die Kompaktierung statt. Dabei verbindet sich der vorher lose Verbund an Zellen zu einem dicht gepackten Aggregat, in welchem die Zellen des Embryos durch Tight Junctions verbunden sind und zum ersten Mal Gap Junction-Kanäle ausgebildet werden (Houghton et al., 2002). Ab dem 16-Zell-Stadium wird der kompaktierte Embryo als Morula bezeichnet. Die inneren Zellen der Morula sind komplett von anderen Zellen umgeben und daher unpolar. Im Gegensatz dazu sind die äußeren Zellen polarisiert und besitzen eine nach außen gerichtete (apikale) sowie eine nach innen gerichtete (basale) Seite. Im nächsten Entwicklungsschritt bildet sich aus der polarisierten äußeren Zellschicht das Trophektoderm, welches den Kern aus undifferenzierten Zellen, die sogenannte Innere Zellmasse, umschließt. Im weiteren Verlauf teilen sich sowohl die Zellen der inneren als auch der äußeren Zellmasse wobei beide Populationen über die Sekretion parakriner Faktoren (z.B. FGF-4) miteinander kommunizieren. An Tag 3 der Embryonalentwicklung werden Natriumionen von Natriumkanälen durch die apikale Membran in die Trophektodermzellen geschleust und mit Hilfe von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen weiter durch die basolaterale Membran in das Innere der Morula transportiert. Dadurch wird ein osmotischer Gradient erzeugt, welcher zum Einstrom von Wasser zwischen Trophektoderm und Innere Zellmasse führt. Es entsteht ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum (Blastozoele) und man bezeichnet den Embryo nun als Blastozyste. Zu diesem Entwicklungsstadium ist der Embryo nach wie vor von der *zona pelucida*, einer Schutzhülle aus Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen, umgeben. Vor der Implantation schlüpft der Embryo aus der *zona pelucida* und kann sich nun in der Gebärmutterwand einnisten. In der Folge entsteht aus den Zellen des Trophektoderms der embryonale Teil der Plazenta, während sich aus den Zellen der inneren Zellmasse der eigentliche Embryo weiterentwickelt.



**Abb.1.2: Graphische Darstellung der Präimplantationsentwicklung.**

A: Darstellung der Embryonalentwicklung von der befruchteten Eizelle bis hin zur Blastozyste (modifiziert nach Wang und Dey, 2006). B: mikroskopische Aufnahmen der frühen Embryonalentwicklung. IZM: Innere Zellmasse, BZ: Blastozoel, TE: Trophektoderm, ZP: Zona Pelucida (modifiziert nach Braude et al., 2003).

## 1.5 Connexinexpression während der frühen Embryonalentwicklung

Während der frühen Embryonalentwicklung von Mäusen wird eine Vielzahl von Connexinisoformen exprimiert. Im 2-Zell- und 4-Zell-Stadium konnte mittels RT-PCR die Expression der Connexine Cx31, Cx43 und Cx45 nachgewiesen werden. Ab dem 8-Zell-Stadium werden zusätzlich mRNAs der Connexine Cx30.3, Cx31.1 und Cx40 ausgeprägt. RT-PCR-Analysen an Blastozysten zeigten die Transkription der bereits zuvor nachgewiesenen Connexine. Zusätzlich konnten alle sechs Connexin-mRNAs mit Polyribosomen co-sedimentiert werden, was auf eine Translation aller gefundenen Isoformen hindeutet (Davies et al., 1996). In einer weiteren Studie an Blastozysten der Maus wurden zusätzlich Transkripte der Connexine Cx30, Cx36 und Cx57 nachgewiesen (Houghton et al., 2002).

Mit Hilfe spezifischer Antikörper konnten mittels Immunfluoreszenzanalysen die Connexine Cx26, Cx31, Cx43 und Cx45 in der inneren und äußeren Zellmasse von Blastozysten der Ratte lokalisiert werden. Darüber hinaus ist die Expression der zuvor nachgewiesenen Connexine mittels Immunfluoreszenzanalysen an adhärennten Blastozysten *in vitro* untersucht worden. Dabei fanden sich Cx43 und Cx45 ausschließlich in der inneren Zellmasse, während Cx31 in den auswachsenden Trophektodermzellen lokalisiert war. Die Färbung für Cx26 zeigte die Expression des Cx26-Proteins an der Grenze zwischen der inneren Zellmasse und dem Trophektoderm, was auf die Ausprägung des Connexins im primitiven Endoderm hindeutet. Weitere RT-PCR- und Immunfluoreszenzuntersuchungen an Blastozysten der Maus zeigten, dass Cx26 hier nicht ausgeprägt ist und dass die Cx26-Expression einen Unterschied zwischen der frühen Embryogenese von Ratte und Maus darstellt (Nishi et al., 1991; Davies et al., 1996; Houghton et al., 2002).

Bei RT-PCR-Untersuchungen zur Ausprägung von Connexin-mRNAs in humanen Embryonen fand sich eine Expression der Connexine Cx26, Cx31, Cx43 und Cx45 vom 4-Zell-Stadium bis zur Blastozyste, während Cx32 und Cx40 zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden konnten (Bloor et al., 2004). Dieses Ergebnis steht in Kontrast zu Studien von Hardy et al. (1996), bei denen eine Expression des Cx32-Proteins in Trophektodermzellen später menschlicher Blastozysten nachgewiesen wurde. Das Cx43-Protein wird ab dem 4-Zell-Stadium ausgeprägt und die Expressionsstärke steigt von diesem Entwicklungszeitpunkt bis zum Blastozystenstadium kontinuierlich an. Bei der Lokalisation mittels Immunfluoreszenzanalysen in humanen Blastozysten ist das Connexin nahezu überall in den Membranen der äußeren und inneren Zellmasse als dichtes Netzwerk von Immunsignalen sichtbar. Des Weiteren konnte die Expression von Cx26 und

Cx32 im Trophektoderm später humaner Blastozysten gezeigt werden (Hardy et al., 1996). Zu allen in der inneren Zellmasse der Blastozyste exprimierten Connexinen wurden Defektmäuse erzeugt (Reaume et al., 1995; Krüger et al., 2000; Kumai et al., 2000; Plum et al., 2001). Dabei wurde jedoch in keinem Fall eine Störung der Entwicklung des Präimplantationsembryos festgestellt. Auch bei Cx31/Cx43-doppeltdefizienten Mäusen ist die Blastozystenentwicklung nicht beeinträchtigt und es zeigen sich keine zusätzlichen Phänotypen außer denen, die bereits bei Cx31- bzw. Cx43-defizienten Mäusen beobachtet wurden (Kibschull et al., 2005). Cx31/Cx45- bzw. Cx43/Cx45-doppeltdefiziente Mäuse sind bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht untersucht worden.

Im Jahr 1995 injizierten Becker und Davies Antikörper, welche gegen die zytoplasmatische Schleife von Cx43 gerichtet waren, in Zellen von Embryonen des 8- und 16-Zell-Stadiums. Daraufhin beobachteten die Autoren eine Dekompaktierung dieser Zellen und einen Ausschluss von der weiteren Embryonalentwicklung (Becker und Davies, 1995). Diese Ergebnisse stehen jedoch in Kontrast zu der Beobachtung, dass sich Cx43-defiziente Mäuse bis zum Blastozystenstadium und darüber hinaus normal entwickeln und erst spät in der Embryogenese an einem Herzfehler versterben (Reaume et al., 1995). In weiteren Studien wurden Präimplantationsembryonen *in vitro* in Gegenwart des pharmakologischen Gap Junction-Inhibitors 18-alpha-Glycyrrhetinsäure bis zum Blastozystenstadium kultiviert. Dabei zeigte sich, dass durch die Zugabe des Inhibitors der Transfer des niedermolekularen Farbstoffes Lucifer Yellow zwischen den Zellen des Embryos blockiert wurde. Dies führte jedoch zu keinerlei Beeinträchtigung der Entwicklung bis hin zum Blastozystenstadium (Vance et al., 1999).

### **1.6 Embryonale Stammzellen**

Als Stammzellen bezeichnet man in einem gewissen Maße undifferenzierte Zellen, die sich einerseits unbegrenzt teilen können und andererseits die Fähigkeit besitzen, sich in einen bzw. mehrere Zelltypen zu differenzieren. Man unterscheidet adulte und embryonale Stammzellen. Erstere finden sich in vielen adulten Geweben und können sich in einen (unipotent), in einige wenige (oligopotent) oder in mehrere nah verwandte (multipotent) Zelltypen umwandeln. Beispiele für unipotente Zellen sind die Basalzellen der Haut oder Muskelstammzellen. Unter den blutbildenden (hämatopoetischen) Stammzellen findet man sowohl multipotente als auch die aus diesen entstehenden oligopotenten myeloischen und lymphoiden Stammzellen.

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) besitzen im Gegensatz zu den adulten Stammzellen

die Fähigkeit Zellen aller drei Keimblätter (Endo-, Ecto- und Mesoderm) zu bilden und werden deshalb als pluripotent bezeichnet. ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste gewonnen. Die Blastozyste bezeichnet ein frühes Embryonalstadium (Tag 3,5 bei der Maus), in welchem der Embryo lediglich aus der inneren und der äußeren Zellmasse besteht. Die Zellen der äußeren Zellmasse (Trophektoderm) formen eine Hohlkugel, in der sich die Zellen der inneren Zellmasse befinden. Isoliert man Blastozysten aus dem Uterus schwangerer Mäuse und kultiviert diese in Schalen mit Nährmedium, schlüpfen die Embryonen nach ein bis zwei Tagen aus der sie umgebenden *zona pelucida*. In Kulturschalen, deren Boden mit einer Nährzellschicht aus mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblastenzellen bedeckt ist, können sich die Embryonen nun absetzen und anwachsen. In Zellkultur können die Zellen der inneren Zellmasse expandiert werden, wobei eine stabile Zelllinie entsteht. Diese Zellen werden als embryonale Stammzellen bezeichnet und weisen eine kleine, kugelige Zellmorphologie auf. Sie wachsen dicht gepackt in runden bis ovalen Kolonien mit scharf begrenzten Rändern.

Embryonale Mausstammzellen wurden erstmalig 1981 (Evans et al., Martin et al.) isoliert und auf einer Nährzellschicht aus inaktivierten embryonalen Mausfibroblasten kultiviert. 1988 zeigten Williams et al., dass ES-Zellen der Maus auch unabhängig von einer Nährzellschicht auf mit Gelatine beschichteten Plastikschalen kultiviert werden können. Dabei erhalten die Zellen ihren undifferenzierten, pluripotenten Charakter, sofern dem Kulturmedium das Interleukin LIF (leukemia inhibitory factor) zugesetzt wird.

### **1.7 Connexine und Gap Junctions in embryonalen Stammzellen**

Wie für die innere Zellmasse der Blastozyste beschrieben, konnte auch in embryonalen Stammzellen der Maus mRNA der Connexine Cx43 und Cx45 (Nishi et al., 1991; Oyamada et al., 1996) mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Außerdem wurde der Austausch des niedermolekularen Farbstoffes Lucifer Yellow zwischen embryonalen Stammzellen gezeigt (Oyamada et al., 1996). Eine umfassende Analyse aller bekannten Connexine auf mRNA- bzw. auf Proteinebene wurde bisher noch nicht durchgeführt und wird erstmals in der vorliegenden Dissertation beschrieben.

Während diese Arbeit erstellt wurde, erschienen zwei unabhängige Studien, die sich mit der Connexinexpression in humanen embryonalen Stammzellen befassen (Wong et al., 2005; Hüttner et al., 2006). Wong und Mitarbeiter führten zwar keine vollständige Analyse aller Connexine durch, konnten aber die in ES-Zellen der Maus sowie die in humanen

Blastozysten beschriebenen Connexine Cx43 und Cx45 als mRNA und als Protein in den Zellmembranen nachweisen und demonstrierten darüber hinaus den Transfer von Lucifer Yellow in benachbarte Zellen. Hüttner et al. untersuchten die Expression der bekannten Connexinisoformen mittels RT-PCR und wiesen dabei die Transkription aller Connexine außer Cx40.1 und Cx50 in humanen ES-Zellen nach. Zudem zeigten sie mittels Immunfluoreszenzanalysen die Ausprägung der Connexinproteine Cx40, Cx43 und Cx45.

### **1.8 Postimplantationsentwicklung bis zur Gastrulation**

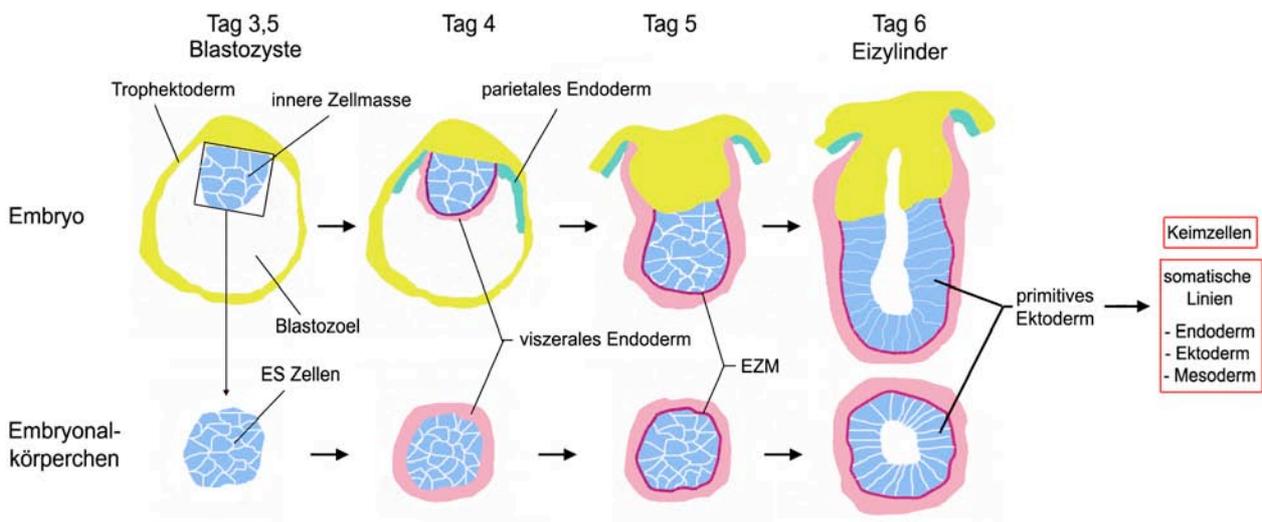
Während des späten Blastozystenstadiums teilt sich die innere Zellmasse in den Epiblasten und das primitive Endoderm. Das primitive Endoderm spaltet sich im weiteren Verlauf der Embryogenese in zwei Zellpopulationen auf, in das sogenannte viszerale Endoderm und das parietale Endoderm. Das parietale Endoderm kleidet den Trophoblasten aus und bildet eine Struktur, die als Dottersack bezeichnet wird. Das viszerale Endoderm umhüllt den Epiblasten zum Dottersack hin und sezerniert eine extrazelluläre Matrix zwischen Epiblast und viszeralem Endoderm. Die Zellen die direkten Kontakt zu dieser Matrix haben, organisieren sich zu einem Säulenepithel, dem primitiven Ektoderm. Die unpolaren Zellen im Inneren des Epiblasten durchlaufen den apoptotischen Zelltod und es entsteht eine Höhlung die als proamniotische Höhle bezeichnet wird. Bei der nun folgenden Gastrulation entsteht mittels epithelial-mesenchymaler Transition das embryonale Meso- und Endoderm aus Teilen des primitiven Ektoderms. Aus dem verbleibenden Rest geht das Ektoderm hervor. Somit sind nach der Gastrulation alle drei Keimblätter (Ektoderm, Endoderm und Mesoderm) des Embryos angelegt.

### **1.9 *In vitro* Differenzierung embryonaler Stammzellen in Embryonalkörperchen**

Embryonale Stammzellen besitzen das Potential sich in alle Zelltypen des Körpers zu differenzieren. Werden beispielsweise murine embryonale Stammzellen mittels einer Mikropipette in Blastozysten injiziert, integrieren sich diese in die innere Zellmasse des Empfängerembryos. Pflanzte man nun die Blastozysten in scheinchwangere Leihmütter ein, so können die injizierten ES-Zellen in der weiteren Embryogenese zur Entwicklung aller Gewebe des Körpers beitragen. Es entstehen sogenannte chimäre Mäuse, deren Organismus aus Zellen zweier Individuen aufgebaut ist (Gossler et al., 1992).

Um ES-Zellen *in vitro* in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, bedient man sich des Differenzierungssystems der Embryonalkörperchen (engl.: embryoid bodies). Dabei

handelt es sich um Aggregate von ES-Zellen, die sich bei der Kultur von embryonalen Stammzellen in Suspension spontan bilden. Die Zellaggregate ähneln der inneren Zellmasse der Blastozyste und durchlaufen in den folgenden Tagen in Suspensionskultur eine in einigen Punkten vergleichbare Entwicklung. Im ersten Differenzierungsschritt entwickelt sich aus den äußeren Zellen des Embryonalkörperchens eine Zellpopulation welche als viszerales Endoderm bezeichnet wird. Diese Zellschicht sezerniert eine extrazelluläre Matrix. Im weiteren Verlauf kommt es zum apoptotischen Zelltod der Zellen im Inneren des Embryonalkörperchens. Lediglich die Zellen, die direkten Kontakt zur extrazellulären Matrix haben überleben und säumen als Säulenepithel die entstandene Höhlung (Coucouvanis und Martin, 1995). Diese Zellpopulation wird als primitives Ektoderm bezeichnet. Gesteuert und koordiniert wird die Hohlraumbildung (Kavitation) von BMP2 und BMP4 Signalen sowie über die Interaktion der Zellen mit der extrazellulären Matrix (Coucouvanis und Martin, 1999). Nach weiteren Tagen lösen sich Teile des primitiven Ektoderms in einer epithelial-mesenchymalen Transition aus dem Epithelverband, migrieren in den Raum zwischen primitivem Ektoderm und primitivem Endoderm und bilden ein mesenchymales Gewebe. Aus diesem Mesenchym gehen später mesodermale und endodermale Zellen hervor (Viehbahn, 1995; Fujiwara et al., 2007). Aus den Resten des primitiven Ektoderms entwickelt sich das Ektoderm. Damit sind alle drei Keimblätter im Embryonalkörperchen angelegt. Diese Differenzierungsprozesse rekapitulieren in gewisser Weise die in Kapitel 1.8 beschriebene natürliche Entwicklung im Embryo, bei der während der Gastrulation ebenfalls alle drei Keimblätter angelegt werden und sich eine zentrale Höhlung (Amnionhöhle) bildet.



**Abb.1.3: Vergleichende schematische Darstellung der Entwicklung des Embryos von der Blastozyste bis zum Eizylinder *in vivo* bzw. eines Embryonalkörperchens in Suspensionskultur *in vitro*. EZM = extrazelluläre Matrix.**

### 1.10 Funktion von Connexinen in ES-Zellen und während der ES-Zelldifferenzierung

Die erste Studie zur Funktion von Connexinen in embryonalen Stammzellen wurde 1991 von Sheardown und Hooper publiziert. Die Autoren stellten kopplungsdefiziente ES-Zellen mittels genereller Mutagenese und anschließender „kiss of death“ Selektion her und ließen diese ES-Zellen zu Embryonalkörperchen aggregieren. Während sich die Kontrollzellen in zystische Embryonalkörperchen entwickelten und im Inneren diverse Höhlungen aufwiesen (Kavitation), konnte bei den kopplungsdefizienten Zellen auch nach langer Kultur von bis zu 24 Tagen keine Differenzierung in zystische Embryonalkörperchen festgestellt werden. Ebenfalls war so gut wie keine Ausbildung von Höhlungen zu beobachten. Die Autoren interpretierten ihre Ergebnisse dahingehend, dass es aufgrund der fehlenden Zell-Zell-Kommunikation zu einem Defekt in der Entwicklung des viszeralen Endoderms kommt. Dies verhindert eine weitere Differenzierung der Zellen innerhalb des Embryonalkörperchens, da von der Schicht viszeralen Endoderms, welche das Embryonalkörperchen im Normalfall umgibt, die weiteren Differenzierungssignale ausgehen (Sheardown und Hooper, 1991).

Eine weitere Studie wurde von Wong et al. (2006) veröffentlicht. Darin zeigten die Autoren, dass eine Blockade der Gap Junction-vermittelten Zell-Zell-Kopplung mittels des pharmakologischen Gap Junction-Inhibitors 18-alpha-Glycyrrhetinsäure sowohl zu einer

verminderten Proliferationsrate, als auch zu einer Erhöhung der Apoptoserate in humanen ES-Zellen führt.

Todorova et al. (2008) reduzierten die Cx43-Expression in murinen ES-Zellen mittels siRNA (knockdown) auf zehn Prozent, was zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsrate der ES-Zellen führte. Zusätzlich zeigte sich in Cx43-knockdown ES-Zellen eine verminderte Expression der Stammzellmarker Oct4 und Nanog. Darüber hinaus waren die Zellen nicht in der Lage, Embryonalkörperchen zu bilden. Die Ergebnisse dieser Studie stehen jedoch in Kontrast zu Studien an Cx43 defizienten ES-Zellen, welche in gleichem Maße wie Wildtypzellen zu Embryonalkörperchen aggregieren und in schlagende Kardiomyozyten differenzieren. (Reaume et al., 1996; Banach et al., 2003).

Parekkadan und Mitarbeiter (2008) untersuchten die neuronale Differenzierung von Cx43 defizienten ES-Zellen der Maus an einem speziell entwickelten System, in welchem Zellpaare aus einer bereits differenzierten, Nestin-positiven Zelle und einer undifferenzierten, Cx43-defizienten ES-Zelle untersucht wurden. Im Vergleich mit Wildtyp-Zellen fanden die Autoren einen Anstieg der Differenzierung in Astrozyten und einen kompletten Defekt der Differenzierung in Oligodendrozyten.

Studien zur Differenzierung von Cx43 bzw. Cx45 defizienten ES-Zellen in Kardiomyozyten zeigten keine augenscheinlichen Unterschiede im Vergleich zu den verwendeten Kontrollzellen (Reaume et al., 1996; Banach et al., 2003; Egashira et al., 2004). Eine Überexpression von Cx43 in humanen embryonalen Stammzellen mittels lentiviral eingebrachter Konstrukte führte hingegen dazu, dass aus den infizierten Zellen keine Herzmuskelzellen mehr erzeugt werden konnten (Moore et al., 2008).

### **1.11 Apoptose**

Multizellulären Organismen steht ein aktives, molekulares Programm zur Verfügung um beschädigte, überflüssige oder potentiell gefährliche Zellen zu entfernen: der programmierte Zelltod, die sogenannte Apoptose (Kerr et al., 1972).

Morphologisch durchlaufen apoptotische Zellen mehrere Stadien. Zuerst schrumpfen Zelle und Zellkern, danach kommt es zu Ausstülpungen der Zellmembran (membrane blebbing) und zur Kondensation des Chromatins. Im weiteren Verlauf des Zelltodes findet eine enzymatische Fragmentierung des Genoms, sowie die Ausbildung apoptotischer Körper statt. Diese „apoptotic bodies“ sind membranumschlossene Vesikel, die sich von der sterbenden Zelle abschnüren (Wyllie et al. 1980). *In vivo* werden die apoptotischen

Körperchen von phagozytierenden Zellen aufgenommen und somit ohne lokale Entzündungsreaktionen aus dem Gewebe eliminiert. Somit stellt die Apoptose im Gegensatz zur Nekrose eine kontrollierte, aktiv eingeleitete Form des Zelltodes dar, bei der ein Schaden an den umliegenden Zellen minimiert wird.

Die Schlüsselenzyme der Apoptose sind die Caspasen (Earnshaw et al., 1999). Caspasen sind proteolytische Enzyme, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat hydrolysieren (Cysteiny-Aspartasen) (Thornberry et al., 1998). Die Enzyme kommen in den Zellen als Zymogene (Procaspasen) vor und werden durch proteolytische Abspaltung einer regulatorischen Untereinheit aktiviert. Nun können die Caspasen autokatalytisch weitere Procaspasen spalten. Während der Apoptose kommt es zuerst zu einer Aktivierung von Aktivatorcaspasen wie Caspase 8 oder 9. Diese Caspasen aktivieren daraufhin die Effektorcaspasen (z.B. Caspase 3, 6 und 7). Im weiteren Verlauf der Apoptose vermitteln die Effektorcaspasen den Abbau zellulärer Strukturen und aktivieren weitere proapoptotische Enzyme. Caspasesubstrate sind unter anderem Aktin, Lamin, Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) und die DNA-Leiter-Nuklease. Es wurden bereits über hundert Caspasesubstrate beschrieben (Earnshaw et al., 1999; Nicholson et al., 1999).

Auslöser der Apoptose sind Todessignale. Solche Reize sind unter anderem der Entzug von Wachstumsfaktoren, von Zell-Zell-Kontakten oder von Hormonen. Außerdem führen Schädigungen der DNA, Störungen des Zellzyklus, zytotoxische T-Zellen sowie Schadstoffe zur Initiation des programmierten Zelltodes. Ein weiterer Weg zur Einleitung apoptotischer Prozesse ist die Stimulation von Todesrezeptoren.

Zwei Möglichkeiten der Initiation von Apoptose sind ausführlich in der Literatur beschrieben: der Todesrezeptorweg und der mitochondrialen Weg. Todesrezeptoren sind Transmembranproteine bestehend aus sechs antiparallelen, amphipathischen  $\alpha$ -Helizes (Huang et al., 1996). Die Bindung von Liganden wie Apo, Fas oder TNF an diese Rezeptoren führt zur Bildung eines Signalkomplexes, der das Adapterprotein FADD (Fas associated death domain) rekrutiert (Eberstadt et al., 1998). In der Folge kommt es zur Anlagerung mehrerer Procaspase-8-Moleküle, welche über induzierte Nähe autokatalytisch in die aktive Initiator-Caspase-8 überführt werden. Im weiteren Verlauf aktiviert die Caspase-8 die Procaspase-3. Die Effektor-Caspase-3 letztlich spaltet eine Reihe von Substraten bzw. aktiviert weitere Effektor-Caspasen wie z.B. Caspase-6 und -7 (Hengartner, 2000).

Der mitochondriale Apoptoseweg wird durch extrazelluläre Signale, als auch durch intrazelluläre Defekte z.B. durch DNA-Schädigungen ausgelöst. Daraufhin werden

proapoptotische Faktoren der Bcl2-Familie wie z.B. Bax, Bam, Bad oder Bid aktiviert, welche in ihrer inaktiven Form zytoplasmatisch vorliegen (Li et al., 1998; Wolter et al., 1997; Puthalakath et al. 1999; Gross et al., 1999). Dephosphorylierung, proteolytische Spaltung und andere Mechanismen aktivieren die proapoptotischen Faktoren, welche daraufhin zur mitochondrialen Membran dirigiert werden (Adams et al., 1998; Antonsson et al., 2000).

Proapoptotische und antiapoptotische Mitglieder der Bcl2-Familie treffen nun an der mitochondrialen Membran zusammen. Überwiegen proapoptotische Faktoren kommt es zu einem Ausstrom von Zytocrom-c aus den Mitochondrien. Dies initiiert die Bildung eines Komplexes aus Apaf-1 (apoptosis protease activating factor 1), Zytocrom-c und Procaspase-9, der als Apoptosom bezeichnet wird. Die Procaspase-9 wiederum spaltet nun Procaspase-3 und es entsteht die katalytisch aktive Effektorcaspase-3, welche wie bereits beschrieben eine Reihe von Substraten spaltet, was letztendlich zur Demontage der apoptotischen Zelle führt (Hengartner, 2000).

### 1.12 Das Cre/loxP-Rekombinationssystem

Die Cre (**causes recombination**)-Rekombinase ist ein Protein aus dem Bakteriophagen P1 und gehört zur Familie der Tyrosin-Rekombinasen (Nunes-Düby et al., 1998). Diese Klasse von Enzymen katalysiert das Schneiden und Verknüpfen von DNA-Molekülen an spezifischen Erkennungsstellen. Dabei vermittelt die Cre-Rekombinase einen nukleophilen Angriff auf das Phosphodiester-Rückgrat über eine Tyrosin-Hydroxylgruppe, wobei ein kovalent verknüpftes DNA-Protein-Zwischenprodukt entsteht (Grindley et al., 2006). Die Cre-Rekombinase reagiert mit spezifischen Erkennungssequenzen, den loxP (**l**ocus of **c**rossing („**X**“) **o**ver of **P**1)-Stellen. Diese 34 bp langen Basenabfolgen bestehen aus einer 8 bp langen Kernsequenz, die von zwei 13 bp langen palindromischen DNA-Abschnitten flankiert wird (Abremski et al., 1986). Die Cre-Rekombinase vermittelt die Deletion oder Inversion von DNA-Abschnitten, die von zwei loxP-Stellen flankiert vorliegen. Dabei hängt das Ergebnis der Reaktion von der Ausrichtung der Erkennungsstellen zueinander ab. Diese wird wiederum von der Richtung der Kernsequenz bestimmt. Eine gleiche Orientierung führt zur Deletion, eine gegenläufige Orientierung zur Inversion des flankierten DNA-Bereiches (Hoess et al., 1986).

In der Molekularbiologie wird das Cre/loxP-System als Werkzeug zum gezielten Ausschneiden bestimmter DNA-Sequenzen aus dem Genom verwendet. Mittels genetischer Manipulation werden dazu zuerst loxP-Stellen in das Genom der zu

untersuchenden Zellen bzw. Tiere eingeführt. Anschließend wird die Deletion der markierten DNA-Abschnitte induziert. In Zellen kann dies beispielsweise durch die Transfektion von Plasmiden, welche die Cre-Rekombinase kodieren, geschehen. Transgene Mäuse werden mit anderen Mauslinien gekreuzt, die das Cre-Protein unter der Kontrolle eines gewebespezifischen, bzw. induzierbaren Promotors exprimieren (Plück et al., 1996). Im Mausmodell kann somit ein embryonal letaler Phänotyp umgangen bzw. die Funktion eines Gens nur in bestimmten Zelltypen oder zu einem genau definierten Entwicklungsstadium untersucht werden. In Zellen ermöglicht das System eine gezielte und zeitlich genau definierte Deletion von Genen.

### 1.13 Transduzierbare Proteine

Für die meisten Moleküle, die größer als 500 Da sind, stellt die Plasmamembran von eukaryotischen Zellen eine effektive Barriere dar. Im Normalfall ist deshalb eine Aufnahme von Proteinen in die Zelle nur über aktive Prozesse, wie z.B. die rezeptorvermittelte Endozytose bzw. eine Aufnahme durch Transportproteine, möglich und wird so von der Zelle gezielt kontrolliert. Darüber hinaus findet man jedoch auch virale und bakterielle Proteine, welche die Zellmembran durchdringen können. Beispiele hierfür sind das Herpes Virus 22 Protein (VP22) sowie das HIV Protein TAT (**T**rans-**A**ctivator of **T**ranscription) (Efthymiadis et al., 1997; Phelan et al., 1998). Das TAT-Protein wird vom HI-Virus kodiert und kontrolliert als Transaktivator die Transkription des HIV-Genoms (Cullen et al., 1990). Des Weiteren wird TAT von den infizierten Zellen sezerniert und ist im Blut von mit HIV infizierten Patienten nachweisbar. Von dort aus kann TAT in andere Zellen des Körpers eindringen und wirkt beispielsweise in nicht infizierten T-Zellen als proapoptotisches Protein, was zum Fortschreiten der AIDS (**A**cquired **I**mmuno**D**eficiency **S**yndrome)-Erkrankung beiträgt (Campbell et al., 2004). Der genaue, molekulare Mechanismus für die Aufnahme des TAT-Proteins ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Möglicherweise erfolgt die Einschleusung in die Zelle über Makropinozytose, eine spezielle Form der Endozytose. Dabei bindet TAT an die Zellmembran, wird in Makropinosomen aufgenommen, entkommt der endosomalen Degradation und gelangt so in das Zytoplasma. Die genauen molekularen Abläufe sind dabei jedoch weitestgehend unbekannt und Gegenstand der derzeitigen Forschung (Gump und Dowdy, 2007). Darüberhinaus wird ein direkter Durchtritt des TAT-Proteins durch die Membran diskutiert (Nagahara et al., 1998). Verantwortlich für die Bindung an die Zellmembran der Zielzellen ist die TAT-Proteintransduktionsdomäne (PTD). Diese besteht aus den Aminosäureresten 48-57 des

Proteins und ist reich an den basischen Bausteinen Arginin und Lysin. Fusioniert man die PTD-Sequenz mit anderen Peptiden oder Proteinen, können diese ebenfalls die Plasmamembran von Zellen durchdringen. Somit ist die HIV-TAT-PTD neben anderen zellpenetrierenden Peptiden (CPP) ein wirkungsvolles Werkzeug um Peptide, Proteine oder andere Moleküle in lebende Zellen einzuschleusen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fusionsprotein aus der HIV-TAT-PTD, der Cre-Rekombinase sowie einer Kernlokalisationssequenz (NLS) verwendet, um DNA-Sequenzen, die von loxP-Stellen flankiert sind, aus dem Genom embryonaler Stammzellen zu deletieren (Peitz et al., 2002). Die Transduktionsdomäne vermittelt dabei die Aufnahme des Proteins in die Zelle. Mit Hilfe der Kernlokalisationssequenz wird die Cre-Rekombinase aus dem Zytoplasma in den Nukleus transportiert und entfaltet dort ihre enzymatische Aktivität.



**Abb.1.4: Schematische Darstellung der transduzierbaren Cre-Rekombinase.** H6: His-Tag zur Aufreinigung des Fusionsproteins aus E.coli; TAT: Proteintransduktionsdomäne des HIV-TAT; NLS: Kernlokalisationssequenz; Cre: Cre-Protein aus dem Bakteriophagen P1. (Nolden et al., 2006)

### **1.14 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Während der Präimplantationsentwicklung des Embryos wird eine Vielzahl an Connexinisoformen exprimiert (Houghton et al., 2002). Die Funktion der Connexine bzw. von Gap Junction-Kanälen während der frühen Embryonalentwicklung ist jedoch weitestgehend unbekannt. Embryonale Stammzellen, gewonnen aus der inneren Zellmasse der Blastozyste, stellen eine Momentaufnahme des Präimplantationsembryos an Tag 3,5 der Entwicklung dar. Die Zellen können durch die Wahl geeigneter Kulturbedingungen nahezu unbegrenzt vervielfältigt werden, wobei sie ihren pluripotenten Charakter erhalten. Darüberhinaus lassen sie sich gezielt in verschiedene Zelltypen differenzieren. Somit sind ES-Zellen ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung der Expression und der Funktion von Connexinen während diesem Embryonalstadium.

Die vorliegende Dissertation knüpft an die Ergebnisse meiner Diplomarbeit an, welche im Jahr 2005 am Institut für Genetik in Bonn angefertigt wurde. Ziel der Arbeit war die vollständige Charakterisierung der Connexinexpression in HM1 ES-Zellen. Diese wurde im Zuge der Erstellung dieser Dissertation um Cx23 ergänzt und um die Untersuchung der drei bekannten Pannexinisoformen erweitert. Während der Diplomarbeit wurde bereits mit der Untersuchung der Funktion Gap Junction-vermittelter Kommunikation in ES-Zellen begonnen. Zu diesem Zweck wurden HM1 Zellen mit den pharmakologischen Gap Junction-Inhibitoren 18-alpha-Glycyrrhetinsäure und Carbenoxolon behandelt. Dies führte zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate. Der Einfluss von Connexinen und Gap Junction-vermittelter Kommunikation auf Tod und Überleben von Zellen wird schon seit einigen Jahren in der Literatur diskutiert. In zahlreichen Studien konnte dabei in Abhängigkeit vom Zelltyp bzw. dem zellulären Kontext sowohl ein pro- als auch ein antiapoptotischer Effekt gezeigt werden (zusammengefasst von Krysko et al., 2005). Somit erschien auch ein Gap Junction-vermittelter antiapoptotischer Effekt in ES-Zellen plausibel. Dennoch gab es einige Vorbehalte bezüglich der Spezifität der verwendeten Gap Junction-Inhibitoren bzw. deren zytotoxischen Nebeneffekten. Ziel dieser Dissertation war es nun, die mittels pharmakologischer Gap Junction-Inhibitoren erzielten Ergebnisse mit genetischen Methoden zu reproduzieren. Darüberhinaus sollten Cx43/Cx45 doppeldefiziente ES-Zellen hergestellt und charakterisiert werden, um die Funktion von Connexinen und Gap Junction-vermittelter Kommunikation in embryonalen Stammzellen sowie während der ES-Zelldifferenzierung aufzuklären und die Ausprägung von Connexinen während der frühen Embryonalentwicklung verstehen zu können.

## 2. Material

### 2.1 Verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz
HeLa	Kopplungsdefiziente Zelllinie aus tumorigenen, aneuploiden Epithelzellen eines humanen Zervixkarzinoms. Neben HeLa Wildtypzellen wurden HeLa Zellen verwendet, welche stabil mit Plasmiden für die Expression der Connexine mCx26, mCx31, mCx32, mCx37, mCx43 und mCx45 sowie für das Pannexin mPanx1 transfiziert wurden.	Jones et al., 1971; Elfgang et al., 1995; Volker Wulf (Diplomarbeit 2006 am Institut für Genetik in Bonn)
HM1	Aus Sv129/Ola Blastozysten isolierte murine embryonale Stammzelllinie, die sich ohne Nährzellen auf Gelatine beschichteten Plastikschalen kultivieren lässt.	Magin et al., 1992
Cx43floxHPRT	HM1-Zellen, in denen Cx43 auf einem Allel durch eine induzierbare Cre-Rekombinase ersetzt ist. Auf dem anderen Allel liegt Cx43 flankiert von loxP-Stellen vor. Der Cx43-Sequenz folgt eine Neomycin-Selektionskassette, welche ebenfalls von loxP-Stellen flankiert ist sowie ein lacZ- Reporter gen.	Dominik Eckardt (Dissertation 2004 am Institut für Genetik in Bonn)
Cx43delHPRT	Cx43floxHPRT-Zellen, in denen Cx43 mittels einer transduzierbaren Cre-Rekombinase (HTN-Cre) deletiert wurde.	In der vorliegenden Dissertation erzeugt und erstmals beschrieben.
Cx43/Cx45flox	Aus Blastozysten transgener C57BL/6-Mäuse isolierte embryonale Stammzelllinie. In den Zellen liegen Cx43 und Cx45 homozygot von loxP-Stellen flankiert vor.	In der vorliegenden Dissertation isoliert und erstmals beschrieben.
Cx43/Cx45del	Cx43/Cx45flox Zellen, in denen Cx43 und Cx45 homozygot mittels einer transduzierbaren Cre-Rekombinase (HTN-Cre) deletiert wurden.	In der vorliegenden Dissertation erzeugt und erstmals beschrieben.

## 2.2 Allgemeine Labormaterialien und Geräte

Materialien	Hersteller
Objektträger und Deckgläschen	Marienfeld, Menzel-Gläser
Hybond-ECL-Nitrozellulosemembran	GE-Healthcare
Pipettenspitzen	Eppendorf
Reagenzgefäße	Falcon
Sterile Plastikware für die Zellkultur	Falcon, Sarstedt, Nunc, Becton, Dickinson
Röntgenfilm Fuji Medical X-ray Super RX	Fujifilm
Chemilumineszenzsubstrat Supersignal West Pico	Thermo Scientific
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific
Permafluor Eindeckmedium	Thermo Scientific
Whatman 3mm Papier GB002	Schleicher & Schüll
Sterilfilter 0,2 µm	Schleicher & Schüll
Fluoreszierender Kernfarbstoff Syto	Invitrogen
Taq-Polymerase GoTaq M830B und zugehörige Puffer	Promega
Tissue-Tek Einbettungsmedium	Sakura
Glaskapillaren GB100F-8P zur Herstellung von Iontophoresekapillaren	Science Products GmbH
AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit	Calbiochem
HistoGreen POD Peroxidase Substrate Kit	Linaris

Geräte	Hersteller
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Paraffin-Gewebeinfiltrationsautomat TP1020	Leica
Paraffin-Gießstation EG1140H	Leica
Rotationsmikrotom HM360	Leica
Binokular MS5	Leica
ELMA und Ultraschallspitze Sonifer B-12	Branson
Feinwaage Kern ABS	Kern & Sohn GmbH
Fluorometer Genios	Tecan
Heizblock DRI-Block DB3	Techne
Heizgerät TRZ 3700 (Mikroinjektion)	Zeiss
Inkubatoren für die eukaryotische Zellkultur mit CO <sub>2</sub> -Regulation	Heraeus
Kapillarenzieher horizontal P-97	Sutter Instruments
Kolbenhubpipette Pipetman (20, 200, 1000 µl)	Gilson
Kryostat HM500OM	Microm
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf
Kühlzentrifuge J2-21 mit Rotor JA20	Beckman
Kühlzentrifuge Multifuge primoR	Heraeus
Magnetrührer MR 2002	Heidolph
Mikromanipulator	Eppendorf
Mikroskop IM 35	Zeiss
Mikroskop LSM 510	Zeiss
Mikroskop mit Epifluoreszenz, Axiophot	Zeiss

## Material

Mikrowelle MW 800	Continent
PCR-Maschine PTC-200	Biozym
PCR-Maschine PTC-100	Biozym
PCR-Maschine Primus 96 plus	MWG AG Biotech
Peristaltische Pumpe P-1	Amersham
Pipettierhilfe vac-petus	Faust
Spannungsgerät Bio-Rad 1000/500	Bio-Rad
Spannungsgerät LKB GPS 200/400	Pharmacia
Spektralphotometer DU 640	Beckmann
Ultraschallbad Transsonic T460	Elma
UV-Transilluminator Image Master VDS	Pharmacia Biotech
Wasserbad E100	Lauda
Wasserbad Shake Temp SW21	Julabo

### 2.3 Verwendete Oligonukleotid Startermoleküle für die Polymerase Kettenreaktion

Name	Startermolekülsequenz	Referenz
mCx26 USP	5´-CGGAAGTTCATGAAGGGAGAGAT-3´	Davies et al.,1996
mCx26 DSP	5´-GGTCTTTTGGACTTTCCTGAGCA-3´	Davies et al.,1996
mCx29USP	5´-GGGGTACCGACCACCATGTGCGGCAGGTTCC-3´	von Maltzahn et al., 2004
mCx29 DSP	5´-GCAGGATCCTCAAAATGGCTCTTTTGC-3´	von Maltzahn et al., 2004
mCx30 USP	5´-GTCATCGGTGGCGTGAACAAGCAC-3´	Davies et al.,1996
mCx30 DSP	5´-GAGCAGCATGCAAATCACGGATGC-3´	Davies et al.,1996
mCx30.2 USP	5´-CCGCTCGAGCGGCCACCATGGGGGAGTGGGC-3´	von Maltzahn et al.
mCx30.2 DSP	5´-GGAATTCCTTAGATGGCCAGGTCTGGCG-3´	von Maltzahn et al.
mCx30.3 USP	5´-TCAAACATGGGCCCAATG-3´	Davies et al.,1996
mCx30.3 DSP	5´-GGGAGTCACAGAGCAAGC-3´	Davies et al.,1996
mCx31 USP	5´-AGAAGCACGGGGAGCAAT-3´	Davies et al.,1996
mCx31 DSP	5´-TACTATGCTGGCGCACTG-3´	Davies et al.,1996
mCx31.1 USP	5´-ATATACCCTCCCTTCTATGGT-3´	Davies et al.,1996
mCx31.1 DSP	5´-TCACAGAATGGTTTTCTTCAC-3´	Davies et al.,1996
mCx32 USP	5´-CTGCTCTACCCCGGCTATGC-3´	Davies et al.,1996
mCx32 DSP	5´-CAGGCTGAGCATCGGTCGCTCTT-3´	Davies et al.,1996
mCx33 USP	5´-CTAGAAAAGGTTCAACCCTAC-3´	von Maltzahn et al., 2004
mCx33 DSP	5´-TAGAACAGCTGGATGACATTC-3´	von Maltzahn et al., 2004
mCx36 USP	5´-TGCAGCAGCACTCCACTATGATTG-3´	Söhl et.al.,1998
mCx36 DSP	5´-CATAGGCGGAGTCACTGGACTGAG-3´	Söhl et al.,1998
mCx37 USP	5´-GGCTGGACCATGGAGCCGGT-3´	Davies et al.,1996
mCx37 DSP	5´-TTTCGGCCACCCTGGGGAGC-3´	Davies et al.,1996
mCx40 USP	5´-CTGTCCCCACCCAGTCAACT-3´	Davies et al.,1996

## Material

mCx40 DSP	5´-CCGTTTGTCACTATGGTAGC-3´	Davies et al.,1996
mCx39N-Term	5´-CCGCTCGAGCGGCCACCATGGAGAAGTTGAACTTGTGGG ATTCCTCATCATCACCTTAAACTGTAACGTGACCATCATGGGC ATGATCTGGCTGATCGTGGAG-3´	von Maltzahn et al., 2004
mCx39KXhol	5´-CCGCTCGAGCGGCCACCATGGAGAAGTTGAACTTGTG- 3´	von Maltzahn et al., 2004
mCx43 USP	5´-TACCACGCCACCACCGGCCCA-3´	Davies et al.,1996
mCx43 DSP	5´-GGCATT TGGCTGTCGTCAGGGAA-3´	Davies et al.,1996
mCx45 USP	5´-TTCCAAGTCCACCCATTTTAT-3´	Davies et al.,1996
mCx45 DSP	5´-ATCGTTCCTGAGCCATTCTGA-3´	Davies et al.,1996
mCx46 USP	5´-GGAAAGGCCACAGGGTTTCTCGG-3´	Davies et al.,1996
mCx46 DSP	5´-GGGTCCAGGAGGACCAACGG-3´	Davies et al.,1996
mCx47 USP	5´-AAGACGGTGGTCACTCCTGG-3´	Teubner et al.,2000
mCx47 DSP	5´-GCACAGCATCCTGCGCACTG-3´	Teubner et al.,2000
mCx50 USP	5´-CATCCTGCCCTCTATC-3´	Davies et al.,1996
mCx50 DSP	5´-CTCTTCCCCTCCACTT-3´	Davies et al.,1996
mCx57 USP	5´-TTCCATTCAACAACTACTCAGG-3´	von Maltzahn et al., 2004
mCx57 DSP	5´-ATACACATATACATATGTCTCATG-3´	von Maltzahn et al., 2004
β-Aktin USP	5´-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCAG-3´	De Sousa et al.,1993
β-Aktin DSP	5´-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3´	De Sousa et al.,1993
mPanx1-USP	5´-TTGACCATGGCCATCGCCCACTTGG-3´	Wörsdörfer et al., 2007
mPanx1-DSP2	5´-CTACAGATCCAACAGGGGTGCGTC-3´	Wörsdörfer et al., 2007
mPanx2-USP	5´-AGTCGGCGGACATGGCGACC-3´	Wörsdörfer et al., 2007
mPanx2-DSP1	5´-TCCGGCTCAGGATGGTGAGAGGG-3´	Wörsdörfer et al., 2007
mPanx3-USP	5´-ATTCTCAGCAGCATCATGTGCG-3´	Wörsdörfer et al., 2007
mPanx3-DSP1	5´-TTCAAAGTACCGTTCCTTCC-3´	Wörsdörfer et al., 2007
UMPR	5´-TCACCCCAAGCTGACTCA ACCG-3´	Eckardt (Doktorarbeit), 2004
43delforw	5´-GGCATA CAG ACCCTTGGACTCC-3´	Eckardt (Doktorarbeit), 2004
43delrev	5´-TGCGGGCCTCTTCGCTATTACG-5´	Eckardt (Doktorarbeit), 2004
tk-forw	3´-CGGCTCCATACCGACGATATGC-5´	Eckardt (Doktorarbeit), 2004
43twoloxforw	3´-CTCCAGCCCTTAGCTATCGTGG-5´	Eckardt (Doktorarbeit), 2004
Neorev	3´-GCCCAGTCATAGCCGAATAGCC-5´	nicht publiziert
15Ffor	3´-GGATTAAAGGCATGTGTCACCACTCTTGGC-5´	Maxeiner (Doktorarbeit), 2005
13Frev	3´-CTCTAGGAACACTGTAACCTGAGATGTCCC-5´	Maxeiner (Doktorarbeit), 2005
IIPx3rev	3´-AAGAACGGCCACAACCTCTGGTAACAGGAAG-5´	Maxeiner (Doktorarbeit), 2005
SRYfor	5´-AAGCGCCCCATGAATGCATT-3´	Han et al., 1993
SRYrev	5´-TCCCAGCTGCTTGCTGATCT-3´	Han et al., 1993

## 2.4 Verwendete Antikörper

### 2.4.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung (IF)	Verdünnung (IB)
mCx26 monoklonal Maus	Zymed (13-8100)	1:400	1:750
mCx31 polyklonal Kaninchen	Biotrend (Cx31-A)	1:100	1:2000
mCx32 monoklonal Maus	Zymed (35-8900)	1:100	1:500
mCx37 polyklonal Kaninchen	Simon et al., 2006	1:50	1:500
mCx43 polyklonal Kaninchen	Christian Schlieker (Diplomarbeit 2000)	1:400	1:1500
mCx45 monoklonal Maus	Chemicon (MAB 3101)	1:250	1:500
Panx1 polyklonal Kaninchen	Invitrogen (48-8000)	-	1:500
PARP polyklonal Kaninchen	New England Bioloabs (9542)	-	1:1000
gespaltene Caspase-3 polyklonal Kaninchen	New England Biolabs	-	1:500
Oct4 monoklonal Maus	Santa Cruz (SC 5279)	1:400	1:1000
Laminin monoklonal Ratte	Chemicon (MAB 1914)	1:500	-
AFP monoklonal Maus	R&D Bioscience (MAB 1368)	1:500	-
$\beta$ -Tubulin III monoklonal Maus	Chemicon (MAB 3408)	1:500	-
GFAP monoklonal Maus	Sigma (C 9205)	1:1000	-
$\alpha$ -Aktinin monoklonal Maus	Sigma (A 7811)	1:1000	-
$\beta$ -Gal polyklonal Kaninchen	ICN Biomedicals (55976)	1:1000	1:1000
eGFP polyklonal Kaninchen	Abcam (ab290)	-	1:1000

## 2.4.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung (IF)	Verdünnung (IB)
Peroxydase Ziege anti Kaninchen	Dianova (115-035-114)	-	1:20000
Peroxydase Ziege anti Maus	Dianova (115-035-146)	-	1:20000
Alexa Fluor 488 Ziege anti Kaninchen	MobiTec (A-11008)	1:1000	-
Alexa Fluor 488 Ziege anti Maus	MobiTec (A-11029)	1:1000	-
Alexa Fluor 594 Ziege anti Kaninchen	MobiTec (A-11037)	1:1000	-
Alexa Fluor 594 Ziege anti Maus	MobiTec (A-11005)	1:1000	-
Cy3 Ziege anti Ratte	Dianova (112-165-102)	1:1000	-

## 2.5 Lösungen und Medien

Alle Medien für die Zellkultur werden in doppelt destilliertem Wasser angesetzt. Die Sterilisation der Medien erfolgt durch Autoklavieren oder Sterilfiltration.

Allgemeine Lösungen		
Lösung	Konzentration	Substanz
PBS <sup>-</sup>	137mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS <sup>+</sup>	137mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,7 mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,7 mM	MgCl <sub>2</sub>
TBS	10 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	pH 7,5	

<b>Lösungen für die Nukleinsäureanalytik</b>		
<b>Lösung</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Substanz</b>
Agarosegel	0,8% (w/v)	Agarose
	in TBE aufkochen	
	4µl/100ml	Ethidiumbromid-Stammlösung
	im abgeklebten Gelträger mit eingesetzten Kämmen zu einem Gel erstarren lassen	
TE-Puffer	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	pH 8	
TBE	90 mM	Tris
	90 mM	Borsäure
	2,5 mM	EDTA
	PH 8,3	
Rnase 2000	0,2% (w/v)	RNase A
	20000 U/ml	RNase T
ProteinaseK-Stammlösung	20 mg/ml	ProteinaseK
ES-Zell-Lysispuffer	2% (v/v)	Proteinase K-Stammlösung
	20% (v/v)	Promega PCR-Puffer (5x)
Laird-Puffer	100 mM	Tris
	5 mM	EDTA
	200 mM	NaCl
	0,1% (v/v)	SDS-Lösung (20%)
	pH 8,5	
Lysis-Puffer	1 %(v/v) in Laird Puffer	Proteinase K-Stammlösung
DEPC Wasser	0,1% (v/v)	Diethylpyrocarbonat
	1 h autoklavieren	
Ethidiumbromid- Stammlösung	1% (w/v)	Ethidiumbromid

Material

<b>Lösungen und Medien für die ES-Zellkultur</b>		
<b>Lösung</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Substanz</b>
β-Mercaptoethanol-Lösung	0,7% (w/v)	β-Mercaptoethanol
Gelatine-Lösung	0,1% (w/v)	Gelatine
Trypsinlösung	1 mM	EDTA
	1% (v/v)	Hühnchenserum
	0,025% (w/v)	Trypsin
	In PBS <sup>-</sup>	
ES-Zell-Kulturmedium	500 ml	Glasgow MEM (Biochrom AG)
	15% (v/v)	Fötale Kälberserum
	1 mM	Natriumpyruvat
	6 ml	Penicillin/Streptomycin Lösung (100x)
	2 mM	Glutamin
	6 ml	Nichtessentielle Aminosäuren (100x)
	0,2% (v/v)	LIF-haltiges, konditioniertes Medium (eigene Herstellung)
	1% (v/v)	β-Mercaptoethanol-Lösung
ES-Zelldifferenzierungsmedium	ES-Zellkulturmedium ohne LIF	
ES-Zelldifferenzierungsmedium (neuronal)	10 <sup>-7</sup> mM	Retinsäure
	in ES-Zelldifferenzierungsmedium	
ES-Medium mit MEK-Inhibitor	50 µM	MEK Inhibitor (PD98059) Cell Signaling Technology
	in ES-Zellkulturmedium	
Einfriermedium	10% (v/v)	DMSO
	in fötalem Kälberserum	
PBS		Kommerziell erhältliches PBS für die Zellkultur (Gibco)
Steriles Wasser		Kommerziell erhältliches steriles Wasser (Gibco)

<b>Lösungen für die Histologie</b>		
<b>Lösung</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Substanz</b>
PFA-Lösung	4% (w/v) in PBS <sup>-</sup> pH 7,2	Paraformaldehyd
X-Gal-Lösung	4% (w/v) in N,N-Dimethylformamid	X-Gal
LacZ-Basislösung	0,5 M 0,5 M 1,25 mM 2 mM pH 7,4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O MgCl <sub>2</sub> EGTA
LacZ-Fixierlösung	0,4% (v/v) in LacZ-Basislösung	Glutaraldehydlösung (25%)
LacZ-Waschlösung	0,01% (v/v) 0,2% (v/v) in lacZ-Basislösung	Deoxycholat-Lösung (10%) Nonidet P40
lacZ-Färbelösung	5 mM 5 mM 8% (v/v) in lacZ-Waschlösung	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]-Lösung K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]-Lösung X-Gal-Lösung
Hämatoxylin-Lösung	0,1% (v/v)	Mayers Hämalaun-Lösung
Eosin-Färbelösung	0,1% (w/v)	Eosin Y
Hoechst-Färbelösung	0,05% (w/v)	Hoechst 33258
Propidiumiodid-Lösung	1% (w/v) in PBS <sup>-</sup>	Propidiumiodid
Blockierungslösung	4% (w/v) 0,1% (v/v) in PBS <sup>-</sup>	Kälberserum (BSA) Triton-X-100-Lösung (10%)

<b>Lösungen für die Proteinanalytik</b>		
<b>Lösung</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Substanz</b>
Trenngelpuffer	1,5 M	Tris-Base
	0,2% (v/v)	SDS-Lösung (20%)
	pH 8,8	
Sammelgelpuffer	0,5 M	Tris
	0,2% (v/v)	SDS-Lösung (20%)
	pH 6,8	
APS-Stammlösung	10% (w/v)	Ammoniumpersulfat
Probenpuffer	62,5 mM	Tris
	3% (w/v)	SDS-Pulver
	10% (v/v)	Glyzerin
	0,01% (w/v)	Bromphenolblau
	5% (v/v)	β-Mercaptoethanol
Elektrophoresepuffer	0,25 M	Tris-Base
	1,92 M	Glyzin
	1% (v/v)	SDS-Lösung (10%)
	pH 8,3	
Transferpuffer	5 mM	Tris-HCl
	25 mM	Tris-Base
	160 mM	Glyzin
	20% (v/v)	Methanol
Waschpuffer (Immunoblot)	8,5 mM	Tris-HCl
	1,7 mM	Tris-Base
	50 mM	NaCl
	0,1% (v/v)	Tween 20
Blockierungslösung	5% (w/v)	Magermilchpulver (Sucofin)
	in Waschpuffer	

<b>Lösungen für die Mikroinjektion</b>		
<b>Lösung</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Substanz</b>
Ethidiumbromid-Lösung	5 µg/ml In KCl-Lösung	Ethidiumbromid
Fixierlösung	0,1% (v/v) In PBS <sup>-</sup>	Glutaraldehyd (25%)
KCl-Lösung	1 M	KCl
LiCl-Lösung	1 M	LiCl
Lucifer Yellow-Lösung	4% (w/v) in KCl-Lösung	Lucifer Yellow
Meerrettich-PO-Lösung	0,1% (v/v) In PBS <sup>-</sup>	Avidin D-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase
Neurobiotin-Lösung	6% (w/v)	Neurobiotin
	0,4% (w/v)	Rhodamin-3-Isothiocyanat Dextran
	0,1 M	Tris
	pH 7,6	
Triton-X-100-Lösung	2% (v/v)	Triton-X-100
	in PBS <sup>-</sup>	

### **3. Methoden**

#### **3.1 Kultur embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)**

In dieser Arbeit werden embryonale Stammzellen der HM1-Zelllinie (Magin et al., 1992) verwendet. Diese Zellen können unabhängig von einer Nährzellschicht kultiviert werden. Der Boden der verwendeten Kulturschalen wird vor der Aussaat der Zellen mindestens zehn Minuten mit 0,1% Gelatine-Lösung inkubiert, um den Zellen ein Anheften zu erleichtern. Die Kultur der Zellen erfolgt bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank. Das Medium muss täglich abgesaugt und ersetzt werden. Neben den HM1-Zellen werden ebenfalls *de novo* isolierte transgene C57BL/6 ES-Zellen verwendet. Grundsätzlich erfolgt die Kultur dieser Zellen wie bereits für HM1 ES-Zellen beschrieben. Jedoch wird diese Zelllinie auf einer Nährzellschicht aus murinen, embryonalen Fibroblasten kultiviert. Diese müssen zuvor durch Bestrahlung, bzw. Behandlung mit Mitomycin C mitotisch inaktiviert werden.

#### **3.2 Passagieren von ES-Zellen**

Um die Zellen zu passagieren, wird das Kulturmedium abgesaugt und die Schale drei Mal mit sterilem PBS<sup>-</sup> (Sigma) gewaschen. Daraufhin werden die Zellen für zwei Minuten mit Trypsinlösung bei 37°C inkubiert, um die Zell-Zell-, sowie Zell-Matrix-Verbindungen zu lösen. Anschließend wird die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von ES-Zell-Kulturmedium abgeschwächt. Die Zellen werden fünf Minuten bei 800 Upm (RT) in einer Zentrifuge sedimentiert und der trypsinhaltige Überstand abgesaugt und verworfen. Das zurückgebliebene Zellsediment wird in frischem Kulturmedium aufgenommen und die Zellen durch mehrfaches, kräftiges pipettieren vereinzelt. Nun können die ES-Zellen im Verhältnis 1:3 bis 1:6 ausgesät werden.

#### **3.3 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen**

Um die Zellen einzufrieren wird eine konfluent bewachsene Kulturschale zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit Trypsinlösung bei 37°C inkubiert, um die ES-Zellen von der Kulturschale zu lösen. Nach zwei Minuten wird die Trypsinbehandlung durch die Zugabe von Kulturmedium beendet und die Zellen werden durch pipettieren mechanisch

vereinzelt. Durch Zentrifugation bei 800 UpM werden die HM1-Zellen sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellsediment in einer angemessenen Menge Einfriermedium aufgenommen (ca. 5000 Zellen /  $\mu$ l Einfriermedium). Je 1 ml Einfriermedium wird anschließend in ein 1,5 ml Einfrierröhrchen gegeben. Die Röhrchen werden bei -70°C in einer Styroporbox langsam eingefroren und nach einigen Tagen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Um eingefrorene ES-Zellen erneut in Kultur zu nehmen werden die Kryoröhrchen aus den Flüssigstickstofftanks entnommen und rasch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die ES-Zellsuspension wird in 9 ml ES-Zellmedium aufgenommen und fünf Minuten bei 800 UpM zentrifugiert. Um Reste des Einfriermediums zu entfernen, wird der Überstand mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und verworfen. Die am Boden des Zentrifugationsröhrchens sedimentierten ES-Zellen werden in frisches 37°C warmes ES-Zellmedium aufgenommen. Die Zellsuspension kann nun auf einer mit Gelatine beschichteten Kulturschale ausgesät werden.

### **3.4 Isolation embryonaler Mausfibroblastenzellen**

Embryonale C57Bl/6 Stammzellen werden auf einer Nährzellschicht aus mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten kultiviert, die zu diesem Zweck aus Embryonen isoliert werden müssen. Um die Fibroblasten zu gewinnen wird eine trächtige Maus an Tag 13,5 der Schwangerschaft mittels Genickbruch getötet. Die Embryonen werden ohne Reste von Plazenta, Fruchtblase oder Uterus präpariert und in PBS<sup>-</sup> gebadet, um das Blut abzuwaschen. Unter dem Binokular werden der Kopf, die Extremitäten, sowie die sichtbaren inneren Organe (Herz, Leber, etc.) entfernt. Um die Zellen zu dissoziieren wird das übrige Gewebe mit einer Schere zerkleinert und pro Embryo in 2 ml Trypsinlösung für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wird das angelöste Gewebe durch kräftiges Pipettieren mechanisch weiter zerkleinert und die Zellsuspension mittels eines Zellsiebs von größeren Gewebeteilen gereinigt. Die Trypsin-Zellsuspension wird daraufhin mit 8 ml frischem ES-Zellkulturmedium vermischt und mittels Zentrifugation bei 800 UpM sedimentiert. Das Zellsediment wird erneut in frischem Kulturmedium aufgenommen und die Zellen werden auf Zellkulturschalen ausgesät. Die Fibroblastenkulturen können nun drei bis fünf Passagen lang expandiert werden, um eine große Menge an Zellen zu erhalten. Anschließend werden die konfluent mit Fibroblasten bewachsenen Schalen für 2-4 Stunden mit 10  $\mu$ g/ml Mitomycin C behandelt, um die Zellen mitotisch zu inaktivieren.

Danach werden die Zellen dreimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, mittels Trypsinlösung von den Kulturschalen gelöst, in Einfriermedium aufgenommen und in Einfrierröhrchen langsam in einer Styroporkiste eingefroren. Um die ES-Zellen später auf der Nährzellschicht kultivieren zu können werden die inaktivierten Mausfibroblasten einen Tag vor den ES-Zellen aufgetaut und auf mit 0,1% Gelatinelösung beschichteten Zellkulturschalen ausgesät.

### 3.5 Isolation embryonaler Stammzellen aus Blastozysten transgener C57BL/6 Mäuse

Für die Isolation embryonaler Cx43/Cx45flox ES-Zellen wurden zunächst Cx43flox/flox Mäuse (Eckardt et al., 2004) und Cx45flox/flox[eGFP] Mäuse (Maxeiner et al., 2005) miteinander gekreuzt um Cx43flox/+;Cx45flox/flox Tiere zu erhalten. Die Durchführung der PCR-Analysen zur Genotypisierung der Tiere wurden bereits in den an diesem Institut angefertigten Dissertationen von Dominik Eckart (2004) und Stephan Maxeiner (2005) beschrieben. Die verwendeten Oligonukleotid-Startermoleküle sind dem Materialteil dieser Arbeit zu entnehmen. Die Blastozysten für die Isolation der ES-Zellen stammten von schwangeren Weibchen aus Verpaarungen der Cx43flox/+;Cx45flox/flox Mäuse untereinander. Um die Ausbeute an Embryonen zu erhöhen wurde zu Beginn der Experimente eine Superovulation eingeleitet (Martín-Coello et al., 2008). Den ca. drei Wochen alten Cx43flox/+;Cx45flox/flox Weibchen werden zu diesem Zweck 5 U PMSG (**P**regnant **M**are **S**erum, **G**onadotropin) intra-peritoneal gespritzt. Es handelt sich hierbei um ein Glykoproteinhormon, welches aus dem Blut trächtiger Stuten isoliert wird. An Mäuse verabreicht, übt PMSG eine FSH-(**F**ollikel**S**timulierendes **H**ormon) und LH-(**L**uteinisierung**S**hormon) ähnliche Wirkung aus. Dies leitet die Reifung der Follikel ein. 48 Stunden später erfolgt, erneut durch intra-peritoneale Injektion, die Gabe von 50 U des Glykoproteinhormons hCG (**h**umanes **C**horion-**G**onadotrophin), welches direkt an LH-Rezeptoren bindet und so den Eisprung auslöst. Direkt nach der Injektion werden die superovulierten Weibchen mit Cx43flox/+;Cx45flox/flox Böcken verpaart. Am nächsten Tag wird die Begattung an Hand der Vaginalpfröpfe (VP) makroskopisch bzw. mit einer Sonde überprüft. VP positive Weibchen werden an Tag 3,5 nach der Begattung durch Genickbruch getötete und die Uteri präpariert. Durch spülen der Uteri mit einer feinen Kanüle erfolgt das Herauswaschen der Embryonen. Morulae und Blastozysten werden nun in einzelne Vertiefungen einer 48-Lochplatte überführt, deren Boden mit einer Schicht mitotisch inaktivierter Mausfibroblastenzellen bewachsen ist. Dort werden die Embryonen

in ES-Zell-Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Dem Kulturmedium werden 50 µ M MEK1-Inhibitor (NEB) zugesetzt, um die Isolation der ES-Zellen zu erleichtern. Nach zwei Tagen in Kultur schlüpfen die Blastozysten aus der sie umgebenden *zona pelucida* und können auf der Nährzellschicht aus embryonalen Mausfibroblasten anwachsen. Die Zellen der inneren Zellmasse beginnen sich zu teilen. Nach weiteren zwei bis vier Tagen ist die innere Zellmasse soweit expandiert, dass die Zellen durch Behandlung mit ES-Zell-Trypsinlösung von der Kulturschale abgelöst und vereinzelt werden können. Die Zellsuspension wird auf eine neue Kulturschale überführt. Nach einigen Tagen sind erste runde bis ovale Kolonien kleiner, dicht gepackter Zellen sichtbar. Diese werden als embryonale Stammzellen bezeichnet und können nahezu unbegrenzt expandiert werden. Die isolierten embryonalen Stammzelllinien werden in Einfriermedium aufgenommen, langsam eingefroren und zur längerfristigen Aufbewahrung in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt. Ein Teil der Zellen wurde zuvor abgenommen und für einige Passagen auf gelatinebeschichteten Kulturschalen ohne Nährzellschicht expandiert. Dies geschah, um die embryonalen Mausfibroblasten aus der Kultur zu entfernen und anschließend eine Charakterisierung der isolierten Zellen mittels PCR-Analyse durchführen zu können.

### 3.6 Charakterisierung der isolierten ES-Zellen mittels PCR-Analysen

Nach der Isolation der ES-Zellen erfolgte eine Charakterisierung mittels PCR-Analyse um Linien des Genotyps Cx43/Cx45flox zu identifizieren.

#### Cx43<sup>flox</sup> - neu PCR



Reaktionsansatz:

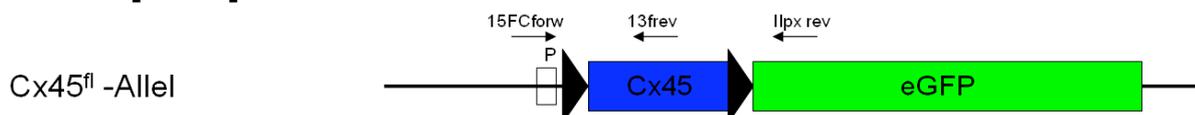
DNA		1 µl
43delforw (100pmol/µl)		0,25 µl
UMPR (100pmol/µl)		0,25 µl
Puffer (5x)		5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)		1,5 µl
DNTPs (10mM)		0,3 µl
Taq-Polymerase		0,3 µl
H <sub>2</sub> O bidest		15,7 µl

PCR - Programm:

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
94	4	1
92	1	35
65	1,5	
72	2	
72	10	1

Liegt Cx43 von loxP-Stellen flankiert vor ergibt sich ein PCR-Produkt von 630 bp. Bei einem Wildtyp-Allel beträgt die Fragmentgröße etwa 500 bp.

### Cx45del[EGFP] PCR



Reaktionsansatz:

PCR-Programm:

DNA	1	µl
43delforw (100 pmol/µl)	0,2	µl
43delrev (100 pmol/µl)	0,2	µl
IIPx3rev (100 pmol/µl)	0,4	µl
Puffer (5x)	5	µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5	µl
DNTPs (10 mM)	0,2	µl
Taq-Polymerase	0,5	µl
H <sub>2</sub> O bidest	15	µl

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
94	4	1
95	1	35
67	1	
72	1	
72	10	1

Bei der Cx45del[EGFP]-PCR werden in jedem Ansatz 3 Primer eingesetzt. Liegt das Cx45 Allel von 2 loxP-Stellen flankiert vor, amplifiziert das Primerpaar *15FCforw* / *12frev* ein DNA Fragment von 473 bp. Bei einem Wildtyp-Allel ergibt sich ein 389 bp großes Fragment. Die Über den dritten Primer *IIPx3rev* kann ebenfalls die Deletion des von loxP-Stellen flankierten Cx45 nachgewiesen werden. In diesem Fall wird ein 620 bp großes PCR-Produkt mit Hilfe des Primerpaars *IIPx3rev*/*15FCfor* amplifiziert.

### SRY-PCR

Reaktionsansatz:

PCR - Programm:

DNA	1	µl
<i>SRYfor</i> (100pmol/µl)	0,1	µl
<i>SRYrev</i> (100pmol/µl)	0,1	µl
Puffer (5x)	5	µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2	µl
DNTPs (10mM)	0,3	µl
Taq-Polymerase	0,3	µl
H <sub>2</sub> O bidest	16,1	µl

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
94	5	1
95	0,75	30
63	1	
72	1	
72	7	1

Um das Geschlecht der Zelllinien zu bestimmen wurde eine SRY-PCR durchgeführt (Han et al., 1993). Dabei wird mittels der Primer *SRYfor* und *SRYrev* ein 102 bp langes DNA-Fragment amplifiziert. Die Primer binden Sequenzen im SRY-Gen auf dem Y-Chromosom

männlicher Zellen. Bei weiblichen Zellen wird daher kein Fragment amplifiziert.

### **3.7 Cre-Transduktion in Cx43/Cx45flox ES-Zellen**

Um die von loxP-Stellen flankierten Cx43 und Cx45 DNA-Sequenzen in den isolierten ES-Zellen zu deletieren, werden die Zellen mit einer transduzierbaren Cre-Rekombinase behandelt (Peitz et al., 2002). Dazu werden die Zellen zunächst mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und durch Trypsinbehandlung bei 37°C vom Boden der Kulturschale abgelöst. Nach drei Minuten werden die Zellen durch kräftiges Pipettieren weiter mechanisch vereinzelt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Anschließend werden die Zellen in geeigneter Dichte ausgesät und für sechs Stunden kultiviert. Die Transduktion wird durch Zugabe von 2 µM Cre-Protein in Serum-freiem ES-Zellmedium für 16 Stunden eingeleitet. Anschließend wird das Kulturmedium abgesaugt und durch frisches ES-Zellmedium ersetzt. Nach einer Erholungsphase von zwei Tagen werden die Zellen durch Trypsinbehandlung von der Kulturschale abgelöst, durch kräftiges Pipettieren mechanisch vereinzelt und auf neue Kulturschalen ausgesät. Nach zwei bis drei Tagen sind die einzelnen Zellen zu Klonen herangewachsen, die nun unter dem Mikroskop mit der gelben Spitze einer 200 µl Pipette von der Kulturschale abgeschabt und in einzelne Vertiefungen einer 96-Lochplatte überführt werden können („picken“). Nach ausreichender Expansion der klonal isolierten Zelllinien werden PCR-Analysen durchgeführt, um Klone zu identifizieren die eine komplette Deletion von Cx43 und Cx45 aufweisen. Diese werden für weitere Experimente aufbewahrt und in flüssigem Stickstoff konserviert. Für die Charakterisierung der Cx43 und Cx45 Genloki wurden neben den zwei bereits erwähnten PCR-Analysen (Cx43floxneu und Cx45del[EGFP]), vier weitere Analysen durchgeführt (Cx43del, 2loxneoA, 2loxneoB, 2lox43).

### 43del PCR

Cx43<sup>del</sup> -Allel



Reaktionsansatz:

DNA	1 µl
43delforw (100pmol/µl)	0,25 µl
43delrev (100pmol/µl)	0,25 µl
Puffer (5x)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5 µl
DNTPs (10 mM)	0,2 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O bidest	15,3 µl

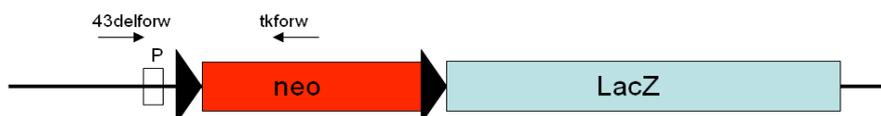
PCR-Programm:

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
94	4	1
92	1	35
65	1,5	
72	2	
72	10	1

Bei dieser PCR-Reaktion wird im Falle einer vollständiger Deletion der von loxP-Stellen flankierten kodierenden Region von Cx43 und der Neomycin Kasette ein 670 bp langes PCR-Amplikon synthetisiert.

### 2loxneoA PCR

Cx43<sup>2loxneo</sup> -Allel



Reaktionsansatz:

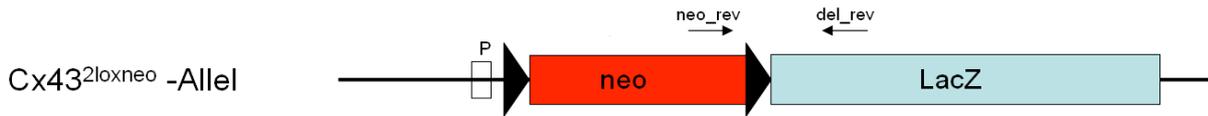
DNA	1 µl
Tkforw (100pmol/µl)	0,25 µl
43delforw (100pmol/µl)	0,25 µl
Puffer (5x)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 µl
DNTPs (10mM)	0,4 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O bidest	16,1 µl

PCR-Programm:

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
94	4	1
92	1	35
65	1,5	
72	2	
72	10	1

Wird nach der Cre vermittelten Rekombination die von loxP Stellen flankierte Cx43 Sequenz deletiert und bleibt die von loxP Stellen flankierte Neomycinkasette erhalten, ergibt sich ein PCR-Produkt von 850 bp. Erfolgt keinerlei Deletion ergibt sich für den Cx43-Lokus mit von loxP-Stellen flankiertem Cx43 und Neomycinkasette ein Amplikon von 2,1 kb.

### 2loxneoB PCR



Reaktionsansatz:

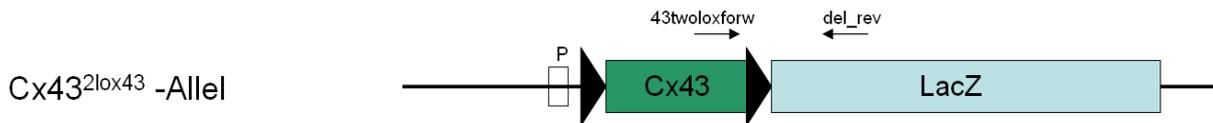
DNA	1	µl
<i>del_rev</i> (100 pmol/µl)	0,25	µl
<i>neo_rev</i> (100 pmol/µl)	0,25	µl
Puffer (5x)	5	µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2	µl
dNTPs	0,4	µl
Taq-Polymerase	0,5	µl
H <sub>2</sub> O bidest	15,6	µl

PCR- Programm:

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
95	5	1
95	1	35
55	1	
72	1	
72	10	1

Bei Allelen mit gefloxter Neomycinkassette, hinter der sich ein LacZ-Sequenz befindet, wird ein etwa 600 bp großes Fragment amplifiziert.

### 2lox43 PCR



Reaktionsansatz:

DNA	1	µl
<i>43twoloxforw</i> (100 pmol/µl)	0,25	µl
<i>43delrev</i> (100 pmol/µl)	0,25	µl
Puffer (5x)	5	µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5	µl
dNTPs (10 mM)	0,4	µl
Taq-Polymerase	0,5	µl
H <sub>2</sub> O bidest	16,1	µl

PCR-Programm:

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
94	4	1
92	1	28
65	0,75	
72	0,75	
72	10	1

Mit dieser PCR kann die partielle Deletion der Neomycin Selektionskassette ohne Deletion des gefloxten Cx43 nachgewiesen werden. In diesem Fall ergibt sich ein 420 bp großes PCR-Produkt.

### **3.8 Differenzierung embryonaler Stammzellen**

#### **3.8.1 Spontane Differenzierung in Embryonalkörperchen**

Embryonalkörperchen sind Aggregate von ES-Zellen, welche in Suspensionskultur zu komplexen, zystischen Strukturen reifen. In diesen entstehen Zellen aller drei Keimblätter (Meso-, Endo- und Ektoderm). Um Embryonalkörperchen zu erzeugen werden embryonale Stammzellen mittels Trypsinbehandlung vom Boden eines konfluent bewachsenen T25-Zellkulturkolbens abgelöst, in Differenzierungsmedium aufgenommen und durch kräftiges Pipettieren mechanisch vereinzelt. Anschließend werden die Zellen in eine Bakterienkulturschale überführt. Die ES-Zellen können sich nicht am Boden der Kulturschale anheften und verbleiben deshalb in Suspensionskultur, wo sie sich zu Aggregaten verschiedener Größe zusammenlagern. Die Zellaggregate werden für sechs bis 22 Tage in Suspension weiter kultiviert und das Medium jeden zweiten Tag durch frisches Differenzierungsmedium ersetzt. Die so gewonnenen Embryonalkörperchen variieren innerhalb eines Ansatzes stark in ihrer Größe. Die Größe der Zellaggregate wiederum hat einen signifikanten Einfluss auf den Ausgang der Differenzierung der Zellen innerhalb des Embryonalkörperchens. Um kontrollierte Bedingungen, z.B. für eine statistische Auswertung des Differenzierungsverhaltens von Zellen, zu erhalten, ist es wichtig die Größe der Aggregate genau zu kontrollieren. Dies kann mittels der „Hängende Tropfen“ Methode erreicht werden. Zu diesem Zweck wird die Zahl der ES-Zellen in der Suspension mit einer Zählkammer bestimmt und durch Verdünnung so eingestellt, dass eine bestimmte Zahl an Zellen pro Milliliter Medium erreicht wird. Anschließend werden mit Hilfe einer Mehrkanalpipette 20  $\mu$  l Zellsuspension aus geringer Höhe auf den umgedrehten Deckel einer Bakterienkulturschale getropft. Der Boden der Schale wird mit PBS<sup>-</sup> bedeckt, um das Eintrocknen der Tropfen zu verhindern. Schließlich wird der Deckel vorsichtig, in einer gleichmäßigen Bewegung auf die Kulturschale aufgesetzt. Die Tropfen mit der Zellsuspension hängen nun am Deckel der Kulturschale. Am Boden des Tropfen sammeln sich die ES-Zellen und bilden einen, in Größe und Form relativ genau definierten Zellaggregat. Nach zwei Tagen werden die Embryonalkörperchen mit frischem Differenzierungsmedium vom Deckel der Kulturschale abgewaschen und in eine nicht adhäsive Bakterienkulturschale überführt. Hier werden die Aggregate so lange wie für die Experimente nötig in Suspension kultiviert, wobei das Differenzierungsmedium jeden zweiten Tag teilweise abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt wird.

### **3.8.2 Differenzierung in Kardiomyozyten**

Um die ES-Zellen in Kardiomyozyten zu differenzieren, werden zuerst Embryonalkörperchen mittels der „Hängende Tropfen“ Methode hergestellt. Dazu werden Tropfen à 20 µl auf den Deckel der Kulturschale aufgesetzt, welche jeweils 1500 Zellen enthalten. Nach zwei Tagen haben sich im hängenden Tropfen Embryonalkörperchen gebildet, welche dann in eine nicht adhäsive Bakterienkulturschale überführt werden. Im Anschluss erfolgt die Kultur der Embryonalkörperchen für weitere vier Tage in Suspension (2+4 Protokoll). Nach zwei Tagen wird die Hälfte des Differenzierungsmediums vorsichtig abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. An Tag 6 werden die Embryonalkörperchen einzeln mit einer 200 µl Pipette aufgenommen und jeweils in eine Vertiefungen einer 24-Loch Kulturschale überführt. Die Vertiefungen sind zuvor mit 0,1% Gelatinelösung beschichtet worden, um das Anwachsen der Zellen zu vereinfachen. Die Zellen werden nun für sieben weitere Tage auf der 24-Lochschale kultiviert, wobei das Differenzierungsmedium jeden zweiten Tag vorsichtig abgesaugt und durch frisches Kulturmedium ersetzt wird. Nach drei Tagen in adhäsiver Kultur können erste Embryonalkörperchen mit spontan kontrahierenden Foci beobachtet werden.

### **3.8.3 Differenzierung in Neuronen und Astrozyten**

Um embryonale Stammzellen in Neuronen und Astrozyten zu differenzieren, werden ebenfalls Embryonalkörperchen hergestellt. Dazu werden die Zellen eines konfluent bewachsenen T25-Kulturkolbens mittels Trypsinbehandlung vereinzelt und in Differenzierungsmedium aufgenommen. Die Zellen werden bei 800 UpM sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment erneut in 10 ml Differenzierungsmedium aufgenommen. Dem Differenzierungsmedium werden zuvor 0,1 µM all-trans-Retinsäure zugesetzt. Die Zellsuspension wird nun in nicht adhäsive Bakterienkulturschalen überführt und für zwei Tage kultiviert. Anschließend wird ein Teil des Kulturmedium abgesaugt und durch frisches Differenzierungsmedium mit 0,1 µM Retinsäure ersetzt. Nach erneut zwei Tagen werden die Embryonalkörperchen in ein 10 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und 5 Minuten stehen gelassen. In dieser Zeit sinken die Zellaggregate auf den Boden des Röhrchens und der Überstand kann vorsichtig abgesaugt werden. Anschließend werden die Embryonalkörperchen in frisches Differenzierungsmedium ohne Retinsäure aufgenommen und weitere zwei Tage in Suspension kultiviert (4+2 Protokoll). Nach insgesamt sechs Tagen werden die Embryonalkörperchen einzeln mit einer 200 µl Pipette

aufgesaugt und in einzelne Vertiefungen einer 24-Lochplatte überführt, welche zuvor mit 0,1% Gelatinelösung beschichtet wurde. Um Immunfluoreszenzanalysen durchführen zu können, wurden in einige Vertiefungen zuvor sterile Deckgläschen gelegt und ebenfalls mit Gelatine beschichtet. Nach vier Tagen adhäsiver Kultur entstehen erste Neuronen, nach acht Tagen erste Astrozyten. Um Neuronen nachzuweisen, werden Immunoblot und Immunfluoreszenzanalysen mit spezifischen Antikörpern gegen  $\beta$ III-Tubulin durchgeführt. Für die Markierung von Astrozyten werden GFAP-Antikörper verwendet.

### **3.9 Isolation und reverse Transkription der Gesamt-RNA aus HM1 ES-Zellen und Nachweis von Connexin und Pannexin cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion**

Um zu untersuchen, welche Connexin- bzw. Pannexin-Isoformen in embryonalen Stammzellen exprimiert sind, wird die Gesamt-RNA aus HM1 ES-Zellen isoliert und in cDNA revers transkribiert. Bei der reversen Transkription wird RNA mittels einer viralen reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Ausgewählte cDNA-Moleküle können nun mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. PCR für Polymerase Chain Reaction) durch Auswahl spezifischer Oligonukleotid-Startermoleküle selektiv amplifiziert werden. Die amplifizierte cDNA kann daraufhin mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und nachgewiesen werden.

#### **3.9.1 RNA Extraktion aus ES-Zellen**

HM1 ES-Zellen werden in einem T75 Kulturkolben bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert und mittels Trypsinbehandlung vom Boden des Kulturkolbens gelöst. Anschließend wird ES-Zellmedium hinzugegeben um die Wirkung des Trypsins abzuschwächen. Die ES-Zellsuspension wird bei 800 UpM (RT) fünf Minuten zentrifugiert, um die ES-Zellen zu sedimentieren. Der Überstand wird mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt.

Alle folgenden Schritte werden auf Eis und unter dem Abzug durchgeführt: zu dem ES-Zellsediment werden 2,5 ml TRIzol-Reagenz hinzugegeben. Anschließend werden die Zellen 30 Sekunden mit dem Homogenisierstab behandelt. Dem Homogenisat werden 4 ml Chloroform beigemischt, der Ansatz wird kurz geschüttelt und anschließend bei 4°C für 15 Minuten bei 12000 UpM zentrifugiert.

Der wässrige, RNA-haltige Überstand wird abgenommen und in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt. Dem abgenommenen Überstand werden nun 4 ml

Isopropanol zugesetzt. Der Ansatz wird erneut geschüttelt und anschließend bei 4°C und 12000 UpM für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die sedimentierte RNA durch Zugabe von 4 ml Ethanol (70%) gewaschen. Nach erneuter zehnmütiger Zentrifugation bei 4°C und 12000 UpM wird der Ethanolüberstand verworfen und das RNA-Sediment an der Luft getrocknet. Die getrocknete RNA wird anschließend in TE-Puffer aufgenommen. Die RNA-Konzentration kann durch photometrische Vermessung der Probe bei 260 nm in TE-Puffer bestimmt werden.

### **3.9.2 Reverse Transkription der isolierten RNA**

Zunächst werden 2 µg RNA in ein 1 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 11 µl aufgefüllt. Anschließend werden 1 µl Oligo[dT]<sub>12-18</sub>-Startermolekül (50 µM) hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wird 10 Minuten bei 70°C im Heizblock denaturiert und anschließend für zwei Minuten auf Eis abgekühlt.

Nun werden folgende Reagenzien zugesetzt:

1µl dNTP-Mix (10mM pro Nukleotid)  
4µl 5x First-Strand Puffer  
2µl 0,1 M DTT  
1µl RNAsin (Ribonukleaseinhibitor)

Der Reaktionsansatz wird zwei Minuten bei 42°C im Wasserbad inkubiert und anschließend mit 1 µl MMLV Reverse Transkriptase (isoliert aus Moloney Murine Leukemia Virus) [200 U/µl] versetzt. Daraufhin wird der Reaktionsansatz 50 Minuten bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Abschließend wird die reverse Transkription durch 15 minütige Denaturierung des Enzyms Reverse Transkriptase bei 70°C im Heizblock gestoppt.

### **3.9.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur selektiven Amplifikation bestimmter cDNAs**

Die revers transkribierte HM1 Gesamt-RNA sollte auf cDNA der 20 bekannten Connexinisoformen sowie der drei Pannexinisoformen untersucht werden. Dazu werden 23 verschiedene Ansätze für die Polymerase-Kettenreaktion gewählt. Jeder Ansatz enthält

spezifische Oligonukleotid-Startermoleküle für die zu identifizierende cDNA. Die Sequenzen der verwendeten Startermoleküle sind dem Materialteil zu entnehmen.

Um die generelle Funktion der Polymerase-Kettenreaktion mit den verwendeten Startermolekülen zu überprüfen, wird die PCR mit genomischer DNA bzw. im Fall von Cx39 mit Plasmid DNA durchgeführt. Im Fall der Pannexine wird bei Panx1 und Panx2 Hirn-cDNA und bei Panx3 Haut-cDNA als Positivkontrollen verwendet. Um eine Kontamination der Gesamt-RNA mit genomischer DNA auszuschließen wird eine  $\beta$ -Aktin-PCR durchgeführt. Da die Primer für die  $\beta$ -Aktin-PCR so gewählt wurden, dass sie intronüberspannend binden, wird bei genomischer DNA ein längeres Fragment amplifiziert als bei cDNA.

Die Reaktionsansätze für die Polymerase-Kettenreaktion setzen sich wie folgt zusammen:

**PCR-Ansatz (50  $\mu$ l):**

1 $\mu$ l	DNA (cDNA oder Genomische- bzw. Plasmid-DNA)
10 $\mu$ l	PCR-Puffer (5x)
4 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> [25 mM]
2 $\mu$ l	USP Oligonukleotid Startermolekül [10 $\mu$ M]
2 $\mu$ l	DSP Oligonukleotid Startermolekül [10 $\mu$ M]
2 $\mu$ l	dNTP's [je 10 mM pro Nukleotid]
1 $\mu$ l	Taq-DNA-Polymerase
33 $\mu$ l	A. bidest

Jeder Ansatz wird mit 50 $\mu$ l PCR-Öl überschichtet.

**PCR-Programm:**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	2 min	1
2	94°C	1 min	19
3	65°C → 55°C	1 min	
4	72°C	2 min	
5	94°C	1 min	14
6	55°C	1 min	
7	72°C	2 min	
8	72°C	7 min	1

Die Steuerung der Temperatur der einzelnen Reaktionszyklen erfolgt automatisch durch

eine zuvor programmierte PCR-Maschine.

Bei der durchgeführten Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um eine Temperatur-Erniedrigungs-PCR („Touch Down PCR“), bei der die Anlagerungstemperatur der Startermoleküle pro Zyklus um 0,5 °C erniedrigt wird. Diese Vorgehensweise schließt einen Kompromiss zwischen dem Wunsch eine möglichst effektive Anlagerung der Oligonukleotid-Startermoleküle an die zu amplifizierende DNA zu erreichen und dem Ziel unspezifische Bindungen von Startermolekülen zu minimieren.

### **3.9.4 Agarose-Gelelektrophorese**

Um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und so identifizieren zu können wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wird ein Agarosegel hergestellt, wobei die Konzentration der eingesetzten Agarose die Porengröße des Gels bestimmt. Für die Identifikation der DNA-Fragmente aus der Connexin- und Pannexin-RT-PCR wird ein 0,8% (w/v) Agarosegel verwendet. Zur Herstellung des Gels wird die Agarose (Gibco BRL) in TBE-Puffer eingewogen und im Mikrowellenofen bis zum Siedepunkt erhitzt. Die heiße Agaroselösung wird bis auf ca. 50 °C abgekühlt und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,6 µg/µl versetzt. Anschließend wird die Agaroselösung in einen mit Gewebepapier abgeklebten Gelträger gegossen und dort zu einem Gel erstarren lassen. Durch Einsetzen eines Platzhalters (Kamm) werden Taschen im Gel ausgespart, in welche später die Proben eingefüllt werden können. Ist die Agaroselösung geliert, werden die Klebestreifen entfernt und das Gel in eine Laufkammer eingesetzt. Die Kammer wird mit TBE-Puffer gefüllt, bis das Gel ausreichend bedeckt ist.

Die aufzutrennenden DNA-Proben werden in die ausgesparten Taschen des Gels eingefüllt. Zusätzlich zu den Proben wird ein geeigneter Größenstandard aufgetragen, um später bei der Auswertung des Gels, den aufgetrennten Fragmenten eine Größe zuzuordnen zu können.

Durch Anlegen eines elektrischen Stroms erfolgt die Auftrennung der DNA-Moleküle. Dabei können sie das Gel je nach ihrer Fragmentgröße unterschiedlich schnell passieren. Das Gel mit seinem Geflecht von Agarosemolekülen wirkt dabei wie ein molekulares Sieb. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 7-9 V/cm<sup>2</sup>.

Um die DNA im Gel sichtbar zu machen wird diese mit Ethidiumbromid, einem planaren, aromatischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Fluoreszenz wird unter ultraviolettem Licht sichtbar und kann mit einem UV-Transilluminator (Pharmacia Biotech Image Master

VDS) zur Dokumentation und Auswertung fotografiert werden.

### **3.10 Immunoblotanalyse**

#### **3.10.1 Herstellen von Proteinlysaten**

Um die Expression von Connexinen, Pannexinen und anderen Proteinen in ES-Zellen nachzuweisen, wurden Proteinlysate hergestellt. Diese können anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper in einer Immunoblotanalyse untersucht werden. Zur Herstellung der Proteinlysate werden die Zellen zwei Tage auf 10 cm Kulturschalen kultiviert. Das Zellkulturmedium wird abgesaugt und die Kulturschale drei Mal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, um Mediumreste und Zelltrümmer zu entfernen. Nach Zugabe von 250 µl Laemmli-Puffer werden die Zellen mit einem sterilen Gummischaber vom Schalenboden abgeschabt. Das entstandene schleimige Zelllysate wird in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit Ultraschall sonifiziert, bis eine klare, wässrige Suspension entsteht. Das Lysat kann anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -70°C im Eisschrank gelagert werden.

#### **3.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zelllysaten wird der kommerziell erhältliche Reagenziensatz „Bichinonic Acid Kit for Protein Determination“ (Sigma) verwendet. Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgt nach den Herstellerangaben. Das Nachweisprinzip beruht auf der Reduktion von Kupfersulfat durch Proteine. Das von den Proteinen reduzierte Kupfersulfat wird von der im Nachweisreagenz enthaltenen Bichinon Säure (BCA) komplexiert. Die Komplexbildung resultiert in einer Farbreaktion. Die Menge an entstandenem Komplex kann über eine photometrische Vermessung des Ansatzes bei 562 nm bestimmt werden. Die gemessene Absorption verhält sich proportional zur Proteinkonzentration im Ansatz. Über eine Eichreihe mit definierten Proteinmengen (0 bis 100 µg/µl Rinderserum) kann die tatsächliche Proteinmenge im Zelllysate errechnet werden.

### 3.10.3 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Für die Immunoblotanalyse werden die in den zu untersuchenden Zellysaten enthaltenen Proteine zuerst mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) elektrophoretisch aufgetrennt. Die SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) ist eine Standardtechnik der Molekularbiologie und ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld, unabhängig von ihrer Eigenladung. Die Proteinproben werden dazu mit dem anionischen Detergenz Natrium Dodecylsulfat (SDS) behandelt. Dieses lagert sich an hydrophobe Aminosäuren an und verleiht den Proteinen eine so hohe negative Ladung, dass die Eigenladung vernachlässigt werden kann. Die Ladung der Proteine wird nun von der Länge ihrer Polypeptidkette bestimmt. Durch den Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden inter- und intramolekulare Disulfidbrücken reduziert.

Die Proteinauftrennung erfolgt in einem Sammel- und einem Trenngel. Beide unterscheiden sich in ihrem pH-Wert und ihrer Porengröße. Das Sammelgel dient der Fokussierung der Proteine in scharfe Banden. Im Trenngel werden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Die SDS-Proteinkomplexe ordnen sich im großporigen Sammelgel (pH 6,8) zwischen den voraus laufenden Chloridionen (Leitonen) und den Glyzin-Molekülen (Folgeionen) an, die bei diesem pH-Wert überwiegend als Zwitterionen mit einer Nettoladung von Null vorliegen. Im kleinporigen Trenngel (pH 8,8) erhält das Glyzin eine negative Gesamtladung und überholt die SDS-Proteinkomplexe, wodurch der Sammeleffekt aufgehoben wird. Nun trennen sich die SDS-Proteinkomplexe nach ihrer molekularen Masse.

Mengenangaben für das Gießen eines SDS-PAGE-Gels:

Zusammensetzung	Sammelgel (4%)	Trenngel (10%)
Acrylamid-Stammlsg.	0,5 ml	5,25 ml
Sammelgelpuffer	0,93 ml	-
Trenngelpuffer	-	3,75 ml
A. bidest	2,25 ml	6 ml
TEMED	5 $\mu$ l	9 $\mu$ l
APS (10 % w/v)	22,5 $\mu$ l	90 $\mu$ l

Das polymerisierte Gel wird in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und die Pufferkammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt.

Pro Proben tasche werden 100 µg Protein aufgetragen. Jede Probe wird zuvor mit 0,5 µl Bromphenolblau sowie 0,1% (v/v) β-Mercaptoethanol (25%) versetzt. Die Probenansätze werden auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit Laemmli-Puffer aufgefüllt und anschließend für zehn Minuten auf 75°C erhitzt. Danach werden die Proben sowie ein Molekulargewichtsstandard („Prestained Precision Protein Standard“ der Firma Biorad) in die Taschen des Gels eingefüllt.

Die Elektrophorese erfolgt unter Wasserkühlung. Solange sich die Probe im Sammelgel befindet wird eine Stromstärke von 20 mA pro Gel angelegt. Sobald die Bromphenolblaubande das Trenngel erreicht hat, wird die Stromstärke auf 25 mA pro Gel erhöht. Die Gelelektrophorese wird beendet, sobald die Bromphenolblau-Lauffront am unteren Ende des Gels ausläuft.

### **3.10.4 Western-Blot**

Beim Western-Blot werden die im Acrylamidgel aufgetrennten Proteine durch Anlegen eines elektrischen Stroms aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die negativ geladenen Proteine bewegen sich dabei im elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols und gelangen so auf die Membran. Diese hat eine hohe Affinität zu Proteinen und bindet diese an sich. Der Western-Blot wird in einer Blotkammer durchgeführt und erfolgt bei einer Spannung von 100 V für zwei Stunden bei 4°C .

### **3.10.5 Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper**

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wird die Membran vor der Antikörperreaktion in einer Blockierungslösung (5% Magermilchpulver in Waschpuffer) für eine Stunde inkubiert. Dabei werden freie Bereiche der Nitrozellulosemembran durch Proteine der Milch abgedeckt.

Der primäre Antikörper wird nun in der entsprechenden Verdünnung in Blockierungslösung angesetzt und mit der Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur bzw. bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Membran zweimal für je fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Es folgt eine 45-minütige Inkubation mit dem zweiten Antikörper. Dieser ist mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und bindet spezifisch an den ersten Antikörper. Anschließend wird die Membran erneut gewaschen. Eine Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper, sowie den

Verdünnungen in denen diese eingesetzt wurden ist dem Materialteil zu entnehmen.

### **3.10.6 Elektro-Chemilumineszenz (ECL) Reaktion**

Mittels Chemilumineszenz werden die auf der Nitrozellulosemembran gebundenen Antikörper sichtbar gemacht. Dazu wird das „Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate“ der Firma Pierce verwendet. Das Nachweisprinzip beruht auf dem Umsatz des Chemilumineszenzsubstrates durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase, wobei es zu einer Leuchtreaktion kommt.

Die Membran wird fünf Minuten mit dem Chemilumineszenzsubstrat inkubiert und anschließend in eine Filmkassette eingelegt. In der Dunkelkammer wird nun ein Röntgenfilm (Kodak) aufgelegt. Die Lumineszenz belichtet den Film an den Stellen an denen der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper an die Membran gebunden ist. Nach verschiedenen Expositionszeiten (30 s - 30 min) werden die Filme entwickelt. Mit Antikörpern spezifisch markierte Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran sind als schwarze Banden auf dem Film erkennbar.

### **3.10.7 Entfernen gebundener Antikörper von einer Nitrozellulosemembran**

Um eine Membran mehrfach für Immunoblotanalysen mit verschiedenen Antikörpern nutzen zu können, müssen nach jeder Analyse die bereits gebundenen Antikörper wieder von der Membran gelöst werden, während die aufgetrennten Proteine weiterhin auf der Nitrozellulosemembran verbleiben. Zu diesem Zweck wird das „Restore Western Blot Stripping Kit“ der Firma Pierce nach Herstellerangaben verwendet.

☐

### **3.10.8 Ponceau-Färbung einer Nitrozellulosemembran**

Um Proteine auf der Nitrocellulosemembran nachzuweisen wird die Membran für wenige Sekunden in Ponceau-Färbelösung inkubiert und anschließend mehrfach mit Leitungswasser gewaschen, bis die Färbung gut ausgeprägt ist. Die aufgetrennten Proteine sind nun als rote Banden auf der Membran zu erkennen. Die Detektionsgrenze für die Ponceaufärbung liegt bei 100 ng Protein pro Bande. Die Ponceaufärbung wird durchgeführt um zu kontrollieren ob die Proteine aus dem Gel gleichmäßig auf die Membran übertragen wurden und um abzuschätzen ob bei allen Proben vergleichbare Mengen an Protein aufgetragen

wurden.

### **3.11 Immunfluoreszenzanalysen an Zellkulturen bzw. Kryoschnitten**

Bei der Immunfluoreszenzanalyse werden ausgewählte Proteine in ihrer nativen Umgebung mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gebunden. Die primären Antikörper werden in einem zweiten Schritt von sekundären Antikörpern erkannt, die wiederum mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Die durch die Bindung spezifischer Antikörper markierten Proteine, können nun über das Fluoreszenzsignal unter dem Mikroskop identifiziert werden. Diese Technik ermöglicht es nicht nur die Expression bestimmter Proteine in einem Zellsystem oder Gewebe nachzuweisen, sondern darüber hinaus auch die genaue subzelluläre Lokalisation des Proteins zu bestimmen. Durch die gleichzeitige Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper kann ebenfalls eine Kolo-kalisation verschiedener Proteine nachgewiesen werden.

#### **3.11.1 Immunfluoreszenzanalyse an Kulturzellen**

Um eine Immunfluoreszenzanalyse an Kulturzellen durchführen zu können, werden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Diese werden zuvor mit Gelatine beschichtet, um das Anheften der Zellen an die Glasoberfläche zu erleichtern. Wenn die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht haben, werden diese zuerst zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend fünf Minuten in eiskaltem, reinem Ethanol bei -20°C inkubiert. Nach der Ethanolfixierung werden die Zellen erneut dreimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen.

Vor der Antikörperreaktion werden die Deckgläschen mit den fixierten ES-Zellen für eine Stunde in eine Blockierungslösung aus 5% Rinderserum Albumin (BSA) und 0,1% (v/v) Triton-X-100 in PBS<sup>-</sup> überführt. Nun erfolgt eine einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur. Anschließend werden die Zellen dreimal in PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit dem sekundären Antikörper für ca. 45 Minuten in einer dunklen, feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die verwendeten primären, sowie sekundären Antikörper sind dem Materialteil zu entnehmen. Die Antikörper werden in 100 µl Blockierungslösung pro Deckgläschen angesetzt. Die entsprechenden Verdünnungen sind ebenfalls im Materialteil aufgeführt.

Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper werden die Zellen erneut dreimal mit PBS<sup>-</sup> und einmal mit Leitungswasser gewaschen. Zum anschließenden Eindecken der Präparate auf dem Objektträger wird das Eindeckmedium „Permafluor“ der Firma Thermo

Scientific verwendet. Dazu wird ein Tropfen Permafluor auf einen Objektträger gegeben und das Deckgläschen mit den Zellen nach unten auf den Tropfen aufgesetzt. Die Untersuchung der Präparate und die Dokumentation erfolgen an einem Laser Scan Fluoreszenzmikroskop (LSM 510 meta) der Firma Zeiss

### **3.11.2 Immunfluoreszenzanalysen an Schnitten von Embryonalkörperchen**

Die Embryonalkörperchen werden zunächst aus der Suspensionskultur in ein 10 ml Röhrchen überführt und fünf Minuten absinken lassen. Daraufhin wird der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Sediment mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Anschließend werden die Embryonalkörperchen mit einer 1000 µl Pipette in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und in einigen Tropfen Tissue-Tek Einbettungsmedium aufgenommen. Nun wird das Reaktionsgefäß für ca. zehn Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht, um das Präparat zu gefrieren. Anschließend kann das kegelförmige Stück Tissue-Tek mit den Embryonalkörperchen aus dem Reaktionsgefäß geklopft und auf den Schneidetisch des Kryostaten aufmontiert werden. Es werden Gefrierschnitte von 12 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger überführt. Die Kryoschnitte können bei -20°C gelagert werden. Die Durchführung der anschließenden Immunfluoreszenzanalysen erfolgten, wie bereits für die Kulturzellen beschrieben.

### **3.12 Mikroinjektionsanalyse**

Bei der Mikroinjektionsanalyse werden mit Hilfe einer Iontophorese-Kapillare niedermolekulare Farbstoffe in einzelne Zellen injiziert. Die Ausbreitung des Farbstoffes in benachbarte Zellen gilt als Nachweis Gap Junction-vermittelter Kommunikation. Die Konzentrationen der injizierten Farbstoff- und Spurenmoleküllösungen sind dem Materialteil zu entnehmen.

Die Mikroinjektion erfolgt an konfluent bewachsenen 6 cm-Kulturschalen. Für eine statistische Auswertung werden pro Indikatormolekül und Zelllinie mindestens 60 Injektionen durchgeführt.

Die Durchführung der Mikroinjektion erfolgt am inversen Mikroskop (IM 35, Zeiss) mittels Iontophorese (20 nA, 2-10 s). Die Steuerung der Injektionskapillare erfolgt über den Mikromanipulator „Injectman“ der Firma Eppendorf. Pro Kulturschale werden 20 Injektionen durchgeführt. Diese erfolgen innerhalb von 10 Minuten, jeweils im Abstand von 30 Sekunden. Während der Mikroinjektion werden die Zellen in den Kulturschalen auf

einer beheizbaren Platte bei 37°C gehalten. Da während der Mikroinjektion keine CO<sub>2</sub> Begasung erfolgt, sollte die Dauer des Experiments 20 Minuten nicht überschreiten.

Die Iontophoresekapillaren werden mit Hilfe eines horizontalen Kapillarenziehers hergestellt. Zur Beladung werden die Kapillaren mit dem stumpfen Ende für 5 min in den zu injizierenden Farbstoff gestellt. Durch die Kapillarkräfte wird der Farbstoff in die Spitze der Iontophoresekapillare transportiert. Mittels einer Hamiltonspritze wird die Kapillare anschließend luftblasenfrei mit Salzlösung (1M KCL bei Neurobiotin, 1M LiCl bei Lucifer Yellow und Ethidiumbromid) gefüllt und somit der Farbstoff in der Spitze überschichtet. Der Mikroelektrodenhalter mit AgCl-Elektrode (EH-1S-Sachs) wird ebenfalls mit der Salzlösung befüllt und die beladene Kapillare eingesetzt. Der Mikroelektrodenhalter wird anschließend in den Mikromanipulator eingesetzt.

### **3.12.1 Mikroinjektion von Neurobiotin**

Neurobiotin (N-[2-amino-ethyl-]biotinamid) ist ein Molekül mit einer molekularen Masse von 287 Da und ist unter physiologischen Bedingungen einfach positiv geladen. Da sich Neurobiotin nicht zur Fluoreszenz anregen lässt, wird Rhodamin-Dextran beigemischt. Rhodamin-Dextran ist mit 10 kDa zu groß um durch Gap Junction-Kanäle diffundieren zu können. Mit Hilfe des fluoreszierenden Rhodamin-Dextrans ist es jedoch möglich, den Injektionsvorgang zu beobachten. Die Injektion erfolgt durch Anlegen eines negativen Stroms von 20 nA. Nach der letzten Injektion werden die Zellen zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit frisch angesetzter Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Nach erneutem, dreimaligen Waschen mit PBS<sup>-</sup> werden die Zellen mindestens zwei Stunden bei 4°C in Triton-X-100-Lösung inkubiert, um die Zellmembranen zu permeabilisieren. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS<sup>-</sup> bei Raumtemperatur gewaschen und für 90 Minuten mit Avidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase-Lösung inkubiert. Dabei bindet das Avidin an das Neurobiotin. Ungebundenes Enzym wird durch dreimaliges Waschen mit PBS<sup>-</sup> entfernt. Die anschließende Färbereaktion zum Nachweis der Peroxidase erfolgt mit dem kommerziellen Reagenziensatz "Histo-Green POD Subtrat Kit" der Firma Linaris und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **3.12.2 Mikroinjektion von Lucifer Yellow**

Lucifer Yellow ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einer molekularen Masse von 443 Da, der unter physiologischen Bedingungen zweifach negativ geladen ist. Das Molekül kann bei einer Wellenlänge von 426 nm zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Injektion erfolgt durch Anlegen eines positiven Stroms (20 nA). Fünf Minuten nach der Injektion wird die Ausbreitung des Farbstoffes durch Auszählen der fluoreszierenden Nachbarzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten Filtersätzen bestimmt.

### **3.12.3 Mikroinjektion von Ethidiumbromid**

Ethidiumbromid ist ein fluoreszierendes Molekül mit einer molekularen Masse von 314 Da und einer unter physiologischen Bedingungen einfach positiven Ladung. Das Molekül kann bei einer Wellenlänge von 260 nm zur Fluoreszenz angeregt werden. Die mit Ethidiumbromid beladene Kapillare wird mit 1M LiCl-Stammlösung überschichtet. Die Injektion erfolgt durch Anlegen eines negativen Stroms (20 nA).

Fünf Minuten nach der Injektion wird die Ausbreitung des Farbstoffes durch Auszählen der fluoreszierenden Nachbarzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten Filtersätzen bestimmt.

### **3.13 Behandlung von HM1 ES-Zellen mit Gap-Junction Inhibitoren**

Gap Junction-Inhibitoren sind pharmakologische Substanzen welche, dem Kulturmedium zugesetzt, die interzelluläre Kommunikation mittels Gap Junction-Kanälen unterbinden.

Um die Funktion Gap Junction-vermittelter Kommunikation in ES-Zellen zu untersuchen werden die Zellen mit den Inhibitoren 18- $\alpha$ -Glycyrrhinsäure und Carbenoxolon inkubiert. 18- $\alpha$ -Glycyrrhinsäure und Carbenoxolon werden als 10 mM Stocklösung in einem Ethanol/DMSO (v/v 2:3) Gemisch angesetzt. Aus den Stocklösungen werden verschiedene Gebrauchslösungen mit finalen Endkonzentrationen von 20  $\mu$ M - 120  $\mu$ M in ES-Zellmedium hergestellt. Die zuvor für zwei Tage auf einer Kulturschale inkubierten ES-Zellen werden für fünf Stunden mit den entsprechenden Gebrauchslösungen inkubiert. Um zellschädigende Effekte des DMSO/Ethanol-Gemisches auszuschließen, werden die Zellen in einem Kontrollexperiment ebenfalls mit entsprechenden Konzentrationen des Lösungsmittels behandelt.

### 3.14 Apoptose-Testverfahren

Apoptose wurde in den untersuchten Zellen mittels Immunoblotanalysen mit spezifischen Antikörpern gegen PARP-1- bzw. gegen die gespaltene Caspase-3 nachgewiesen. Die verwendeten Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen sind dem Materialteil zu entnehmen. Darüberhinaus wurde zum Nachweis apoptotischer Zellen der kommerziell erhältliche Reagenziensatz „AnnexinV-FITC apoptosis detection kit“ der Firma Calbiochem verwendet. Zum Nachweis von Apoptose an Kryoschnitten von Embryonalkörperchen wurde eine TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Analyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Reagenziensatz der Firma Roche verwendet. Bei allen verwendeten kommerziellen Reagenziensätzen erfolgte die Durchführung der Experimente entsprechend den Angaben des Herstellers.

### 3.15 Bestimmung der Proliferationsraten

Um die Proliferationsraten zweier Zelllinien zu vergleichen, werden die Zellen zunächst einige Passagen lang jeweils in exakt gleicher Zellzahl ausgesät und kultiviert. Um die Bestimmung der Zellzyklusphasen durchzuführen, werden die Zellen mit Trypsin vom Boden der Kulturschalen abgelöst und durch Pipettieren mechanisch vereinzelt. Die Zellen werden mittels Zentrifugation bei 800 UpM sedimentiert und für 10 Minuten in eiskaltem reinem Ethanol fixiert. Anschließend werden die Zellen 30 Minuten lang mit RNase behandelt. Danach erfolgt die Färbung der DNA mit Propidiumiodid (60µg/ml in PBS<sup>-</sup>). Nach der Färbung werden die Zellen sedimentiert und in FACS-Puffer aufgenommen. Mittels Durchflusszytometrie wird anschließend die Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle mit einem FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)-Gerät bestimmt. Propidiumiodid interkaliert in die DNA der Zellen. Die Intensität der Fluoreszenz spiegelt somit die Menge an DNA pro Zelle wider. Während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus enthalten Zellen unterschiedliche Mengen an DNA. Während der G1/G0-Phase besitzen die Zellen den einfachen Chromosomensatz. Während der S-Phase findet die Replikation statt und somit steigt der DNA-Gehalt bis schließlich in der G2/M-Phase der doppelte Chromosomensatz vorliegt. Diese Verteilungen verschiedener DNA-Mengen pro Zelle innerhalb einer Zellpopulation kann vom FACS-Gerät bestimmt und als Diagramm ausgegeben werden. Dabei wird auf der X-Achse die Fluoreszenzintensität und auf der Y-Achse die Anzahl der Zellen bei denen die entsprechende Fluoreszenzintensität

gemessen wurde aufgetragen (Abb.3.1.6 A). G1/G0-Phase sowie G2/M-Phase ergeben dabei einen distinkten Ausschlag in der Kurve. Die Signale zwischen diesen beiden Ausschlägen sind auf Zellen in der S-Phase zurückzuführen. Die Zellen in dieser Zellzyklusphase weisen keinen einheitlichen DNA-Gehalt auf, da während dieser Phase die Replikation stattfindet und es dabei zu einer stetigen Zunahme der DNA-Menge kommt.

### **3.16 Transfektion von ES-Zellen mit siRNA**

Um die Transkriptmenge von Cx31 und Cx45 in embryonalen Stammzellen der Maus zu reduzieren, wurden die ES-Zellen mit spezifischen siRNAs gegen die beiden Connexine transfiziert. Zu diesem Zweck werden kommerzielle siRNA-Gemische der Firma Dharmacon verwendet, welche aus je vier verschiedenen siRNAs pro Ziel-mRNA bestehen (Accell siRNA-SMARTpool). Durch Verwendung von siRNA Gemischen sollen Nebeneffekte auf andere mRNAs (off target effects) reduziert werden und gleichzeitig eine hohe Reduktion der Transkriptmenge des Zielgens erreicht werden. Das Einschleusen der siRNAs in die ES-Zellen erfolgt mittels Lipofektion mit dem kommerziellen Transfektionsreagenz DharmaFECT1 (Dharmacon). Dabei werden 5 µl Dharmafect1 pro 100 µl Medium eingesetzt. Die Lipofektion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Cx31 SMARTpool-siRNA wird 100 nM, die Cx45 SMARTpool siRNA 80 nM eingesetzt. Die Transfektion erfolgt in einzelnen Vertiefungen einer 96-Lochschale in serumfreien ES-Zellkulturmedium. Nach 24 Stunden wird das Transfektionsmedium gegen normales ES-Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen für weitere 24 Stunden kultiviert. Anschließend werden die Zellen passagiert und weitere 48 Stunden kultiviert. Die Experimente wie z.B. Mikroinjektionsanalysen, Apoptosetests bzw. Immunoblotanalysen werden 96 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Um das optimale Transfektionsreagenz zu ermitteln (DharmaFECT1-DharmaFECT4) und die Lipofektion zu optimieren wurden, zunächst fluoreszenzmarkierte siGLO siRNAs (Dharmacon) in die ES Zellen transfiziert. Die Auswertung wurde an einem Fluoreszenzmikroskop durch die Bestimmung des Prozentsatzes rot fluoreszierender Zellen vorgenommen.

### **3.17 $\beta$ -Galaktosidase-Darstellung zum Nachweis der Expression des lacZ Reportergens**

Das Prinzip der  $\beta$ -Galaktosidase-Darstellung beruht auf dem Umsatz des Substrates X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) durch das vom lacZ-Gen kodierte Reporterprotein  $\beta$ -Galaktosidase. X-Gal wird bei dieser Reaktion in Galaktose und 5-brom-4-chlor-3-Hydroxyindol gespalten. Das Letztere wird durch den Luftsauerstoff oxidiert und dimerisiert weiter zu dem unlöslichen, blauen Farbstoff 5,5'-dibrom-4,4'-dichlor-Indigo. Bei der Durchführung der X-Gal-Färbung werden die Zellen zunächst dreimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend 10 Minuten in lacZ-Fixierlösung fixiert. Es folgen drei fünfminütige Waschschriffe mit lacZ-Waschlösung. Danach werden die Zellen für mehrere Stunden in lacZ-Färbelösung bei 37°C im Dunkeln inkubiert, bis sich eine intensive Blaufärbung einstellt.

### **3.18 Paraffinschnitte von Embryonalkörperchen**

Im Gegensatz zu Gefrierschnitten bleibt bei Paraffinschnitten die Gewebestruktur gut erhalten. Allerdings sind Immunfluoreszenzanalysen an diesen nur schwierig durchzuführen. Um Paraffinschnitte zu erzeugen, werden die Embryonalkörperchen zunächst sedimentiert, mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und mittels einer 200  $\mu$ l Pipette auf ein Stück dünnes Whatman-Papier überführt. Dieses wird in ein kleines Plastikkestchen mit paraffindurchlässigen Öffnungen eingelegt. Die Paraffineinbettung erfolgt automatisch in einem Paraffin-Gewebeinfiltrationsautomaten der Firma Leica (TP1020). Dabei werden die Präparate zunächst mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (60%, 70%, 80%, 96%, 100% Ethanol). Anschließend werden die Präparate je zweimal in Xylol und Paraffin eingetaucht und in Metallbecher der Paraffinausgießstation (EG 1140H, Leica) gegeben. Dort erfolgt der Einschluss in flüssiges Paraffin. Nach dem Aushärten des Paraffinblocks werden an einem Rotationsmikrotom (HM 360, Leica) 5  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt. Mittels eines Pinsels werden die Schnitte auf einen Glasobjektträger überführt. Die Schnittpräparate sind nun weiterhin von Paraffin eingeschlossen. Um Färbungen durchführen zu können, müssen die Präparate entparaffiniert werden, wobei die Schnitte je zweimal in Xylol und 96% Ethanol getaucht und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (80%, 70%, 60% Ethanol) werden.

Die Paraffinschnitte werden abschließend einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen, um Zellkerne und Zytoplasma sichtbar zu machen. Dazu werden die Schnitte für eine

Minute in Hämatoxylin-Lösung inkubiert und anschließend unter lauwarmem Leitungswasser differenziert. Nun folgt eine fünfminütige Inkubation in Eosinlösung. Das Entfernen überschüssiger Färbelösung erfolgt erneut durch gründliches waschen mit Leitungswasser. Abschließend werden die gefärbten Schnitte getrocknet und mit Entellan unter einem Deckgläschen eingeschlossen.

### **3.19 Connexonaufreinigung und Co-Immunpräzipitationsanalysen**

Die in dieser Arbeit gezeigte Connexonaufreinigung und die Ko-Immunpräzipitationsanalysen wurden von Christian Markopoulos durchgeführt und sind in seiner Diplomarbeit, die 2006 am Institut für Genetik in Bonn erstellt wurde, ausführlich beschrieben.

## **4. Ergebnisse**

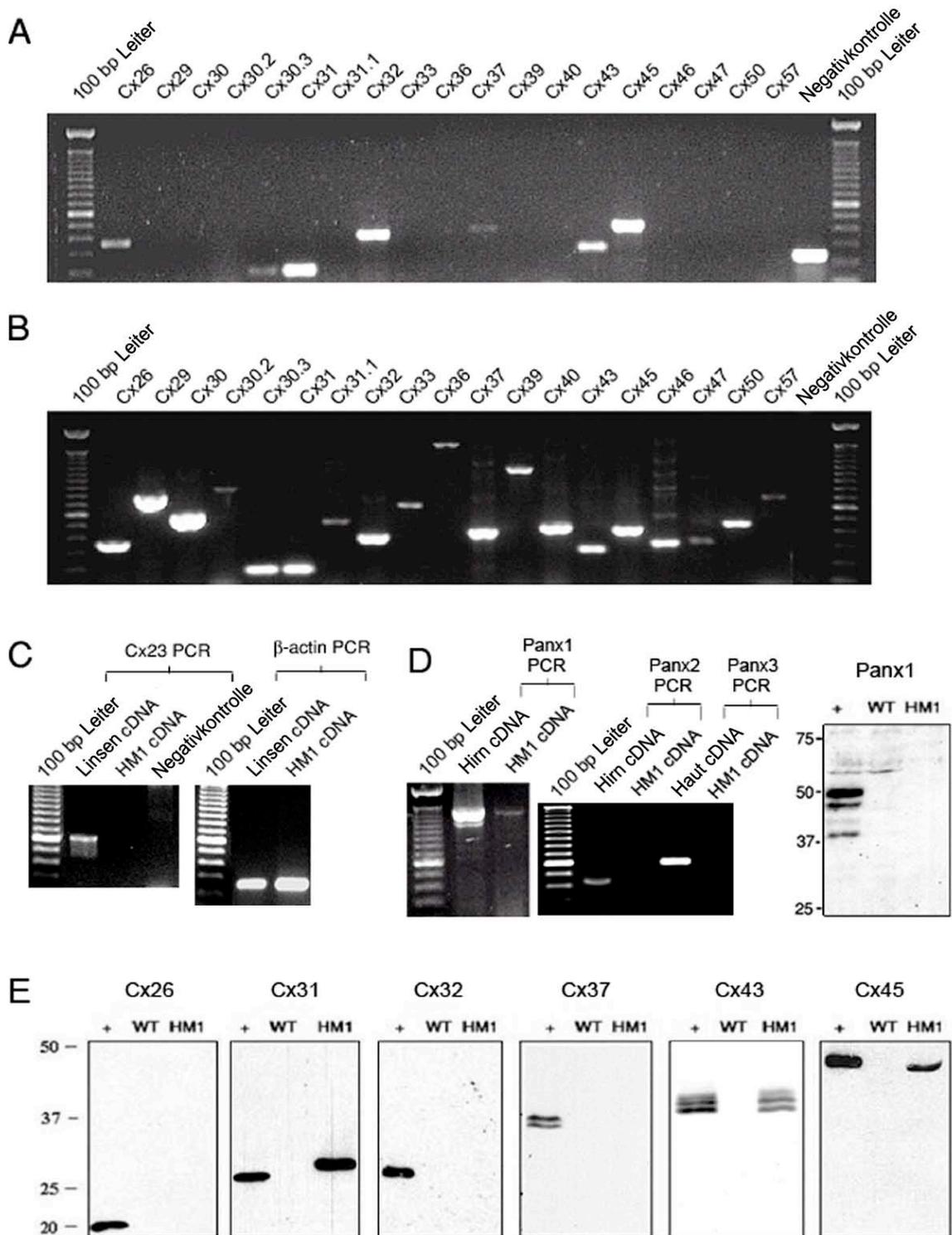
### **4.1 Connexin- und Pannexinexpression in embryonalen Stammzellen der Maus**

#### **4.1.1 Expression von Connexin- und Pannexin-mRNA**

Mittels RT-PCR-Analysen mit verschiedenen Oligonukleotid-Startermolekülen (Primer) wurde die Expression von mRNAs nachgewiesen, welche für Connexin- sowie für Pannexinproteine kodieren. Die Primer sind so gewählt worden, dass mRNAs für alle Mausconnexine und für die drei bekannten Pannexinisoformen amplifiziert werden können. Transkripte von sieben der 20 bekannten Connexinisoformen waren in embryonalen Stammzellen der Maus detektierbar (Cx26, Cx31, Cx30.3, Cx32, Cx37, Cx43 und Cx45) (Abb.4.1 A-C). Im Fall der drei Pannexinisoformen konnte lediglich die Transkription von Pannexin1 (Panx1) gezeigt werden (Abb.4.1 D).

#### **4.1.2 Expression von Connexin- und Pannexinproteinen**

Im Anschluss an die Charakterisierung der Connexin- und Pannexintranskription wurde die Translation der mRNAs in Proteine untersucht. Um die Connexin- und Pannexinproteine in den ES-Zelllysaten nachzuweisen, wurden Immunoblotanalysen durchgeführt. Dabei konnte die Ausprägung der drei Connexinproteine Cx31, Cx43 und Cx45 mittels spezifischer Antikörper gezeigt werden. Connexin26, Cx32, Cx37 und Panx1 wurden in den Zelllysaten nicht gefunden (Abb.4.1 D-E).



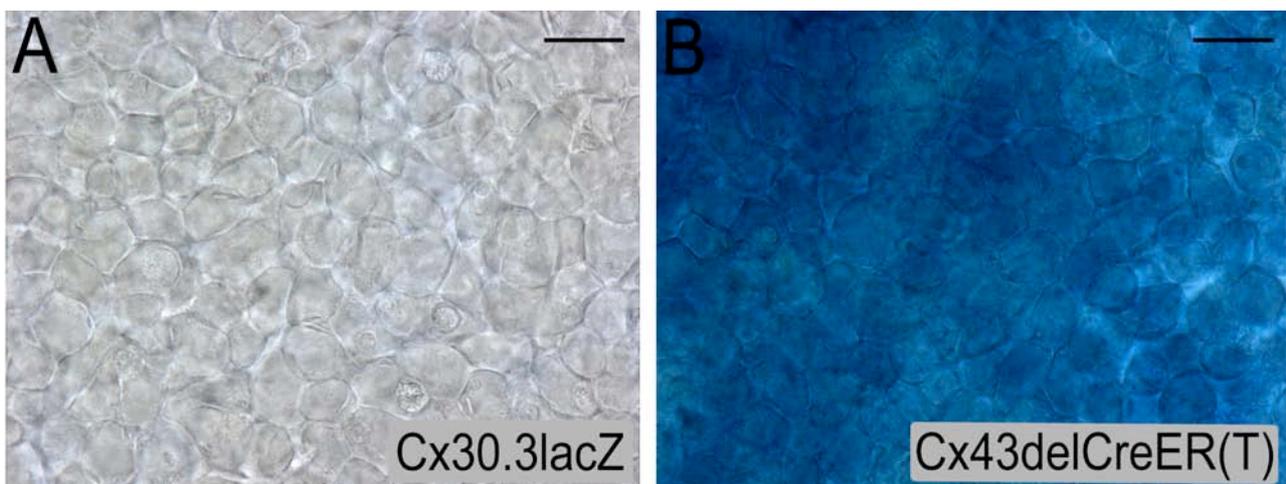
**Abb.4.1: Untersuchungen zur Expression von Connexinen und Pannexinen in embryonalen Stammzellen der Maus.**

A: RT-PCR-Analyse aller bekannten murinen Connexine (außer Cx23) an Gesamt-mRNA aus HM1 Zellen. B: Kontrolleexperiment zur Überprüfung der PCR-Reaktionen an genomischer HM1 DNA bzw. im Fall von Cx39 an Plasmid DNA. C: RT-PCR-Analyse von Connexin23 (Nachtrag zu A). D: RT-PCR-Analyse zum Nachweis der Pannexinexpression in HM1 Zellen und Pannexin1-Immunoblotanalyse. E: Immunoblotanalysen mit spezifischen Antikörpern gegen die mittels RT-PCR in A nachgewiesenen Connexine. +: Positivkontrolle (Lysate aus HeLa Zellen, die mit den entsprechenden Connexinen transfiziert wurden). WT: Wildtyp HeLa-Zelllysate.

#### 4.1.3 Indirekte Untersuchung der Cx30.3-Translation in ES-Zellen mittels X-Gal-Färbung von Cx30.3lacZ ES-Zellen

Connexin30.3 mRNA konnte mittels einer RT-PCR-Analyse in HM1 ES-Zellen nachgewiesen werden. Da keine spezifischen Cx30.3-Antikörper zur Verfügung standen, war eine Analyse der Translation des Connexins mittels Immunoblot nicht möglich. Um dennoch eine Aussage über die Proteinexpression treffen zu können, wurde eine X-Gal-Färbung an Cx30.3lacZ ES-Zellen durchgeführt. Die Zellen waren ursprünglich für die Erzeugung einer konventionalen Defektmaus mittels homologer Rekombination gewonnen worden (Zheng-Fischhöfer et al., 2008). Die kodierende Region von Cx30.3 wurde dabei heterozygot durch eine lacZ-Sequenz ersetzt, die unter Kontrolle des endogenen Cx30.3-Promotors exprimiert wird. Mittels X-Gal-Färbung kann die Ausprägung der von dem Reporter gen kodierte  $\beta$ -Galaktosidase gezeigt werden. Als Positivkontrolle wurde eine Färbung an Cx43delCre-ER(T) Zellen durchgeführt, in denen die kodierende Region des Connexin43 durch ein lacZ-Reporter gen ersetzt wurde. Wie zuvor beschrieben konnte die Expression von Cx43 bereits in HM1 Zellen mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Die Experimente zeigen keine Blaufärbung in Cx30.3lacZ ES-Zellen (Abb.4.2 A). Bei den Cx43delCre-ER(T) Zellen hingegen ist ein blauer Niederschlag, der bei dem Umsatz des Substrats X-Gal durch die  $\beta$ -Galaktosidase entsteht, deutlich zu erkennen (Abb.4.2 B).



**Abb.4.2: X-Gal-Färbung an Cx30.3lacZ (A) und Cx43delCre-ER(T) (B) ES-Zellen zum Nachweis der Ausprägung des lacZ-Reporter gens.**

Die LacZ-Expression steht in diesen Zellen unter der Kontrolle des endogenen Cx30.3- bzw. Cx43-Promotors. Ein blauer Niederschlag nach X-Gal-Färbung ist ein Nachweis für die Expression des Reporter gens und damit indirekt auch für die Expression von Cx43 und Cx30.3 in ES-Zellen. Größenstandard: 10  $\mu$ m.

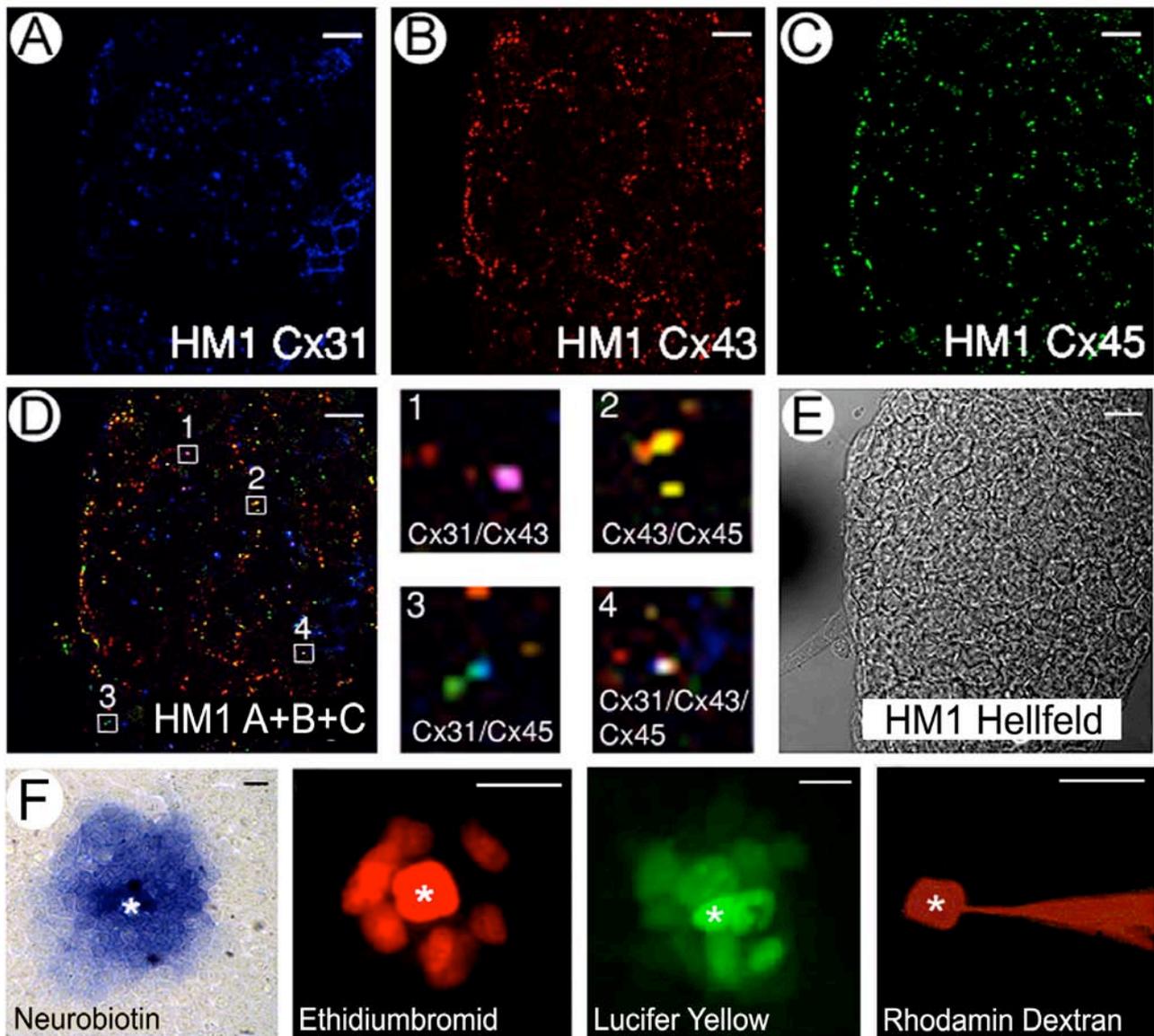
#### **4.1.4 Subzelluläre Lokalisation der Connexinproteine**

Damit sich Gap Junction-Kanäle bilden können, müssen die Connexine in die Plasmamembranen der ES-Zellen transportiert werden. Mittels Immunfluoreszenzanalysen mit spezifischen Antikörpern können diese in den Membranen benachbarter Zellen indirekt als punktförmige Fluoreszenzsignale sichtbar gemacht werden. Die Connexine Cx31, Cx43 und Cx45 konnten in den Plasmamembranen von embryonalen Stammzellen lokalisiert werden (Abb.4.3 A-C). Wurde eine gleichzeitige Immunfluoreszenzanalyse mit Antikörpern gegen alle drei in ES-Zellen exprimierten Connexine durchgeführt, kam es teilweise zu Überschneidungen der Signale (Abb.4.3 D).

#### **4.1.5 Nachweis der Gap Junction-vermittelten interzellulären Kommunikation**

Weiterhin wurde überprüft, ob die drei in ES-Zellen exprimierten Connexine Gap Junction-Kanäle zwischen benachbarten Zellen ausbilden. Dazu wurde eine Mikroinjektionsanalyse durchgeführt, bei der die niedermolekularen Fluoreszenzfarbstoffe Lucifer Yellow und Ethidiumbromid, sowie der Markierungsstoff Neurobiotin mit einer spitzen Glaskapillare in einzelne embryonale Stammzellen injiziert wurden. Da die Zellmembranen für diese Moleküle nicht permeabel sind, kann eine Ausbreitung der Farbstoffe innerhalb des Zellverbundes als Nachweis Gap Junction-vermittelter Kommunikation gewertet werden (Elfgang et al. 1995). Um die Möglichkeit einer Farbstoffausbreitung über Plasmabrücken auszuschließen, wurde Rhodamin Dextran in die Zellen injiziert. Mit 10 kDa sind Rhodamin Dextran-Moleküle zu groß, um Gap Junction-Kanäle passieren zu können.

Nach der Injektion von Lucifer Yellow, Ethidiumbromid und Neurobiotin konnte eine Diffusion der niedermolekularen Substanzen über Zellgrenzen hinweg beobachtet werden. Im Gegensatz dazu verblieb das applizierte Rhodamin Dextran in den injizierten Zellen (Abb.4.3. F).

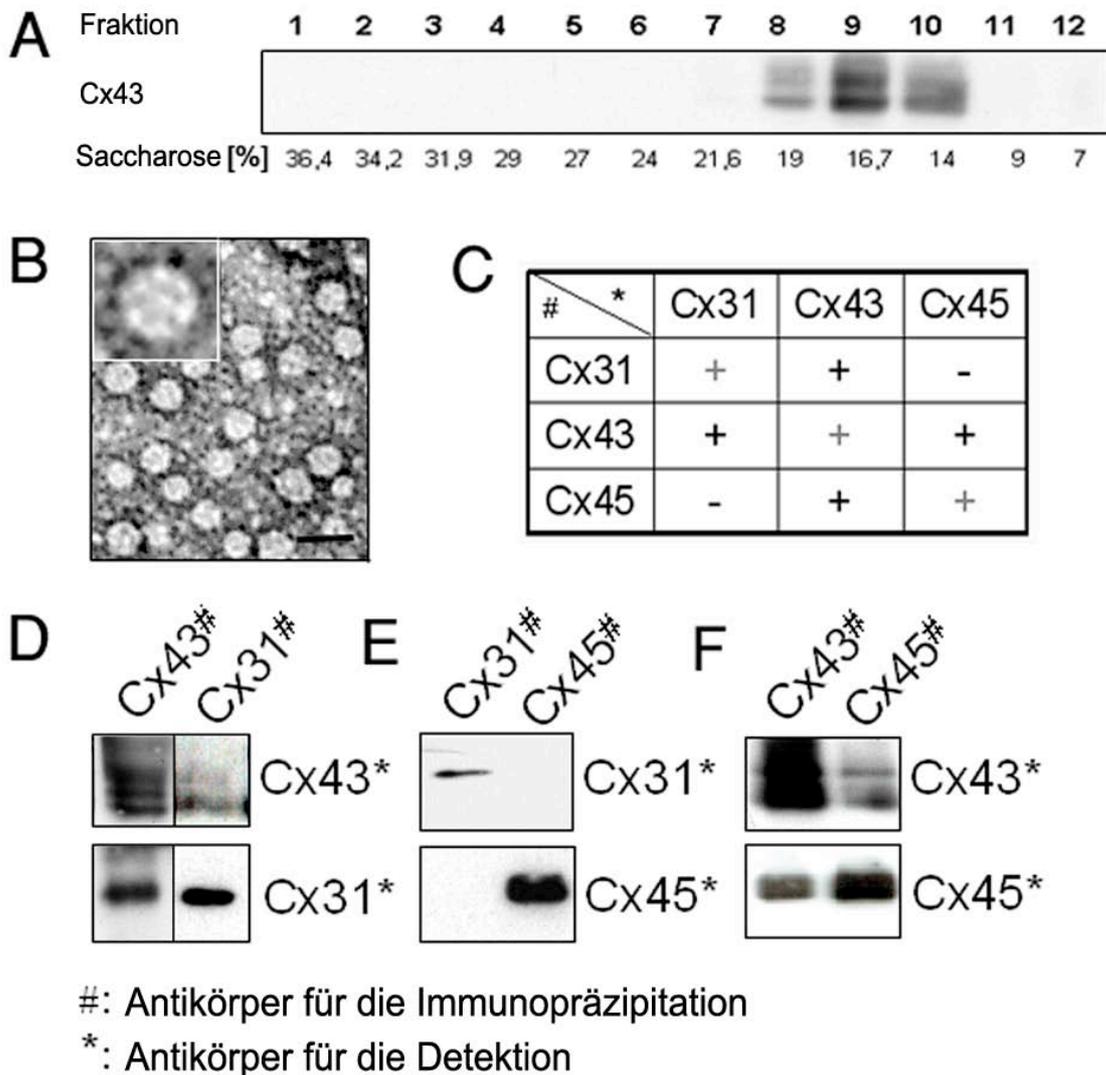


**Abb.4.3: Immunfluoreszenz- und Mikroinjektionsanalysen zum Nachweis von Connexinen und Gap Junction-vermittelter Kommunikation in HM1 Zellen.**

Immunfluoreszenzanalyse zum Nachweis von Cx31 (A), Cx43 (B) und Cx45 (C) in den Plasmamembranen benachbarter Zellen. D zeigt eine Überlagerung der Bilder A-C. Kolokalisierte Signale sind in 1-4 vergrößert dargestellt. E zeigt ein Durchlichtbild des untersuchten ES-Zellklons. F: Demonstration von Gap Junction-vermittelter Kommunikation mittels Mikroinjektion des niedermolekularen Markierungsstoffs Neurobiotin, sowie der Fluoreszenzfarbstoffe Ethidiumbromid, Lucifer Yellow und Rhodamin Dextran. Injizierte Zellen sind mit einem weißen Stern markiert. Größenstandard: 10  $\mu\text{m}$ .

#### **4.1.6 Zusammensetzung der Connexone in ES-Zellen**

Ein Gap Junction-Kanal setzt sich aus zwei Halbkanälen (Connexonen) zusammen, welche aus je sechs Connexinuntereinheiten gebildet werden. Dabei kann ein Halbkanal nicht nur aus den gleichen Connexinisoformen aufgebaut sein (homotypisches Connexon) sondern auch verschiedene Connexinsubtypen beinhalten (heterotypisches Connexon). Im Zuge der Diplomarbeit von Christian Markopoulos (Institut für Genetik, Universität Bonn, 2007) wurde die Zusammensetzung der Connexone in ES-Zellen genauer charakterisiert. Dazu wurden einzelne Halbkanäle mittels Ultrazentrifugation im Saccharosegradienten aus den Membranfraktionen von embryonalen Stammzellen aufgereinigt. Die Fraktionen, welche Connexone beinhalteten, wurden mit Hilfe eines Immunoblots mit spezifischen Cx43-Antikörpern identifiziert (Abb.4.4 A). In Zusammenarbeit mit Dr. Gregor Kirfel (Institut für Zellbiologie, Universität Bonn) konnten die Connexonpartikel mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden (Abb.4.4 B). Anschließend wurden mit den Connexon-haltigen Fraktionen Ko-Immunopräzipitationsexperimente durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Cx31 und Cx43 sowie Cx43 und Cx45 interagieren. Dies war nicht der Fall für Cx31 und Cx45 (Abb. 4.3 C-F).



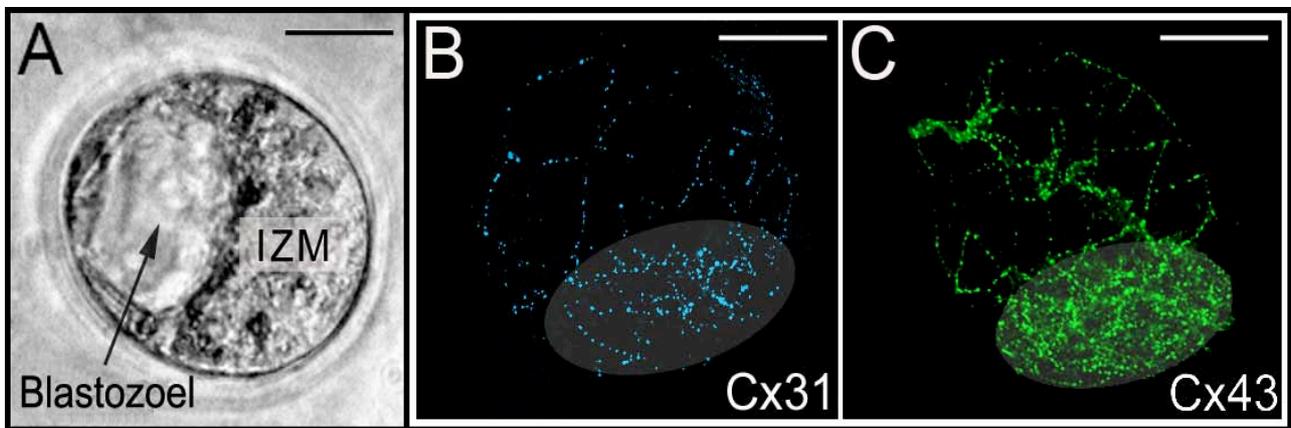
**Abb.4.4: Aufreinigung von Connexonen aus HM1 Zellen und Ko-Immuno- präzipitationsanalysen an Connexon-haltigen Fraktionen.**

A: Bestimmung der Connexon-haltigen Fraktionen mittels Immunoblotanalyse mit Cx43-Antikörpern. B: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Connexonen.

C: Tabellarische Darstellung der Interaktionsmöglichkeiten der untersuchten Connexine innerhalb eines Connexons. D-F: Ko-Immuno- präzipitationsanalysen zum Nachweis von Interaktionen zwischen Cx31, Cx43 und Cx45 innerhalb eines Connexons. Größenstandard in B: 30 nm.

## 4.2 Connexinexpression in C57BL/6-Blastozysten

Um die Expression von Cx31 und Cx43 in Blastozysten zu untersuchen, wurden C57BL/6 Weibchen mit Böcken verpaart. An Tag 3,5 der Schwangerschaft wurden die Uteri präpariert und die Blastozysten ausgespült. Im Anschluss erfolgte eine Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern gegen Cx31 und Cx43. Nach dem Nachweis der Primärantikörper mit fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörpern konnten sowohl für Cx31 als auch für Cx43 punktförmige Fluoreszenzsignale in der inneren wie auch in der äußeren Zellmasse der Blastozysten gefunden werden (Abb. 4.5).



**Abb.4.5: Nachweis der Cx31- und Cx43-Proteinexpression in Blastozysten von C57Bl/6-Mäusen.**

A: Mikroskopische Hellfeldaufnahme einer Blastozyste. B-C: Immunfluoreszenzanalyse zum Nachweis von Cx31 (B) und Cx43 (C). Der Bereich der inneren Zellmasse, wurde in den Aufnahmen B-C nachträglich hell hinterlegt. IZM: Innere Zellmasse, Größenstandard 50  $\mu\text{m}$ .

### **4.3 Untersuchungen zur Funktion Gap Junction-vermittelter Kommunikation in embryonalen Stammzellen der Maus**

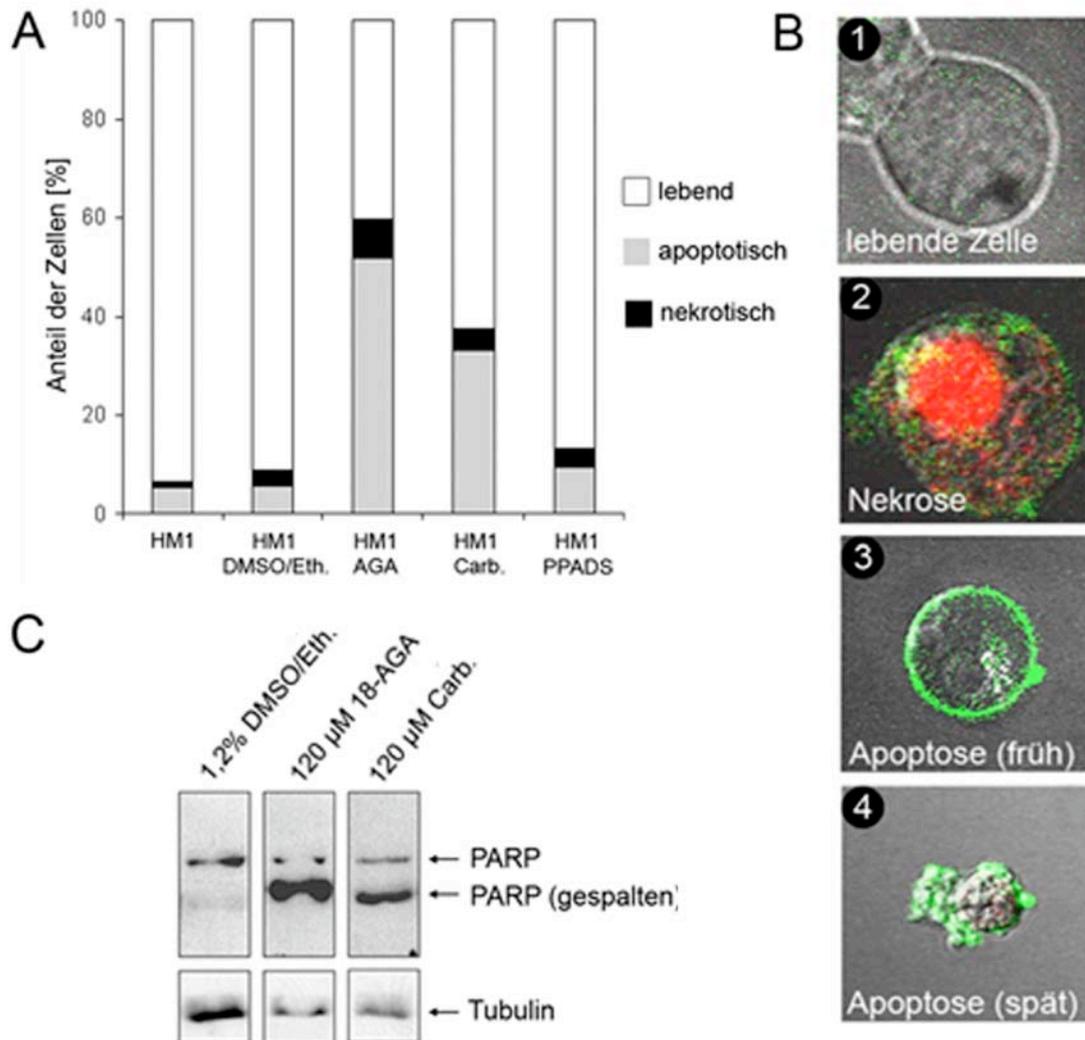
#### **4.3.1 Wirkung pharmakologischer Gap Junction-Inhibitoren auf embryonale Stammzellen**

HM1 ES-Zellen wurden für fünf Stunden mit je 120  $\mu$  M der pharmakologischen Gap Junction-Inhibitoren 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure (18-AGA) und Carbenoxolon behandelt. Dabei war ein Anstieg der Zahl toter Zellen von 10% auf 60% im Falle der Gabe von 18-AGA und auf 40% im Falle von Carbenoxolon zu beobachten. Die Kultur der Zellen in der Gegenwart von 1,2% DMSO, welches in dieser Konzentration als Lösungsmittel für die Inhibitoren im Medium enthalten war, führte nicht zur Erhöhung der Todesrate. Mittels zweier Methoden konnte der gesteigerte Zelltod auf Apoptose zurückgeführt werden. Zum einen wurde mit Hilfe eines kommerziellen AnnexinV-Testverfahrens die Zahl apoptotischer, nekrotischer sowie lebender Zellen innerhalb einer Zellsuspension bestimmt (Abb 4.6 A). AnnexinV bindet an Phosphatidylserin, ein Phospholipid, das normalerweise exklusiv in der inneren Schicht der Doppelmembran von Zellen lokalisiert ist. Diese Ungleichverteilung wird von Phospholipid-Translokatoren (Flippasen) aufrechterhalten und bricht während der Apoptose zusammen. Nun kann Phosphatidylserin an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Da die Analyse an unfixierten Zellen in Suspension durchgeführt wurde, färbt AnnexinV lebende Zellen nicht an, da es die Zellmembran nicht durchdringen kann. Zusätzlich wird eine Propidiumiodid-Färbung durchgeführt, um apoptotische Zellen von nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Propidiumiodid dringt nicht in lebende und apoptotische Zellen ein, interkaliert jedoch in die DNA nekrotischer Zellen. Deren Zellmembranen sind nicht mehr intakt und daher für den Fluoreszenzfarbstoff permeabel. Darüber hinaus sind apoptotische Zellen daran zu erkennen, dass sie während des programmierten Zelltodes schrumpfen und ihre Membran in Vesikel zerfällt. Nekrotische Zellen wirken hingegen aufgebläht (Abb. 4.6 B).

Zusätzlich zur AnnexinV-Färbung wurde mittels eines spezifischen Antikörpers gespaltene PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) nachgewiesen (Abb. 4.6 C). Die Spaltung des an der DNA-Reparatur beteiligten Proteins durch die Caspase3 stellt ein frühes Ereignis im Prozess der Einleitung der Apoptose dar.

In der Literatur wird ein antagonistischer Effekt von 18-AGA auf P2 Rezeptoren beschrieben. Deshalb wurden die Zellen neben den pharmakologischen Gap Junction-Inhibitoren außerdem mit dem P2 Rezeptor-Antagonisten PPADS behandelt. Dabei war

kein signifikanter Anstieg der Apoptoserate zu beobachten.



**Abb.4.6: Nachweis des apoptotischen Zelltods nach Behandlung von HM1 Zellen mit den pharmakologischen Gap Junction-Inhibitoren 18-AGA und Carbenoxolon.**

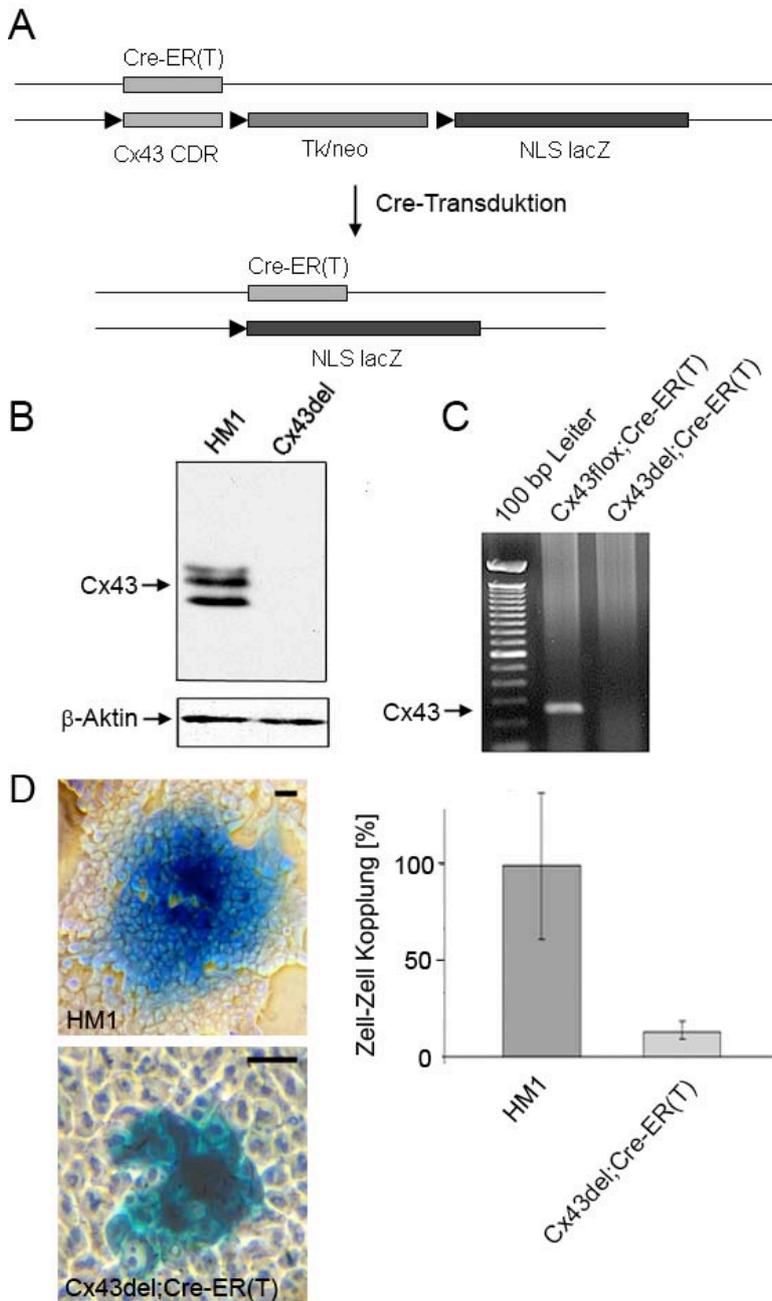
A: AnnexinV-Test zum Nachweis von Apoptose und Nekrose an unfixierten Zellen in Suspension. B: Beispiele für Morphologie und Färbung lebender (1), nekrotischer (2) und apoptotischer (3-4) Zellen nach AnnexinV- und Propidiumiodid-Färbung. C: Immunoblotanalyse zur Detektion von gespaltenen PARP.

### **4.3.2 Blockade der Gap Junction-vermittelten Kommunikation in ES-Zellen durch Deletion von Cx43 und Herunterregulation von Cx31 und Cx45 mittels siRNA**

Die in Kapitel 4.3.1 beschriebenen Experimente gaben Hinweis auf eine wichtige Rolle von Connexinen beim Schutz embryonaler Stammzellen vor dem apoptotischen Zelltod. Um die Beobachtungen, die unter dem Einfluss pharmakologischer Inhibitoren gemacht worden waren, zu bestätigen, wurden weitere Experimente durchgeführt. Ziel war es dabei, die Zell-Zell-Kommunikation in embryonalen Stammzellen durch eine Kombination aus vollständiger Deletion von Cx43 und siRNA-vermittelter Herunterregulation von Cx31 und Cx45 weitestgehend zu unterbinden.

#### **4.3.2.1 Herstellung Cx43-defizienter ES-Zellen**

Ausgangspunkt für die Herstellung Cx43-defizienter ES-Zellen war eine Zelllinie (Cx43floxCre-ER(T)), welche von Dr. Dominik Eckardt im Rahmen seiner Dissertation erzeugt wurde. In diesen Zellen wurde Cx43 auf einem Allel durch eine induzierbare Cre-Rekombinase ersetzt. Auf dem anderen Allel liegt Cx43 flankiert von loxP-Stellen vor. Dem geflochtenen Cx43 folgt eine Neomycin-Selektionskassette, die ebenfalls von loxP-Stellen flankiert ist, sowie eine lacZ-Reportersequenz (Abb.4.7 A). Die ES-Zellen wurden mit einer membrangängigen Cre-Rekombinase transduziert und klonal ausgesät. Im Anschluss konnten einzelne Klone isoliert und mittels PCR- und Immunoblot-Analyse charakterisiert werden (Abb.4.7 B-C). Eine der Cx43-defizienten Zelllinien (Cx43delCre-ER(T)) wurde für die weiteren Experimente ausgewählt. Nach Mikroinjektion von Neurobiotin zeigten die Cx43delCreER(T) Zellen, verglichen mit HM1 Zellen, eine Reduktion in der Ausbreitung des Markierungsstoffes auf 10% (Abb.4.7 D). Darüber hinaus wiesen die Cx43-defizienten ES-Zellen keine Auffälligkeiten bezüglich ihres Zellwachstums oder ihrer Zellmorphologie auf.



**Abb.4.7: Erzeugung und Charakterisierung der Cx43-defizienten ES-Zelllinie (Cx43delCre-ER(T)).**

A: Schematische Darstellung des Cx43-Lokus vor und nach der Cre-Protein-Transduktion. B-C: Immunoblot- und PCR-Analyse zur Detektion der Deletion von Cx43.

D: Mikroinjektionsanalyse (Neurobiotin) zur Bestimmung der Auswirkung der Deletion von Cx43 auf die Zell-Zell-Kommunikation in ES-Zellen. Größenstandard: 10 µm.

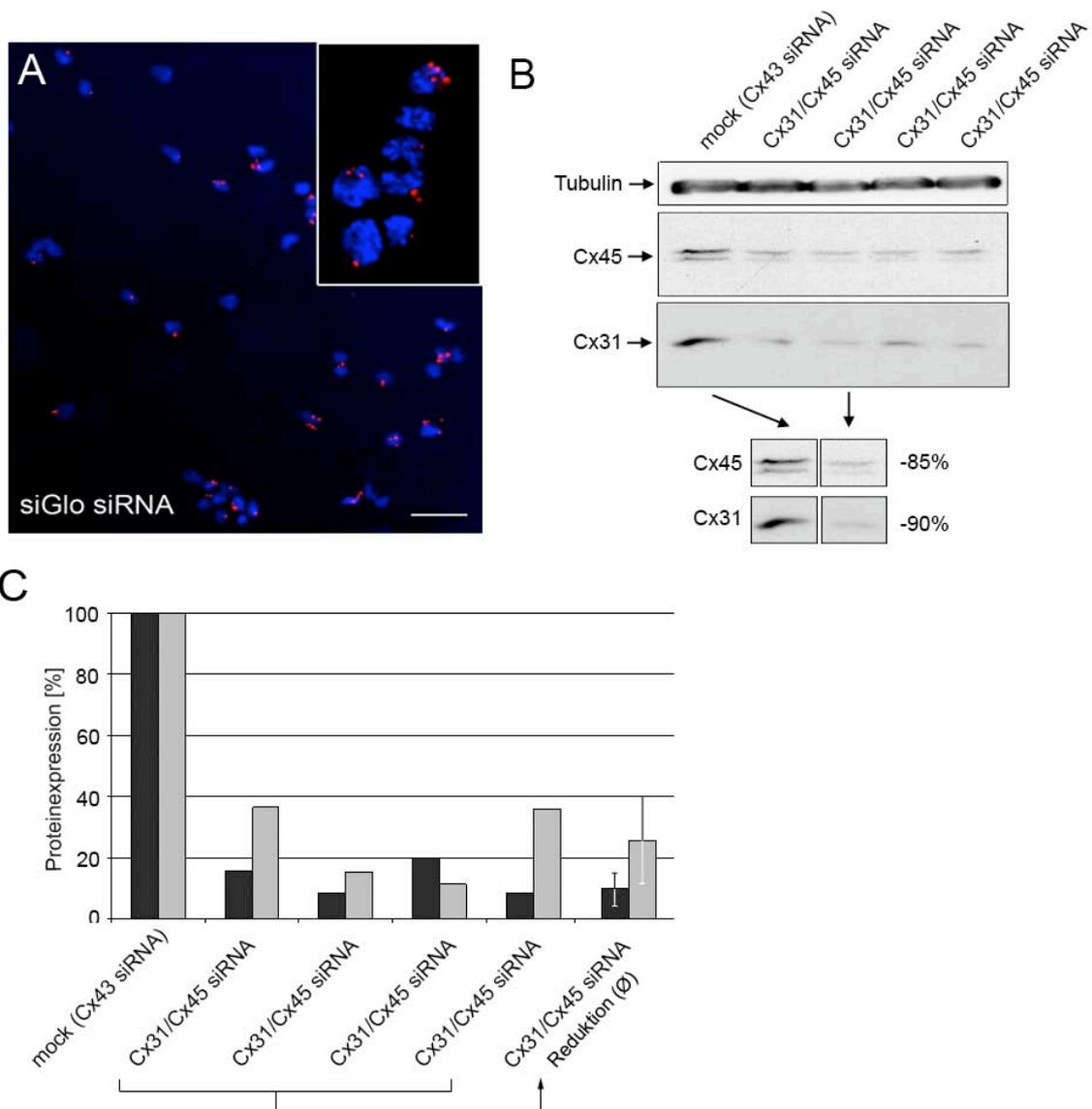
#### **4.3.2.2 Herabregulation von Cx31 und Cx45 in Cx43-defizienten ES-Zellen mittels siRNA**

Die komplette Deletion von Cx43 in embryonalen Stammzellen der Maus führte zu einer Verminderung der Gap Junction-vermittelten Kommunikation um 90%. Um die Zell-Zell-Kopplung weiter zu reduzieren, sollte zusätzlich die Expression der Connexine Cx31 und Cx45 mittels siRNAs unterbunden werden.

Um die erfolgreiche Transfektion der Zellen nachzuweisen und ein optimales Transfektionsprotokoll zu etablieren, wurden zunächst fluoreszenzmarkierte siGlo-siRNAs (Dharmacon) in die ES-Zellen eingebracht. Dabei wurden die kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien DharmaFect1 bis DharmaFect4 (Dharmacon) in verschiedenen Konzentrationen getestet. Bei der Verwendung von DharmaFect1 (5% v/v) konnten bei minimaler Zytotoxizität konzentrationsabhängig Transfektionsraten von bis zu 90% erreicht werden (Abb.4.8 A).

Anschließend wurde mit Hilfe des Transfektionsreagenzes DharmaFect1 Connexin31 und Connexin45 smartPOOL-siRNA (Gemische aus vier siRNAs) in die Zellen eingebracht. Eine gleichzeitige Transfektion der Zellen mit beiden siRNA-Gemischen (100nM Cx31 siRNA und 70 nM Cx45 siRNA) führte zu einer maximalen Reduktion des Cx31 Proteins auf 10% und des Cx45 Proteins auf 15%. Durchschnittlich wurde eine Verringerung der Proteinmenge von Cx31 um 87% und von Cx45 um 75% erreicht. Dies konnte mittels Immunoblotanalysen unter Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (Abb.4.8 B-C). Die Reduktion der Proteinmenge wurde anhand der Stärke der Banden auf dem Röntgenfilm mit der Software EasyWin32 (Herolab) quantifiziert.

96 Stunden nach der Transfektion mit siRNAs gegen Cx31 und Cx45 wurde Neurobiotin in die Cx43delCre-ER(T) Zellen mikroinjiziert. Dabei konnte eine Reduktion der Zell-Zell-Kommunikation um 50% im Vergleich zu untransfizierten Cx43-defizienten ES-Zellen beobachtet werden. Im Mittel blieben fünf ES-Zellen funktionell miteinander gekoppelt (Abb.4.9 A-E). Bei 50% der injizierten Zellen war eine komplette Entkopplung zu beobachten (Abb.4.9 E). Verglichen mit HM1 Zellen ergab sich eine Reduktion der Gap Junction-vermittelten Kommunikation um 95%.

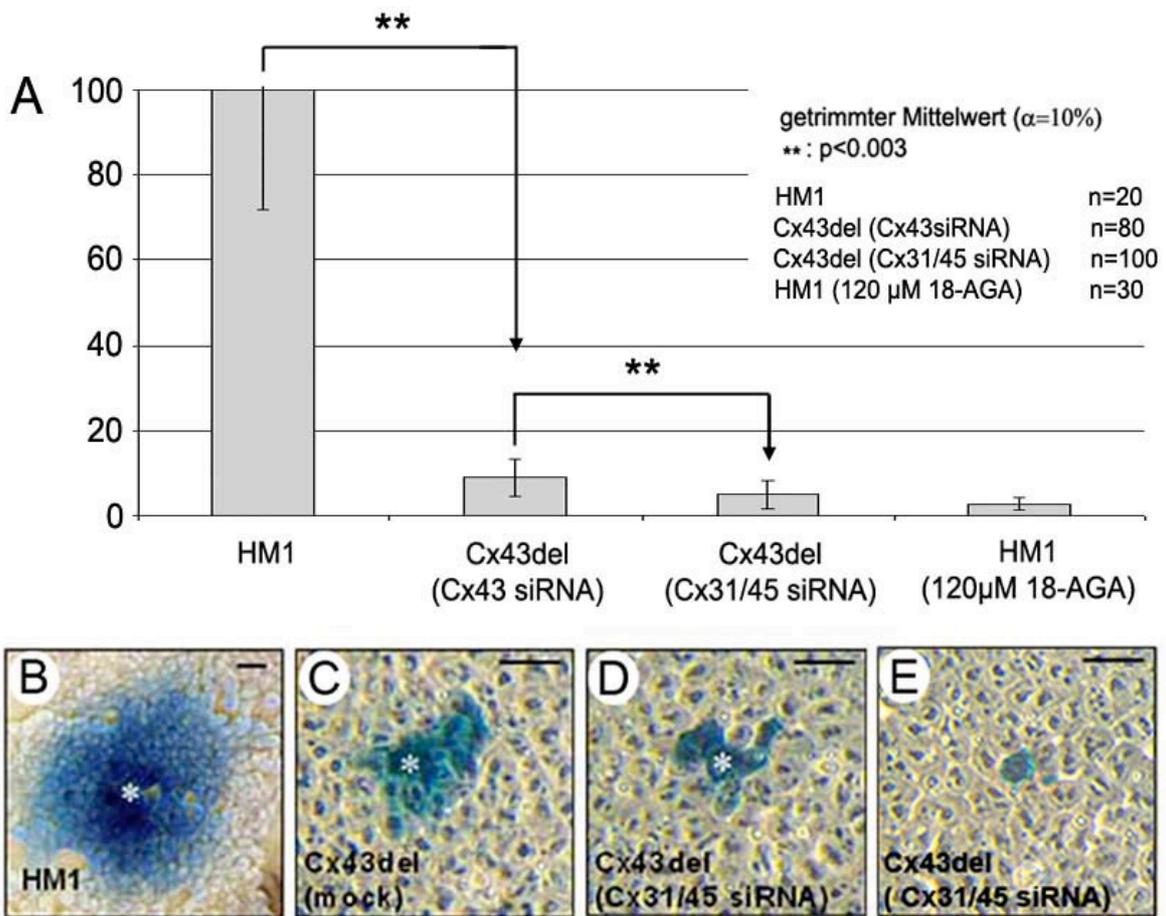


**Abb.4.8: Transfektion von Cx31 und Cx45 siRNA in Cx43-defiziente ES-Zellen.**

A: Zum Test der Transfektionseffizienz wurden fluoreszenzmarkierte siGlo-siRNAs (rot) in ES-Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde eine Hoechst-Kernfärbung (blau) durchgeführt. Die Aufnahmen entstanden an transfizierten Zellen in Suspension unter einem Fluoreszenzmikroskop. Größenstandard: 50 µm.

B : Immunoblotanalyse mit Antikörpern gegen Cx31 und Cx45 zum Nachweis der Proteinreduktion, 48 Stunden nach Transfektion der ES-Zellen mit siRNAs. Maximal konnte eine Reduktion von Cx31 um 90% und Cx45 um 85% erreicht werden.

C: Quantifizierung und graphische Darstellung der Ergebnisse des Immunoblots (B). schwarze Balken: Cx31, graue Balken: Cx45. Dargestellt sind die Proteinexpression in mit Cx43 siRNA behandelten Kontrollzellen, sowie aus vier unabhängig durchgeführten Experimenten mit Cx31 und Cx45 siRNA . Außerdem ist die durchschnittliche Reduktion der vier Experimente aufgeführt.



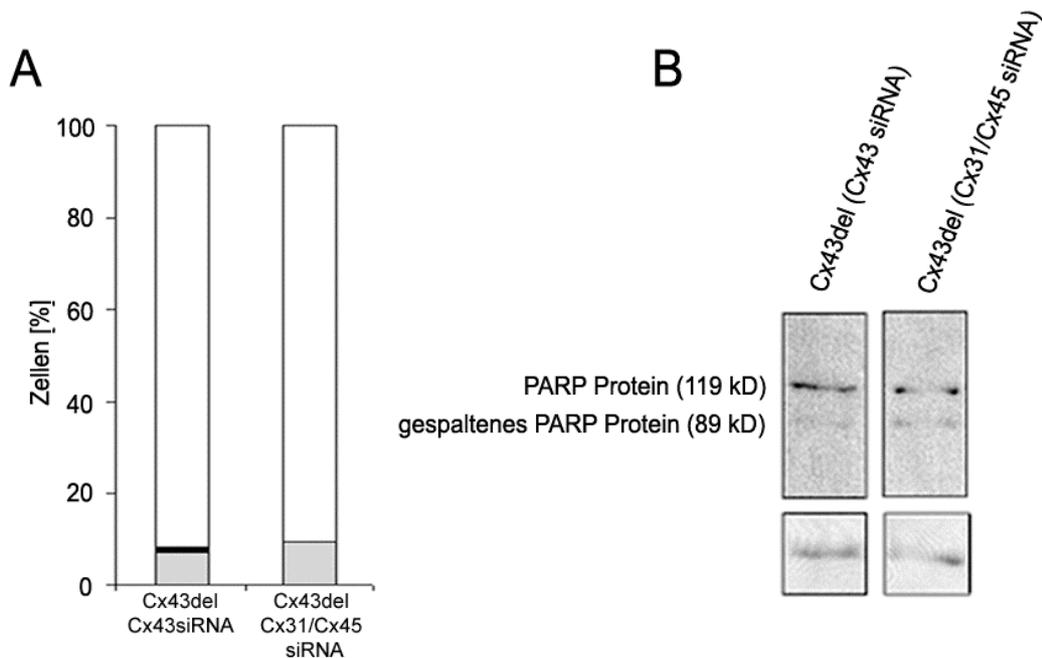
**Abb. 4.9: Mikroinjektionsanalyse zur Quantifizierung der Gap Junction-vermittelten Zell-Zell-Kommunikation in ES-Zellen.**

A: graphische Darstellung der Ergebnisse der Mikroinjektionsanalyse.

B: mikroinjizierte HM1 Zellen. C: mikroinjizierte Cx43-defiziente ES-Zellen, die mit Cx43-smartPOOL-siRNA transfiziert wurden. D-E: mikroinjizierte Cx43delCre-ER(T) Zellen nach der Doppeltransfektion mit Cx31- und Cx45-smartPOOL-siRNA. E: bei 50% der mit Cx31- und Cx45-siRNAs transfizierten Zellen war eine komplette Entkopplung zu beobachten. Größenstandard: 15 μm.

Die Blaufärbung der Zellen entsteht durch den histochemischen Nachweis des injizierten Neurobiotins mittels Avidin-Peroxidase-Kopplung und HistoGreen-Färbung.

Trotz der starken Reduktion der Gap Junction-vermittelter Kommunikation um 95% konnte kein Anstieg der Apoptoserate beobachtet werden. Dies wurde mittels eines AnnexinV-Test und einer PARP-Immunoblotanalyse gezeigt (Abb.4.10 A-B). Auch morphologisch wiesen die Zellen keine augenscheinlichen Veränderungen zu den mit Cx43 siRNA transfizierten Kontrollzellen auf.



**Abb. 4.10: Bestimmung der Apoptoseraten in Cx43-defizienten ES-Zellen nach der Transfektion mit Cx43-siRNA (Kontrolle) sowie der Doppeltransfektion mit Cx31- und Cx45-siRNA.**

A: Graphische Darstellung der Ergebnisse des AnnexinV-Tests (grau: apoptotische Zellen, schwarz: nekrotische Zellen, weiß: lebende Zellen)

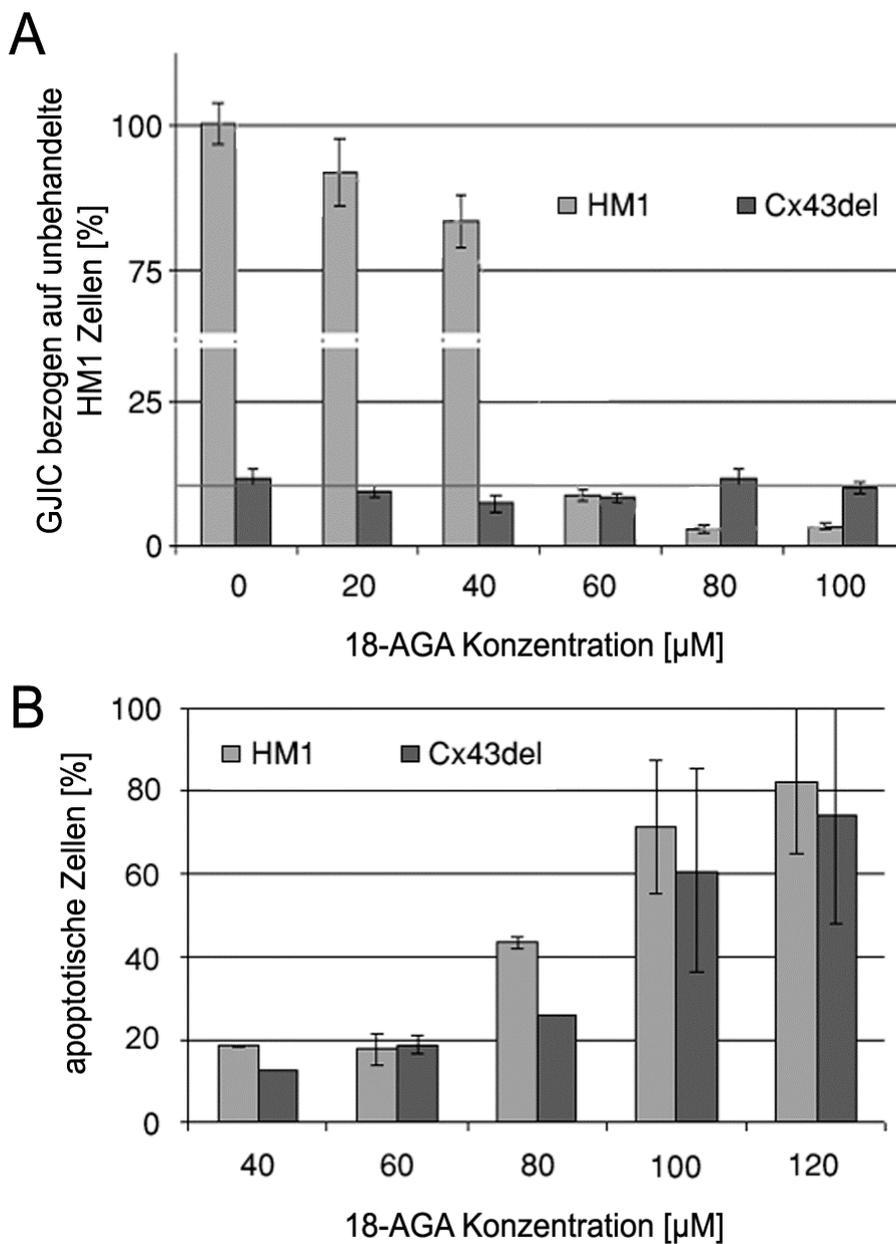
B: Immunoblotanalyse mit spezifischen Antikörpern gegen das PARP-Protein.

#### **4.3.4 Untersuchungen zur Wirkweise pharmakologischer Gap Junction-Blocker auf embryonale Stammzellen**

Bei der Behandlung embryonaler Stammzellen mit pharmakologischen Gap Junction-Inhibitoren und der siRNA-vermittelten Herabregulation von Cx31 und Cx45 in Cx43delCreER(T) Zellen wird eine vergleichbar starke Reduktion der Gap Junction-vermittelten Zell-Zell-Kopplung erreicht. Trotzdem ist bei den mit siRNAs transfizierten Zellen kein Anstieg der Apoptoserate zu beobachten, obwohl dies bei den mit 18-AGA bzw. Carbenoxolon behandelten HM1 Zellen der Fall war (Abb.4.6). Um diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen erklären zu können, wurde die Wirkungsweise der pharmakologischen Gap Junction-Inhibitoren auf embryonale Stammzellen näher untersucht.

In einem ersten Experiment, wurde der Effekt von 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure auf die Ausbreitung von mikroinjiziertem Neurobiotin innerhalb eines ES-Zellverbands, in Abhängigkeit der eingesetzten 18-AGA-Konzentration, bestimmt. Dieses Experiment wurde sowohl mit HM1 ES-Zellen als auch mit Cx43-defizienten ES-Zellen durchgeführt. Im Falle der HM1 Zellen war erstmals bei einer Konzentration von 60  $\mu$ M 18-AGA eine starke Reduktion der Neurobiotin-Ausbreitung zu beobachten. Eine weitere Erhöhung der Inhibitorkonzentration auf 80  $\mu$ M führte zu einer maximalen Reduktion der interzellulären Kommunikation auf 4% der ursprünglichen Kopplung. Höhere Konzentrationen führten zu keiner weiteren Verminderung (Abb.4.11 A). Interessanterweise hatte die Zugabe von 18-AGA zu Cx43delCre-ER(T) Zellen selbst in hoher Konzentration (100  $\mu$ M) keinerlei Auswirkungen auf den interzellulären Transfer von Neurobiotin (Abb.4.11 A). Darüber hinaus war die Kopplung zwischen HM1 Zellen bei einer Gabe von mehr als 60  $\mu$ M 18-AGA stärker reduziert als wie zuvor bei Cx43del ES-Zellen beobachtet.

In einem zweiten Experiment wurde das Ausmaß der Apoptose mit steigender Konzentration des Gap Junction-Inhibitors 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure untersucht. Eine Erhöhung der Apoptoserate bei HM1 Zellen war erstmals bei einer Gabe von 80  $\mu$ M 18-AGA zu beobachten. Erhöht man die Konzentration auf 100  $\mu$ M bzw. 120  $\mu$ M steigt auch die Apoptoserate weiter an. Gleiches ist auch bei den Cx43-defizienten ES-Zellen zu beobachten (Abb.4.11 B).



**Abb. 4.11: Untersuchung der Wirkungsweise des Gap Junction-Inhibitors 18-AGA auf HM1 Zellen und Cx43delCre-ER(T) Zellen.**

A: Graphische Darstellung des Einflusses von 18-AGA auf die Gap Junction-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation (GJIC) zwischen HM1 und Cx43delCre-ER(T) Zellen, gemessen am Transfer von injiziertem Neurobiotin.

B: Graphische Darstellung des konzentrationsabhängigen Einflusses von 18-AGA auf die Apoptoseraten von HM1 und Cx43delCre-ER(T) Zellen.

#### **4.4 Herstellung Cx43/Cx45-doppeldefizienter embryonaler Stammzellen.**

Neben der Funktion der Connexine in embryonalen Stammzellen sollte ebenfalls ihre Rolle während der Differenzierung von ES-Zellen untersucht werden. Gerade Cx43 und Cx45 sind dabei interessant, da diese Connexine sowohl in ES-Zellen als auch in Kardiomyozyten ausgeprägt werden (Oyamada et al., 1996). Auch während der neuralen Differenzierung sind beide Connexine koexprimiert.

Die Expression der Connexine Cx31 und Cx45 konnte mittels siRNA in embryonalen Stammzellen effizient reduziert werden. Problematisch ist dabei jedoch, dass der Effekt lediglich 4-6 Tage anhält. Differenzierungsexperimente zur Erzeugung von Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) oder Neuronen dauern jedoch mit 8-20 Tagen deutlich länger. Darüber hinaus führt der Einsatz von siRNA immer nur zu einer Reduktion der entsprechenden mRNA, wobei eine gewisse Restexpression der Connexine zwischen 10 und 20% erhalten bleibt.

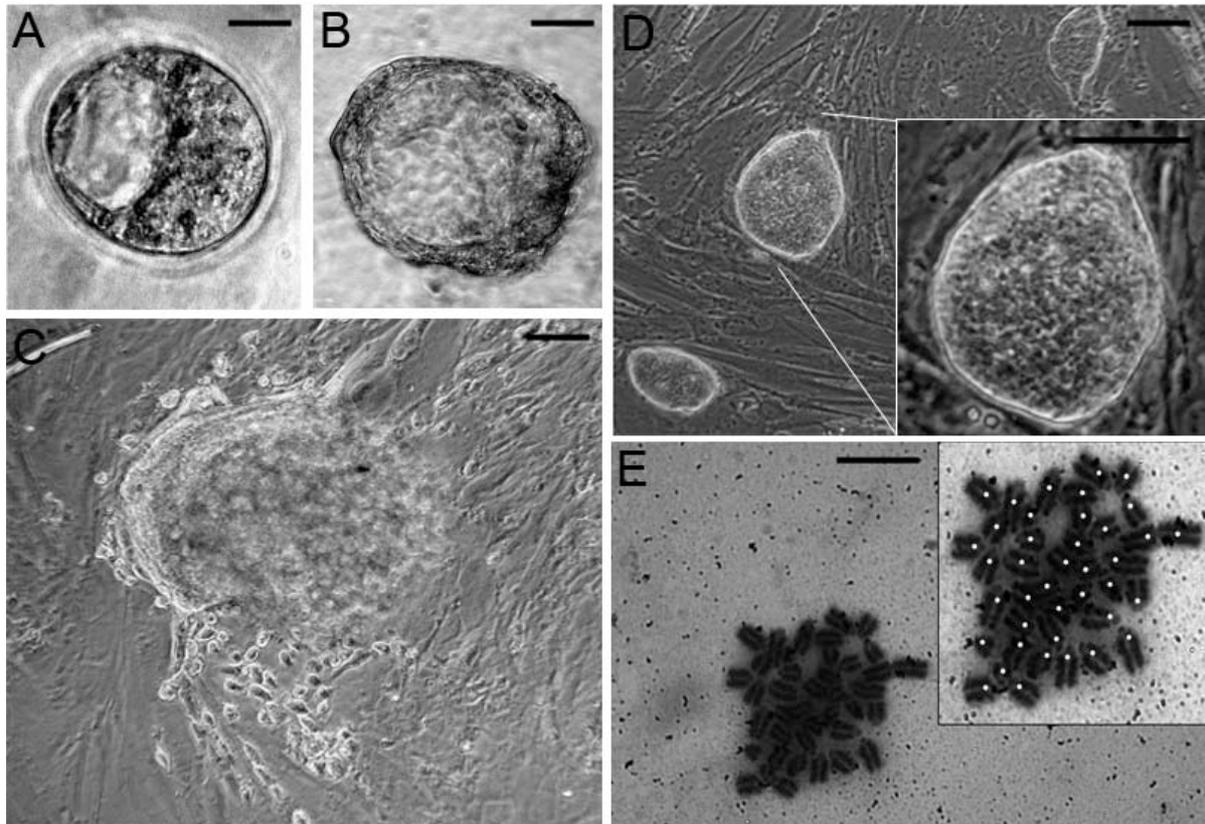
Um die Funktion von Cx43 und Cx45 während der ES-Zelldifferenzierung untersuchen zu können, wurde eine Cx43/Cx45-defiziente ES-Zelllinie hergestellt. Zu diesem Zweck wurden zuerst ES-Zellen aus Blastozysten isoliert, welche aus Verpaarungen von Cx43<sup>flox/+</sup>;Cx45<sup>flox/flox</sup> Mäusen hervorgegangen waren. Diese Tiere stammten aus Kreuzungen einer Cx43<sup>flox/flox</sup>-Mauslinie (Eckardt et al., 2004) mit einer Cx45<sup>flox/flox</sup>-Mauslinie (Maxeiner et al., 2005). In den isolierten ES-Zellen liegen die Connexine Cx43 und Cx45 homozygot von loxP-Stellen flankiert vor. Um Connexin-defiziente ES-Zellen zu erhalten, wurden anschließend Cx43 und Cx45 mit Hilfe einer transduzierbaren Cre-Rekombinase deletiert.

##### **4.4.1 Isolation embryonaler Stammzellen aus Blastozysten**

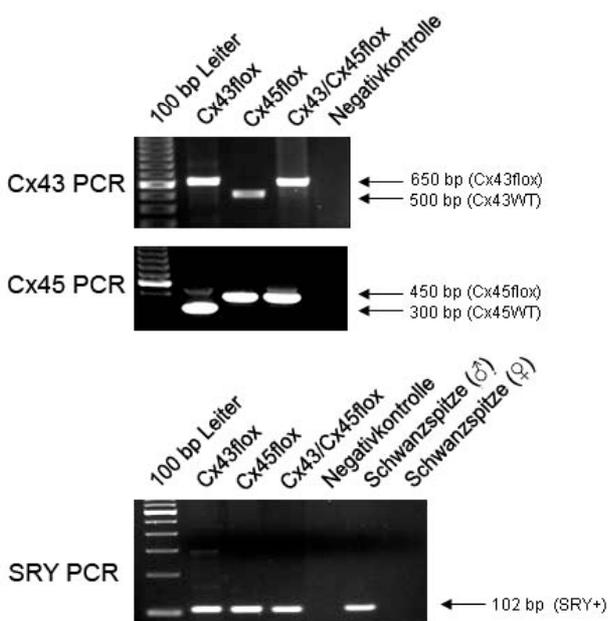
Um in einem Experiment sowohl Cx45<sup>flox/flox</sup> als auch Cx43/Cx45<sup>flox/flox</sup> ES-Zellen isolieren zu können wurden superovulierte Cx43<sup>flox/+</sup>;Cx45<sup>flox/flox</sup> Weibchen mit Männchen des selben Genotyps verpaart. Dreieinhalb Tage nach der Begattung wurden die Weibchen getötet, die Uteri entnommen und die Embryonen mittels einer Spritze ausgespült. Dabei konnten aus fünf schwangeren Mäusen 16 Blastozysten und 40 Morulae isoliert werden. Diese wurden anschließend einzeln in Vertiefungen einer 48-Lochplatte gegeben (Abb.4.12 A). In die Vertiefungen war am Vortag eine Nährzellschicht aus teilungsdefizienten embryonalen Mausfibroblasten ausgesät worden. Die Morulae entwickelten sich in den nächsten Tagen *in vitro* zu Blastozysten. Nach ein bis zwei Tagen

in Kultur schlüpfen die Blastozysten aus der sie umgebenden *zona pelucida*. Von ursprünglich 56 isolierten Embryonen hefteten sich 33 an die Nährzellschicht an (Abb.4.12 B) und in den folgenden Tagen begannen sich die adhärenen Zellen zu teilen. Nach sechs bis acht Tagen hatten sich die Zellen der inneren Zellmasse so weit vervielfacht (Abb. 4.12 C), dass sie nun mittels Trypsin vereinzelt und in neue Vertiefungen einer 24-Lochplatte überführt werden konnten. Nach weiteren vier bis sieben Tagen wurden erste Kolonien embryonaler Stammzellen sichtbar. Die ES-Zellen zeigten eine typische, kugelige Zellmorphologie und wuchsen dicht gepackt in runden bis ovalen Kolonien mit scharf begrenzten Rändern (Abb.4.12 D). Zudem wiesen sie einen normalen Karyotyp mit 40 Chromosomen (38+XY) auf (Abb.4.12 E). Die embryonalen Stammzellen wurden expandiert und mittels PCR-Analyse genotypisiert. Dabei wurden Cx43flox/flox;Cx45flox/flox, Cx43flox/+;Cx45flox/flox sowie Cx43+/+;Cx45flox/flox Zelllinien im erwarteten Mendelschen-Verhältnis von 1:2:1 vorgefunden. Im Anschluss wurde mit Hilfe einer SRY-PCR das Geschlecht der Zellen bestimmt und je eine männliche ES-Zelllinie jedes Genotyps ausgewählt (Abb.4.13).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden sechs Blastozysten aus schwangeren Cx43flox/flox-Weibchen isoliert, welche zuvor mit Cx43flox/flox-Männchen verpaart wurden. Aus diesen Embryonen wurde eine Cx43flox/flox ES-Zelllinie gewonnen.



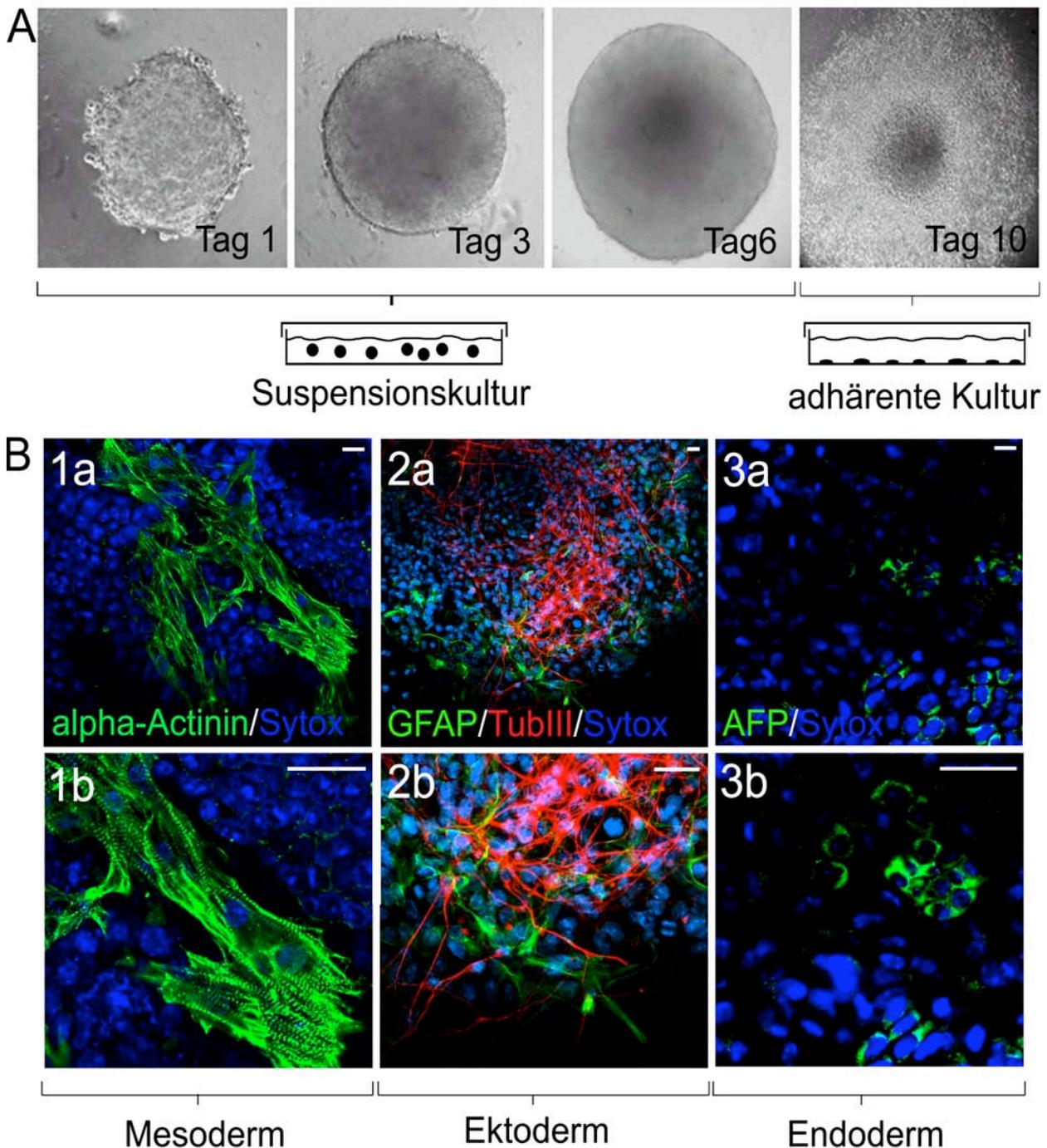
**Abb.4.12: Isolation embryonaler Stammzellen aus Blastozysten transgener Mäuse.** A: Blastozyste umgeben von der *zona pelucida*. B: Auf embryonalen Mausfibroblasten angewachsener Embryo. Die Nährzellschicht ist außerhalb des Focus der Kamera und deshalb nur unscharf zu erkennen. C: Adhärenter Embryo mit expandierter innerer Zellmasse. D: Embryonale Stammzellkolonien (Genotyp Cx43flox/flox;Cx45flox/flox) auf einer Schicht inaktivierter embryonaler Mausfibroblasten. E: Giemsa-Färbung der kondensierten Chromosomen zur Kontrolle der Chromosomenzahl (38+XY). Größenstandard: A-D: 50µm, E: 5µm



**Abb.4.13: PCR-Analysen zur Genotypisierung embryonaler Stammzellen und zur Geschlechtsbestimmung.** Gezeigt sind die Ergebnisse der Zelllinien, die für weitere Experimente ausgewählt wurden. Die SRY-PCR (Han et al., 1993) weist das SRY Gen auf dem Y-Chromosom männlicher Zellen mit einer Bande bei 102 bp nach.

#### 4.4.2 Differenzierungspotential der Cx43/Cx45flox ES-Zellen

Um nachzuweisen, dass sich die isolierten embryonalen Stammzellen in Zellen aller drei Keimblätter (Mesoderm, Ektoderm und Endoderm) entwickeln können, wurden die ES-Zellen in Kardiomyozyten (Mesoderm), Neuronen und Astrozyten (Ektoderm) sowie in  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) positive Zellen (Endoderm) differenziert. Dazu wurden die Zellen in Medium ohne LIF aufgenommen und in nicht adhäsive Bakterienkulturschalen ausgesät. Da ein Anwachsen der ES-Zellen am Boden dieser Schalen nicht möglich ist lagern sie sich zu Aggregaten zusammen, welche frei im Medium schwimmen. Man bezeichnet diese Aggregate als Embryonalkörperchen (Abb.4.14 A). Die Embryonalkörperchen wurden für insgesamt sechs Tage in Suspension kultiviert. In dieser Zeit differenzieren die äußeren Zellen in primitives und später viszerales Endoderm, während die Zellen im Inneren der Aggregate durch Apoptose absterben. Es bildet sich ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum, der von einer Epithelschicht ausgekleidet ist. Aus diesem primitiven Ektoderm entwickeln sich die drei Keimblätter Mesoderm, Ektoderm und Endoderm. Die sechs Tage alten Embryonalkörperchen werden anschließend auf mit Gelatine beschichtete Zellkulturschalen überführt und wachsen an deren Oberfläche an (Abb.4.14. A). Nach weiteren zwei bis vier Tagen sind erste, spontan kontrahierende Kardiomyozyten unter dem Mikroskop zu erkennen. Zum Nachweis von Muskelzellen wurden diese mittels spezifischer  $\alpha$ -Aktinin-Antikörper markiert und durch fluoreszierende Sekundärantikörper sichtbar gemacht (Abb.4.14 B 1a-1b). Ab dem vierten Tag nach dem Anwachsen auf den Kulturschalen konnten TubIII positive neuronale Zellen, ab dem achten Tag GFAP-positive Astrozyten mittels Immunfluoreszenzanalyse nachgewiesen werden. (Abb.4.14 B 2a-2b). Nach zehn Tagen waren endodermale Zellen mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen  $\alpha$ -Fetoprotein nachweisbar (Abb.4.14 B 3a-3b).



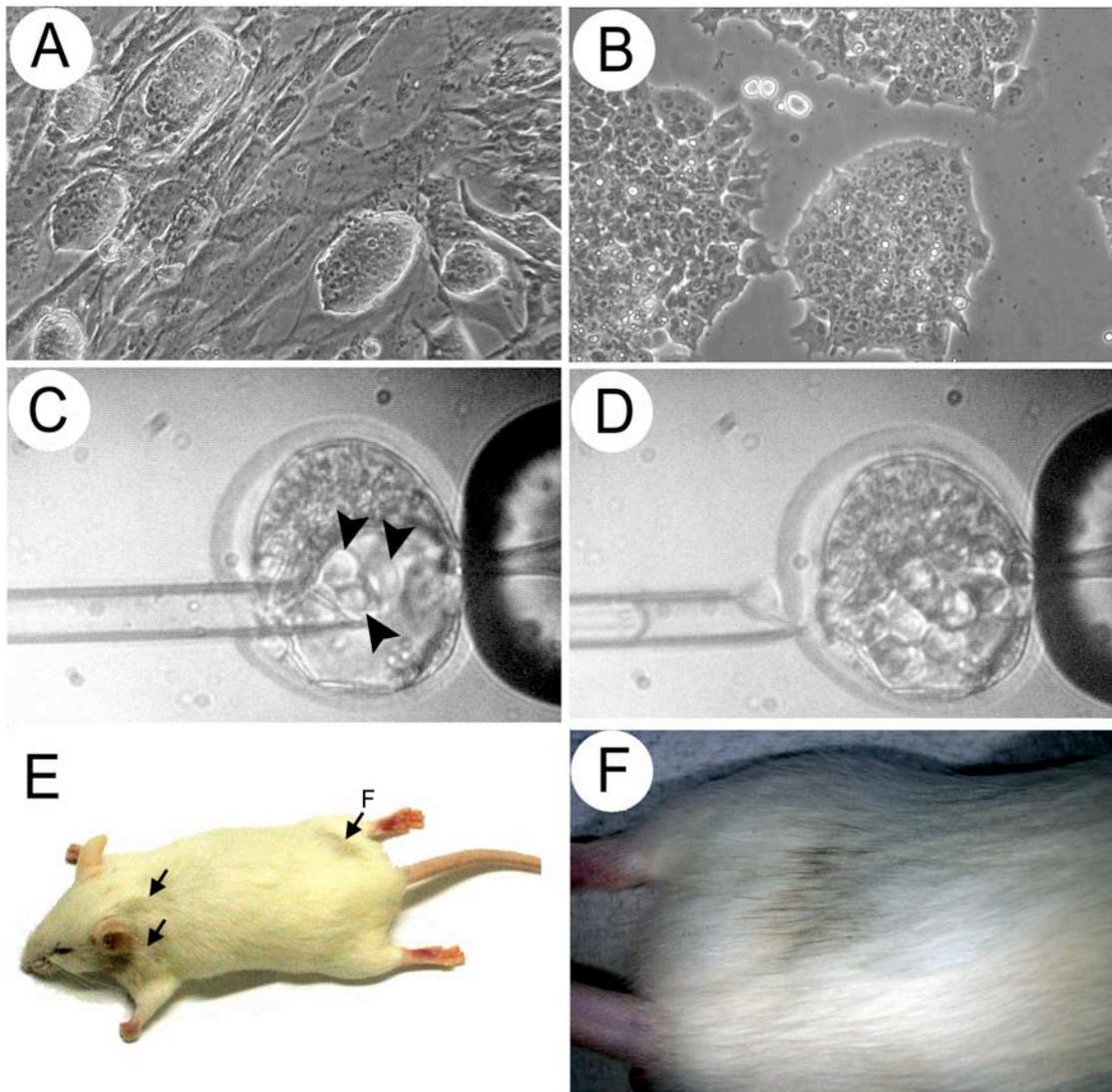
**Abb.4.14: Differenzierung der isolierten Cx43/Cx45flox ES-Zellen in Zellen der drei Keimblätter (Mesoderm, Ektoderm und Endoderm).**

A: Embryonalkörperchen an Tag 1, Tag 3 und Tag 6 in Suspensionskultur bzw. vier Tage nach Anwachsen am Boden der Kulturschale (Tag 10).

B: Immunfluoreszenzanalyse zum Nachweis von Muskelzellen (1a-1b), Neuronen und Astrozyten (2a-2b) sowie AFP-positiven endodermalen Zellen (3a-3b). In b ist jeweils ein vergrößerter Ausschnitt von a abgebildet. Größenstandard: 20 µm.

#### **4.4.3 Injektionen der Cx43/Cx45flox ES-Zellen in Blastozysten von swiss webster (CFW) Mäusen**

Um das Potential der Cx43/Cx45flox Zellen zu bestimmen, wurden neben den *in vitro* Differenzierungsstudien ebenfalls Injektionen der embryonalen Stammzellen in Blastozysten von Swiss Webster (CFW) Mäusen durchgeführt. Swiss Webster Mäuse eignen sich besonders gut für die Injektion von C57Bl/6 ES-Zellen (Dr. Michele Boiani, MPI für molekulare Biomedizin, Münster, persönliche Mitteilung) und wurden daher für die Experimente verwendet. Da die Cx43/Cx45flox ES-Zellen aus C57BL/6-Mäusen isoliert wurden, die ein schwarzes Fell besitzen und in Swiss Webster (CFW) albino Blastozysten injiziert wurden, ergeben sich bei erfolgreicher Integration der injizierten Zellen in den Empfängerembryo Chimären mit schwarz-weißer Fellfarbe. Der Schwarzanteil zeigt dabei den Beitrags der injizierten Zellen zum chimären Organismus an. Tragen die injizierten Zellen zur Bildung der Keimzellen der Chimäre bei, wird ihr Genotyp in die nächste Generation vererbt. Man bezeichnet die embryonalen Stammzellen dann als keimbahngängig. Nach der Injektion der Cx43/Cx45flox ES-Zellen in Swiss Webster (CFW) Blastozysten wurde aus zwei Würfen eine chimäre Maus mit einem relativ geringen Grad an Fellfarbenschimärismus geboren (Abb.4.15). Verpaarungen der chimären Maus mit Swiss Webster (CFW) Weibchen ergaben jedoch ausschließlich Nachwuchs mit weißem Fell. Dies bedeutet, dass keine Keimbahntransmission stattgefunden hat.



**Abb. 4.15: Injektion der Cx43/Cx45flox ES-Zellen in Blastozysten zur Erzeugung chimärer Mäuse.** A: Cx43/Cx45flox ES-Zellen (Passage 6) auf einer Nährzellschicht aus mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten. B: Cx43/Cx45flox ES-Zellen (Passage 20) auf einer mit Gelatine beschichteten Kulturschale. C-D: Injektion von Cx43flox/flox;Cx45flox/flox ES-Zellen (Passage 20) in Blastozysten von CFW (swiss webster) Mäusen. Die injizierte ES-Zellen sind mit schwarzen Pfeilen markiert. E: Chimäre Maus resultierend aus der Injektion von Cx43/Cx45flox ES-Zellen (Passage 20) in Blastozysten von swiss webster (CFW) Mäusen. Körperstellen an welchen ein Fellfarben-Chimärismus zu beobachten ist sind mit schwarzen Pfeilen markiert. F: Vergrößerte Aufnahme einer Stelle am Rücken der Maus an welcher der Fellfarben-Chimärismus auftritt.

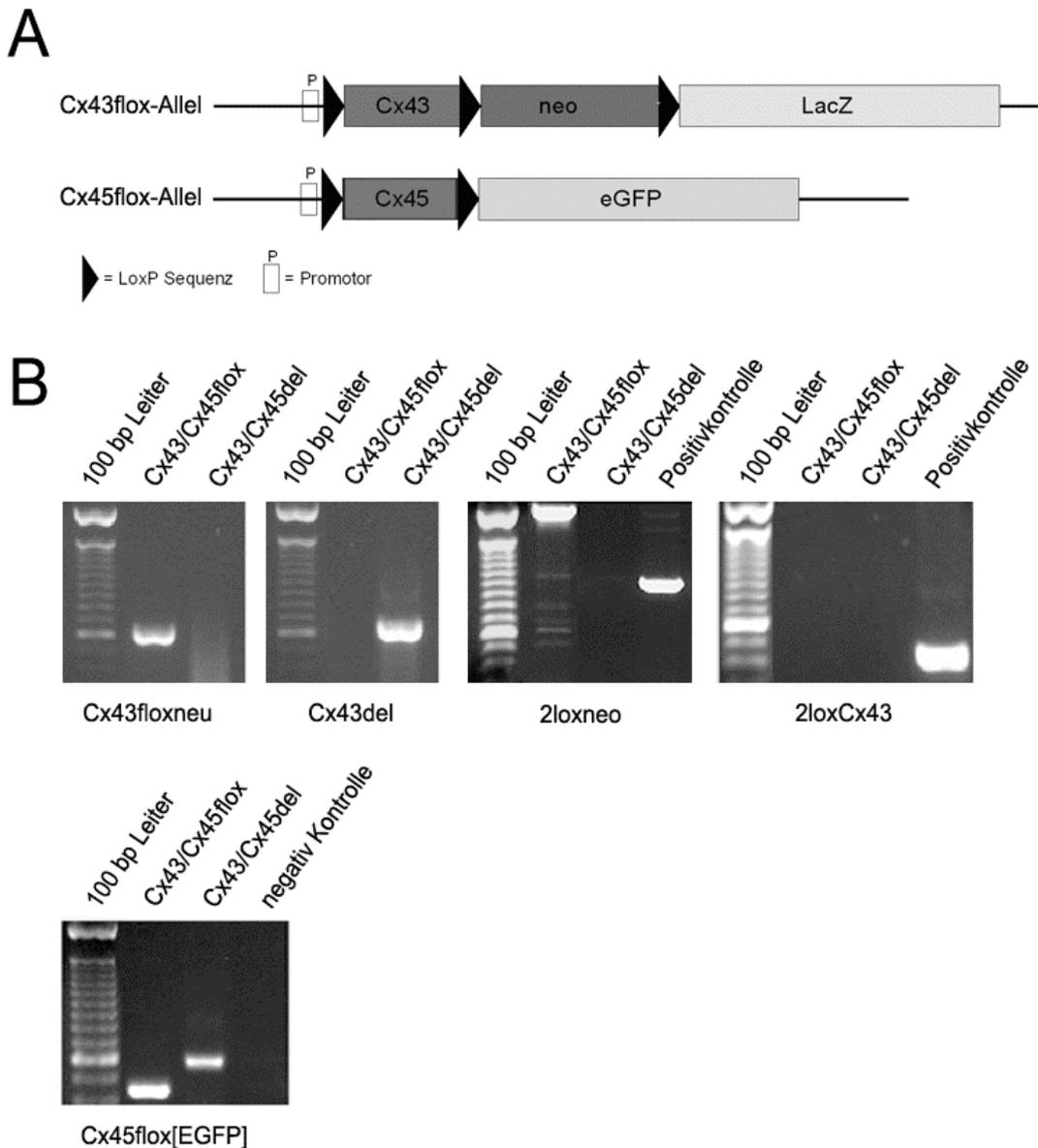
#### **4.4.4 Deletion der Connexine Cx43 und Cx45 in Cx43/Cx45flox ES-Zellen**

In den isolierten embryonalen Stammzelllinien, in welchen entweder Cx43 oder Cx45, sowie Cx43 und Cx45 von loxP-Stellen flankiert vorlagen, sollten nun die Connexine deletiert werden. In Kooperation mit Dr. Frank Edenhofer (Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universitätsklinikum Bonn) wurden die ES-Zellen für acht Stunden mit 2 µM einer transduzierbaren Cre-Rekombinase in Serum-freiem Medium inkubiert (Peitz et al., 2002). Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsinbehandlung vereinzelt und klonal ausgesät. Daraufhin konnten einzelne Klone isoliert, expandiert und mittels PCR-Analyse deren Genotyp bestimmt werden. Da bei den Cx43/Cx45del ES-Zellen aufgrund der Doppeldeletion der stärkste Phänotyp erwartet wurde, wurde zunächst nur mit diesen Zellen weitergearbeitet. Die anderen Zelllinien sollten später dafür verwendet werden, einen möglichen Phänotyp weiter einzugrenzen und einem bestimmten Connexin zuzuordnen.

#### **4.4.5 Charakterisierung isolierter Klone mittels PCR-Analyse**

Im Fall des Connexin45-Allels ist die kodierende Region von zwei loxP-Stellen flankiert. Der genomische Locus von Cx43 wurde so verändert, dass das Cx43-Allel ebenfalls von zwei loxP-Stellen flankiert vorliegt. Dahinter folgt eine Neomycin-Selektionskassette, hinter der wiederum eine loxP-Stelle eingefügt wurde. In 3` Richtung liegt das lacZ-Reportergen (Abb.4.16 A) Somit sind im Cx43-Lokus eine komplette Deletion, sowie partielle Deletionen der Neomycin-Selektionskassette bzw. der kodierenden Region von Cx43 möglich. All diese Möglichkeiten wurden mittels verschiedener PCR-Analysen überprüft.

Die PCR-Analysen zeigten, dass 60% der isolierten Klone eine komplette Deletion von Cx43 und Cx45 aufwiesen (Abb.4.16 B). Einige dieser Klone wurden für weitere Experimente expandiert und eingefroren.



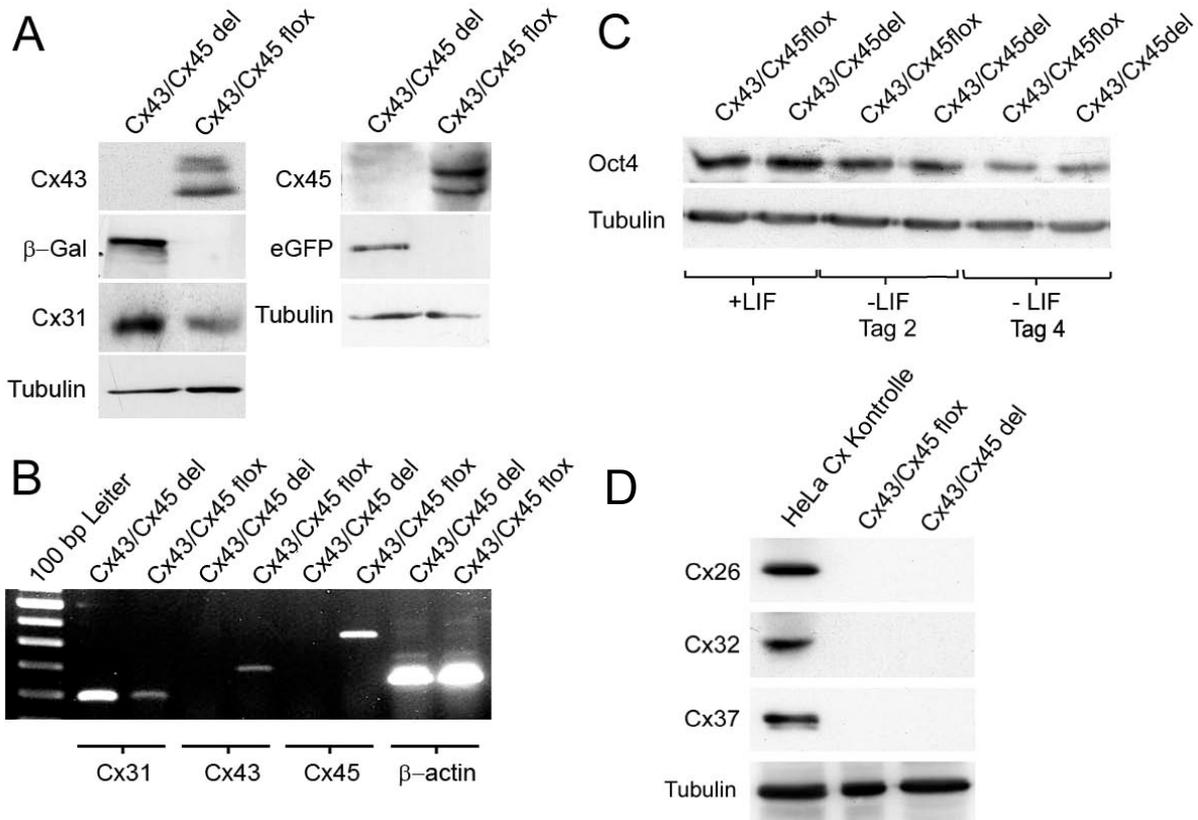
**Abb.4.16: PCR-Analysen an isolierten Zellklonen zur Charakterisierung des Cx43-Lokus und des Cx45-Lokus nach Cre-Protein-Transduktion in Cx43/Cx45floxed ES-Zellen.**

Dargestellt sind die Ergebnisse vor (Cx43/Cx45floxed) und nach der kompletten Deletion von Cx43 und Cx45 (Cx43/Cx45del). A: Schematische Darstellung des Cx43- und Cx45-Genlokus vor der Cre-Transduktion. B: Durchgeführte PCR-Analysen. Cx43floxedneo: Nachweis des von loxP-Stellen flankierten Cx43. Cx43del: Nachweis der Deletion von Cx43. 2loxneo: Nachweis der Deletion der Neomycin Resistenzkassette. 2loxCx43: Nachweis der Deletion der von loxP-Stellen flankierten Neomycin-Selektionskassette, wobei die kodierende Region von Cx43 erhalten bleibt. Cx45del[eGFP]: Nachweis der Deletion des von loxP-Stellen flankierten Cx45.

Für die 2loxneo PCR wurde als Positivkontrolle DNA von einem Klon verwendet, bei welchem Cx43 deletiert war, die Neomyzinkassette jedoch erhalten blieb. Als Positivkontrolle für die 2loxCx43 PCR wurde DNA von einem Klon verwendet bei dem heterozygot die Neomyzin-Kassette deletiert wurde, Cx43 jedoch erhalten blieb. Negativkontrolle: steriles, zweifach destilliertes Wasser.

#### 4.4.6 Charakterisierung isolierter Klone mittels Immunoblot- und RT-PCR-Analyse

Nach der Charakterisierung der Zellen mittels verschiedener PCR-Analysen erfolgte eine Überprüfung der Deletion der Connexine durch Immunoblotanalysen mit spezifische Antikörpern gegen Cx43 und Cx45 (Abb.4.17 A). Darüber hinaus wurde die Expression von Cx31 untersucht. Connexin31 konnte in beiden Zelllinien detektiert werden. Des Weiteren wurden die Reportergerenprodukte eGFP und  $\beta$ -Galaktosidase mittels spezifischer Antikörper in Cx43/Cx45-defizienten Zellen nachgewiesen (Abb.4.17 A). Immunoblotanalysen mit einem Oct4-Antikörper zeigten, dass sowohl die Cx43/Cx45del Zellen, als auch die Cx43/Cx45flox Kontrollzellen eine ähnlich starke Expression des Stammzellmarkerproteins aufweisen. Wurden die ES-Zellen in Kulturmedium ohne das Interleukin LIF kultiviert, führte dies zur Differenzierung der Zellen, was mit einer Reduktion der Expressionsstärke von Oct4 einher ging. Die Abnahme der Oct4-Expression fand in beiden Zelllinien in gleichem Maße statt. Zur Standardisierung wurde die Tubulin-Proteinmenge mittels spezifischer Antikörper bestimmt (Abb.4.17 A). Neben der Charakterisierung der Zellen mittels Immunoblotanalysen wurden ebenfalls RT-PCR-Analysen durchgeführt, bei welchen mRNA für Cx43 bzw. Cx45 jeweils nur in den Cx43/Cx45flox, nicht aber in den Cx43/Cx45del Zellen nachgewiesen werden konnte. Connexin31 mRNA wurde in beiden Zelllinien gefunden (Abb.4.17 B). Um zu überprüfen ob der Verlust von Cx43 und Cx45 durch die Expression anderer Connexine kompensiert wird, wurden Immunoblotanalysen mit Antikörpern gegen Cx26, Cx32 und Cx37 durchgeführt. Die Ausprägung von mRNAs dieser Connexine wurde bereits in HM1 ES-Zellen nachgewiesen (Abb.4.1 A), eine Translation konnte jedoch nicht gezeigt werden. Cx30.3 konnte ebenfalls als mRNA in HM1 Zellen nachgewiesen werden. Da jedoch keine Antikörper gegen dieses Connexin verfügbar waren, musste auf die Immunoblotanalyse verzichtet werden. Weder in den Cx43/Cx45flox noch in den Cx43/Cx45del Zelllysaten konnten die untersuchten Connexinproteine gefunden werden (Abb.4.17 C).



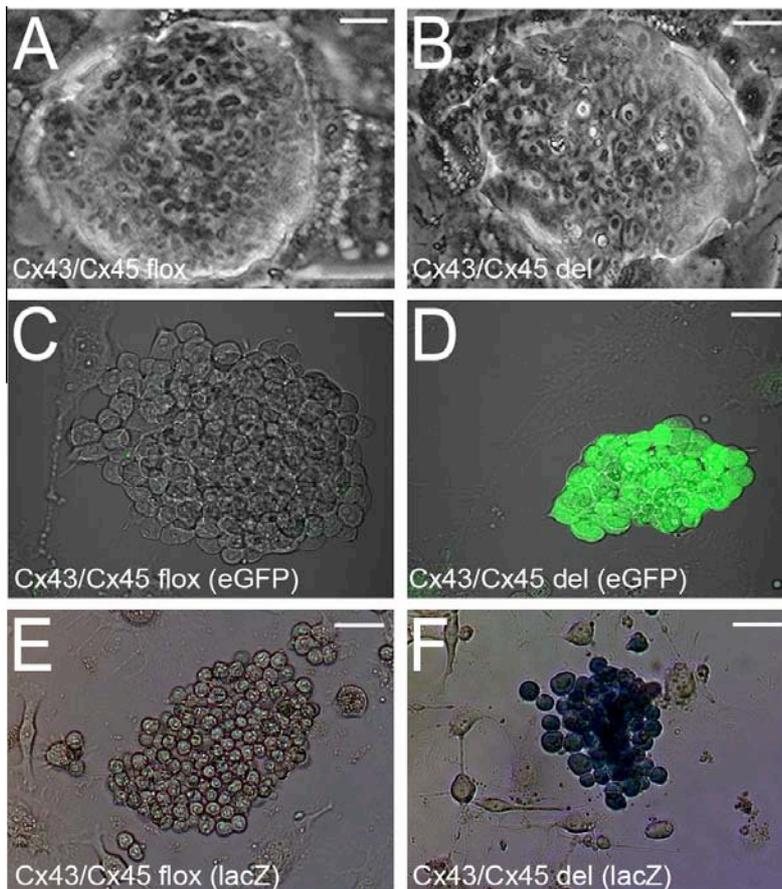
**Abb. 4.17: Immunoblot- und RT-PCR-Analysen zur Charakterisierung von Cx43/Cx45flox sowie Cx43/Cx45del ES-Zellen.**

A: Immunoblotanalyse mit Antikörpern gegen Cx31, Cx43, Cx45, eGFP und β-Galaktosidase. Zur Ladekontrolle wurde ein Tubulin-Antikörper verwendet. B: RT-PCR Analyse mit Primern zum Nachweis von Cx31, Cx43 und Cx45. Für den Nachweis von genomischer Kontamination und als Ladekontrolle wurden intronüberspannende β-Aktin-Primer eingesetzt. C: Immunoblotanalysen mit einem spezifischen Antikörper gegen Oct4. Die Stärke der Oct4-Expression wurde in ES-Zellen, die in Gegenwart von LIF, sowie in Kulturmedium ohne LIF für 2 bzw. 4 Tage kultiviert wurden, analysiert. D: Immunoblotanalysen mit Antikörpern gegen Cx26, Cx32 und Cx37. Als Positivkontrollen wurden HeLa Zellen verwendet, welche stabil mit den entsprechenden Connexinen transfiziert worden waren. Tubulin-Antikörper dienten als Ladekontrolle.

#### 4.5 Morphologisches Erscheinungsbild von Cx43/Cx45del ES-Zellen und Nachweis der Reporterexpression

Der Verlust der Connexine Cx43 und Cx45 in ES-Zellen führte zu keinen augenscheinlichen morphologischen Auffälligkeiten. Die Zellen wuchsen in runden Kolonien mit scharf begrenzten Rändern und wiesen eine für ES-Zellen typische kugelige Zellform, sowie ein hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis auf. (Abb.4.18 A-B)

Bei der Deletion des Cx43-Allels durch die Cre-Rekombinase gelangt das lacZ-Reportergen, das für die  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, unter die Kontrolle des endogenen Cx43-Promotors. Mittels X-Gal-Färbung kann die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase anhand einer Blaufärbung der Zellen nachgewiesen werden (Abb.4.18 C-D). Im Fall des Cx45-Allels führt die Deletion zur Expression von eGFP unter dem endogenen Cx45-Promotor. Die Fluoreszenz des Reportergens kann an lebenden Zellen direkt mit dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden (Abb.4.187 E-F).



**Abb.4.18: Nachweis der Reporterexpression in Cx43/Cx45del ES-Zellen.**

A-B: Mikroskopische Hellfeld-Aufnahme repräsentativer Cx43/Cx45flox und Cx43/Cx45del ES-Zellklone .

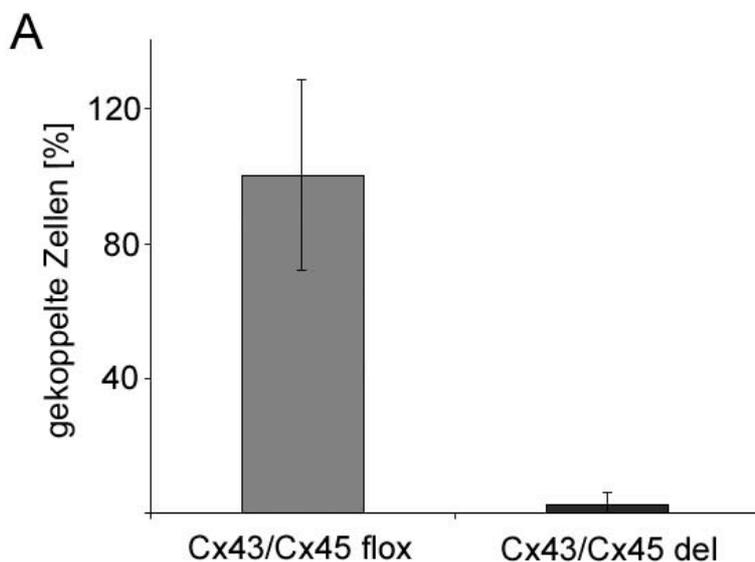
C-D: mikroskopische Aufnahme der grünen eGFP Fluoreszenz.

E-F: Indirekter Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase anhand des blauen Niederschlags nach X-Gal-Färbung.

Größenstandard: 20  $\mu$ m.

#### 4.6 Gap Junction-vermittelte Kommunikation zwischen Cx43/Cx45del ES-Zellen

Um die Auswirkung der Deletion von Cx43 und Cx45 auf die Gap Junction-vermittelte Kopplung zwischen benachbarten ES-Zellen zu untersuchen, wurde der niedermolekulare Markierungsstoff Neurobiotin mittels einer spitzen Glaskapillare in einzelne ES-Zellen injiziert und seine Diffusion im Zellverbund quantifiziert. Dabei konnte eine durchschnittliche Ausbreitung in drei benachbarte Zellen beobachtet werden. Dies entspricht einer Reduktion der Zell-Zell-Kopplung um 96% bezogen auf Cx43/Cx45flox ES-Zellen. Bei 36% der injizierten Cx43/Cx45del Zellen war kein Farbstofftransfer in benachbarte Zellen zu beobachten (Abb.4.19).



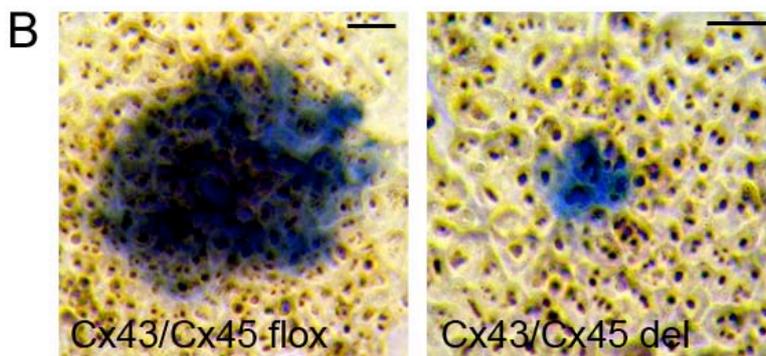
**Abb.4.19: Mikroinjektion von Neurobiotin in Cx43/Cx45flox und Cx43/Cx45del ES-Zellen.**

A: Quantitative Auswertung der Mikroinjektionsexperimente.

Anzahl der ausgewerteten Injektionen: flox: n=13, del: n=42. Signifikanz bestimmt nach dem Studentschen T-Test:  $p < 0,0001$ .

B: Lichtmikroskopische Aufnahme von Cx43/Cx45flox ES-Zellen und Cx43/Cx45del ES-Zellen nach der Injektion von Neurobiotin und dem immunohistochemischen Nachweis des Markierungsstoffes.

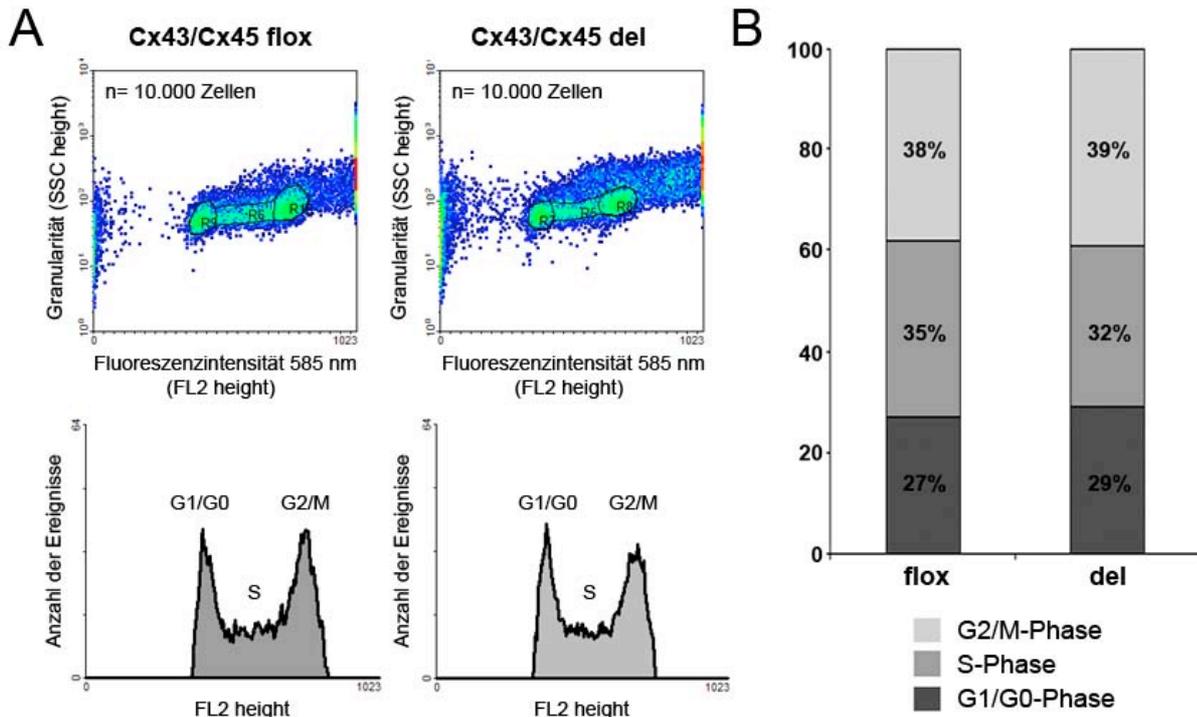
Größenstandard: 20  $\mu\text{m}$ .



#### 4.7 Proliferationsrate von Cx43/Cx45flox und Cx43/Cx45del ES-Zellen

Um die Proliferationsraten der Cx43/Cx45flox und Cx43/Cx45del ES-Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen mit Trypsin vom Boden der Kulturschalen abgelöst. Die vereinzelt Zellen wurden fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle mittels Durchflusszytometrie mit einem FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)-Gerät bestimmt. Propidiumiodid interkaliert in die DNA, weshalb die Intensität der gemessenen Fluoreszenz die Menge an DNA pro Zelle widerspiegelt. Während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus enthalten Zellen verschiedene Mengen an DNA. Während der G1/G0-Phase haben die Zellen einen einfachen Chromosomensatz. Während der S-Phase beginnt die Replikation und somit steigt der DNA-Gehalt bis schließlich in der G2/M-Phase der doppelte Chromosomensatz vorliegt. Diese Verteilungen verschiedener DNA-Mengen pro Zelle innerhalb einer Zellpopulation kann vom FACS-Gerät über die Fluoreszenz des interkalierten Propidiumiodid gemessen und als Diagramm ausgegeben werden. Dabei wird auf der X-Achse die Fluoreszenzintensität und auf der Y-Achse die Anzahl der Zellen bei denen die entsprechende Intensität gemessen wurde aufgetragen (Abb.4.20 A). G1/G0-Phase sowie G2/M-Phase ergeben dabei einen distinkten Ausschlag in der Kurve. Die Signale zwischen diesen beiden Ausschlägen sind auf Zellen in der S-Phase zurückzuführen, da es während dieser Zellzyklusphase aufgrund der fortschreitenden Replikation zu einer stetigen Zunahme der DNA-Menge kommt. Zellen in der Synthesephase weisen deshalb keinen einheitlichen DNA-Gehalt auf.

Beim Vergleich der Proliferationsraten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Cx43/Cx45flox und Cx43/Cx45del ES-Zellen festgestellt werden. Bei den Cx43/Cx45flox Zellen befanden sich 27% der Zellen in der G0/G1 Phase, 35% in der S Phase und 38% in der G2/M Phase (Abb.4.20 B). Bei den Cx43/Cx45del Zellen befanden sich 29% der Zellen in der G0/G1 Phase, 32% in der S Phase und 39% in der G2/M Phase (Abb.4.20 B).



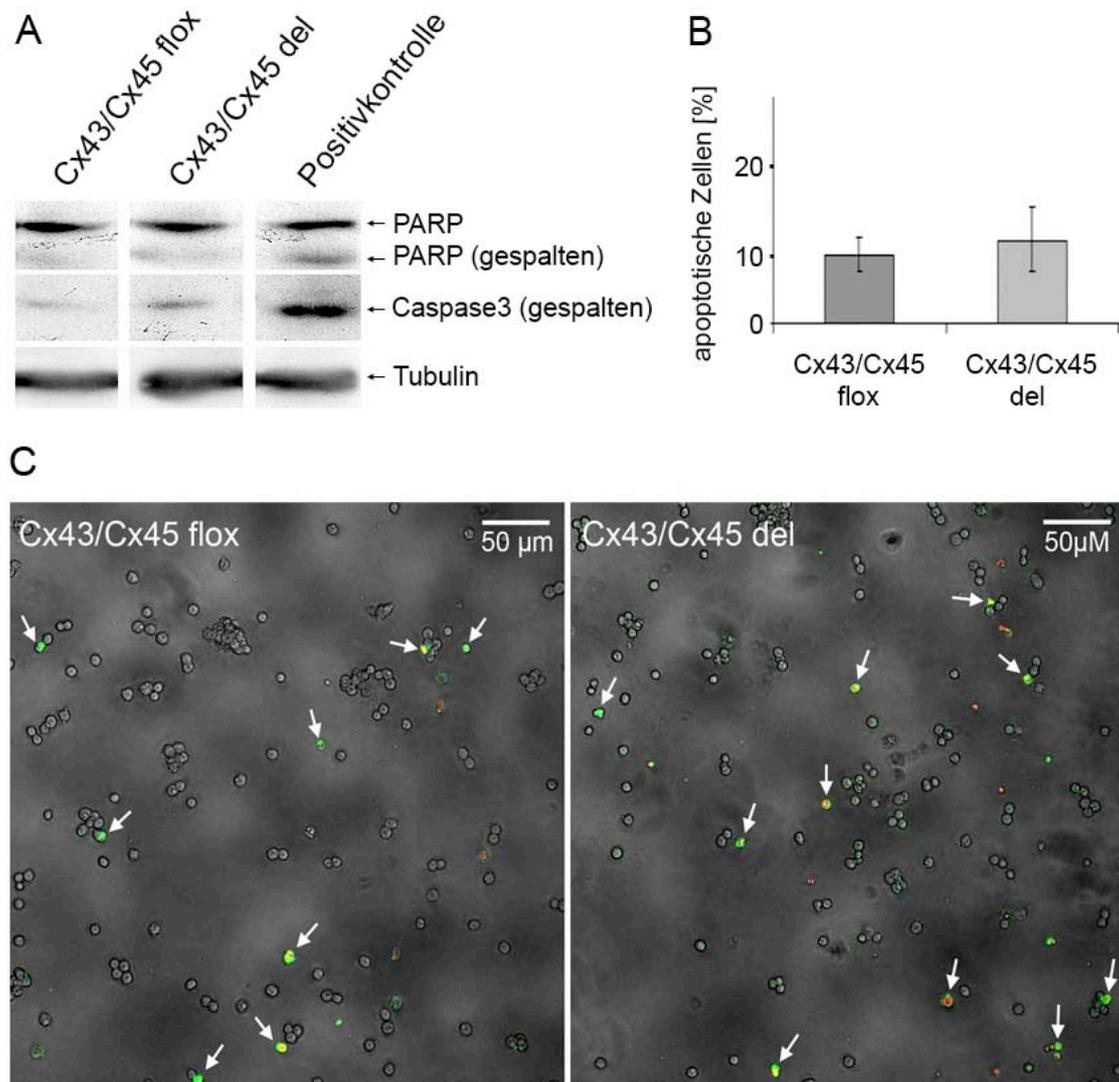
**Abb.4.20: Untersuchung der Proliferationsraten von Cx43/Cx45flox und Cx43/Cx45del ES-Zellen.**

A: Bestimmung der Fluoreszenzintensität pro Zelle mittels FACS-Analyse. Oben: Fluoreszenzintensitäten aufgetragen gegen die gemessene Granularität. Die Häufigkeit der Ereignisse wird durch die verwendeten Farben kodiert (grün=häufig; blau=selten). Mit Hilfe dieses Diagramms wird der Bereich festgelegt, welcher bei der Messung berücksichtigt werden soll. Der Messbereich wurde schwarz umrandet. Unten: Fluoreszenzintensitäten aufgetragen gegen die Zahl an Zellen in welchen diese Intensitäten gemessen wurden.

B: Prozentualer Anteil der Zellen pro Zellzyklusphase (G1/G0; S; G2/M) im Diagramm dargestellt.

#### **4.8 Apoptoseraten von Cx43/Cx45flox und Cx43/Cx45del ES-Zellen**

Die Experimente mit pharmakologischen Gap Junction-Inhibitoren gaben Anlass zu der Vermutung, dass Gap Junction-vermittelte Kommunikation für das Überleben embryonaler Stammzellen eine wichtige Rolle spielen könnte. Studien bei welchen Cx43 in embryonalen HM1 Stammzellen deletiert und die Expression von Cx31 und Cx45 mittels siRNA stark reduziert wurde, konnten die Annahme nicht bestätigen. In diesen Experimenten wurde Cx45 jedoch nicht komplett deletiert, sondern durchschnittlich um 75% reduziert. Die verbleibenden 25% Restexpression könnten ausreichen, um einen Schutz der Zellen vor Apoptose zu vermitteln. Aus diesem Grund wurden auch die Apoptoseraten von Cx43/Cx45flox und Cx43/Cx45del ES-Zellen miteinander verglichen. Dabei wurden apoptotische Proteine durch Immunoblotanalysen mittels spezifischer Antikörper gegen gespaltene PARP, sowie die gespaltene Caspase3 nachgewiesen (Abb.4.21 A). Darüber hinaus wurde ein kommerziell erhältliches AnnexinV Apoptose-Testverfahren durchgeführt (Abb.4.21 B-C). Die Apoptosetests gaben keinen Hinweis auf signifikant erhöhte Todesraten in Cx43/Cx45del Zellen. Als Positivkontrolle für die Immunoblotanalysen wurden fünf Tage alte Embryonalkörperchen verwendet. Diese weisen in ihrem Inneren eine Vielzahl apoptotischer Zellen auf.



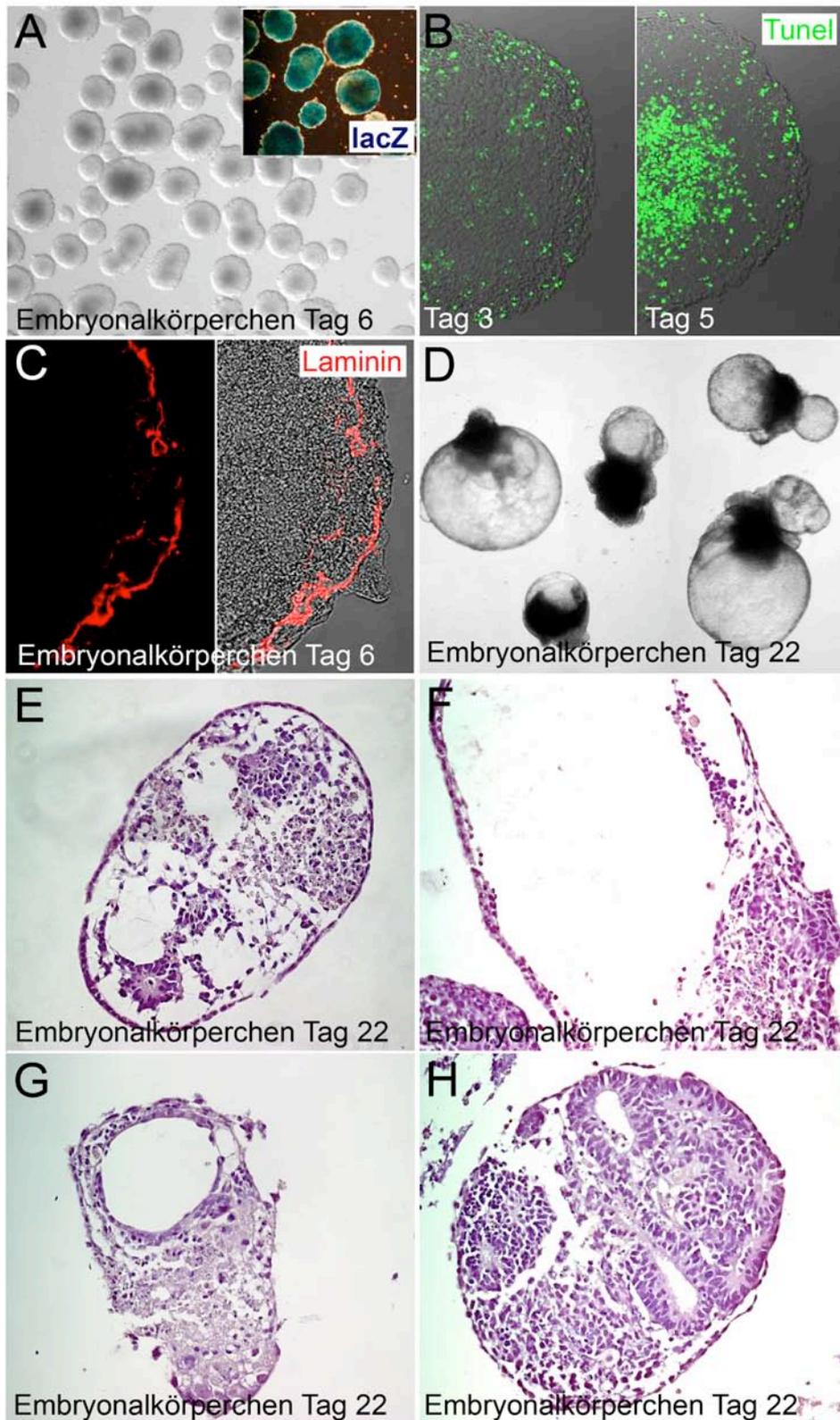
**Abb.4.21: Untersuchung der Apoptoseraten von Cx43/Cx45flox und Cx43/Cx45del ES-Zellen.**

A: Immunoblotanalysen mit PARP-Antikörpern bzw. Antikörpern gegen die gespaltene Caspase3. Als Positivkontrolle wurden Lysate von fünf Tage alten Embryonalkörperchen verwendet. B: Grafische Darstellung der Ergebnisse der AnnexinV-Färbung. C: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von ES-Zellen in Einzelzellsuspension nach AnnexinV-Färbung (grün: AnnexinV-FITC, rot: Propidiumiodid-Kernfärbung). Größenstandard: 50  $\mu$ m.

#### 4.9 *In vitro* Differenzierungspotential von Cx43/Cx45del ES-Zellen

In einer 1991 von Sheardown und Hooper veröffentlichten Publikation werden zwei kopplungsdefiziente ES-Zelllinien beschrieben, welche durch generelle Mutagenese und anschließende "Kiss of death" Selektion gewonnen wurden. Beide Zelllinien waren morphologisch nicht von Wildtyp ES-Zellen zu unterscheiden und entwickelten sich in Suspensionskultur zu Embryonalkörperchen. Diese zeigten im Gegensatz zu Embryonalkörperchen aus den verwendeten Kontrollzellen jedoch auch nach langer Zeit in Kultur keine weitere Differenzierung. So entstand weder viszerales Endoderm, noch kam es zur Synthese von extrazellulärer Matrix (Reicherts Membran) und es bildeten sich auch keine Höhlungen im Inneren der Embryonalkörperchen. Da die interzelluläre Kopplung in Cx43/Cx45del Zellen um 96% reduziert ist, könnte auch bei dieser ES-Zelllinie ein ähnlicher Phänotyp zu erwarten sein.

Aus diesem Grund wurden die Cx43/Cx45del Zellen in Suspension kultiviert um Embryonalkörperchen zu erhalten. Es bildeten sich Zellaggregate, die augenscheinlich nicht von Cx43/Cx45flox Embryonalkörperchen zu unterscheiden waren (Abb.4.22 A). Nach fünf Tagen in Kultur begannen die Zellen im Inneren durch Apoptose abzusterben und es bildeten sich Hohlräume. Der apoptotische Zelltod konnte an Gefrierschnitten mittels eines TUNEL-Tests nachgewiesen werden (Abb.4.22 B). Außerdem kam es zur Ablagerung einer Schicht aus extrazellulärer Matrix unter der äußersten Zellschicht der Embryonalkörperchen, was durch eine Immunfluoreszenzanalyse mit Laminin-Antikörpern gezeigt werden konnte (Abb.4.22 C). Nach 22 Tagen in Suspensionskultur hatten sich ballonartige Strukturen, sogenannte zystische Embryonalkörperchen gebildet (Abb.4.22 D). An gefärbten Paraffinschnitten lassen sich verschiedene Höhlungen, sowie endothel-, epithel- und mesenchymartige Strukturen nachweisen (Abb.4.22 E-H). In 4.22 F ist ein Schnitt durch eine der ballonartigen Strukturen abgebildet. Es handelt sich hierbei um Gewebe, welche sich aus dem primitiven Endoderm entwickeln und dem Dottersack entsprechen, der den Embryo *in vivo* umgibt.

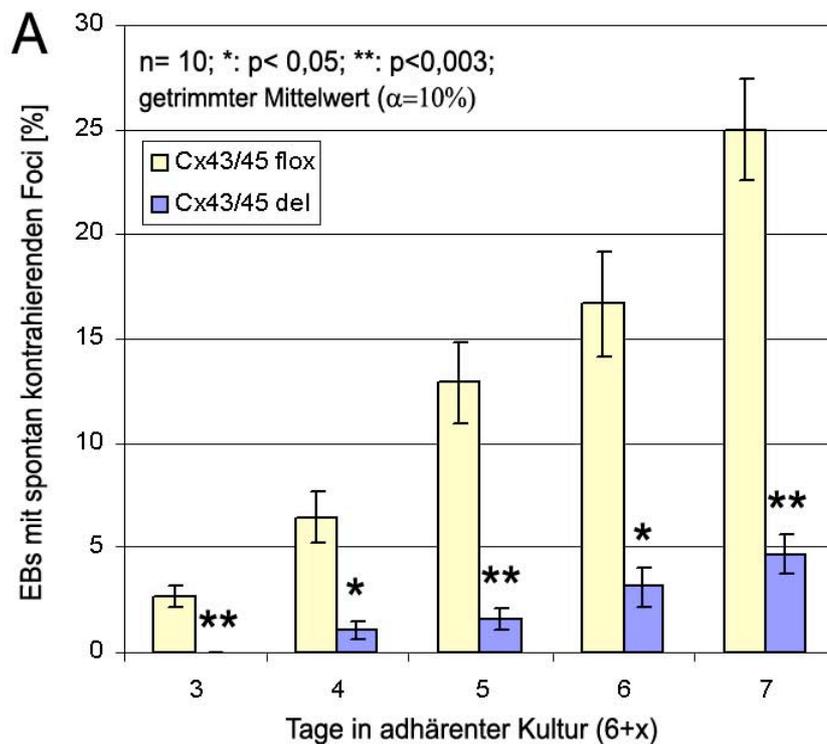


**Abb.4.22: Differenzierung von Cx43/Cx45del ES-Zellen in zystische Embryonalkörperchen.** A: Embryonalkörperchen nach sechs Tagen in Suspensionskultur. B: TUNEL-Test an Gefrierschnitten von Embryonalkörperchen zum Nachweis des apoptotischen Zelltod. C: Immunfluoreszenzanalyse mit Laminin-Antikörpern zum Nachweis von extrazellulärer Matrix (Reicherts Membran). D: Zystische Embryonalkörperchen nach 22 Tagen in Suspensionskultur. E-H: HE gefärbte Paraffinschnitte von 22 Tage alten Embryonalkörperchen.

#### **4.10 *In vitro* Differenzierung von Cx43/Cx45del ES-Zellen in Kardiomyozyten**

Differenziert man ES-Zellen in Embryonalkörperchen sind nach 8-13 Tagen in Suspensionskultur rhythmisch kontrahierende Bereiche innerhalb der Zellaggregate zu beobachten. Hierbei handelt es sich um spontan kontrahierende Kardiomyozyten (Doetschman et al., 1985).

Bei der Differenzierung der ES-Zellen wurde beobachtet, dass die Cx43/Cx45-doppeltdefizienten ES-Zellen, verglichen mit den Kontrollzellen, nur äußerst selten Embryonalkörperchen mit kontrahierenden Foci bildeten. Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen und zu quantifizieren, wurden mittels der „hängende Tropfen“ Technik Embryonalkörperchen aus Cx43/Cx45del und Cx43/Cx45flox ES-Zellen hergestellt. Dazu werden jeweils 1500 Zellen in Tropfen aus 20 µl Differenzierungsmedium auf den Deckel einer Zellkulturschale pipettiert. Der Deckel wird anschließend vorsichtig umgedreht und zurück auf die Kulturschale gesetzt. Im hängenden Tropfen lagern sich die Zellen nun zu einem Aggregat zusammen. Nach zwei Tagen wurden die entstandenen Embryonalkörperchen vom Deckel der Kulturschale abgespült und in eine nicht adhäsive Bakterienkulturschale überführt. Nach weiteren vier Tagen in Suspensionskultur wurden die Embryonalkörperchen einzeln in Gelatine-beschichtete Vertiefungen einer 24-Loch-Kulturschale gegeben. Pro Experiment wurde je eine 24-Lochschaale pro Genotyp analysiert. Drei Tage nach Überführen der Zellaggregate in die Vertiefungen konnten die ersten Embryonalkörperchen, die kontrahierende Bereiche ausprägten, beobachtet werden. Von Tag drei bis Tag sieben in adhäsiver Kultur wurden nun täglich die Vertiefungen mit spontan kontrahierenden Zellen gezählt. Es wurden 10 Experimente pro Genotyp durchgeführt, sodass insgesamt jeweils 240 Embryonalkörperchen untersucht wurden. Dabei konnte bei den Cx43/Cx45del ES-Zellen eine signifikant reduzierte Anzahl an Embryonalkörperchen mit spontan kontrahierenden Bereichen festgestellt werden (Fig. 4.23). Wiesen bei den Cx43/Cx45flox Kontrollzellen nach sieben Tagen durchschnittlich 25% der Embryonalkörperchen kontrahierende Foci auf, waren es bei den Cx43/Cx45 defizienten ES-Zellen lediglich 5%.



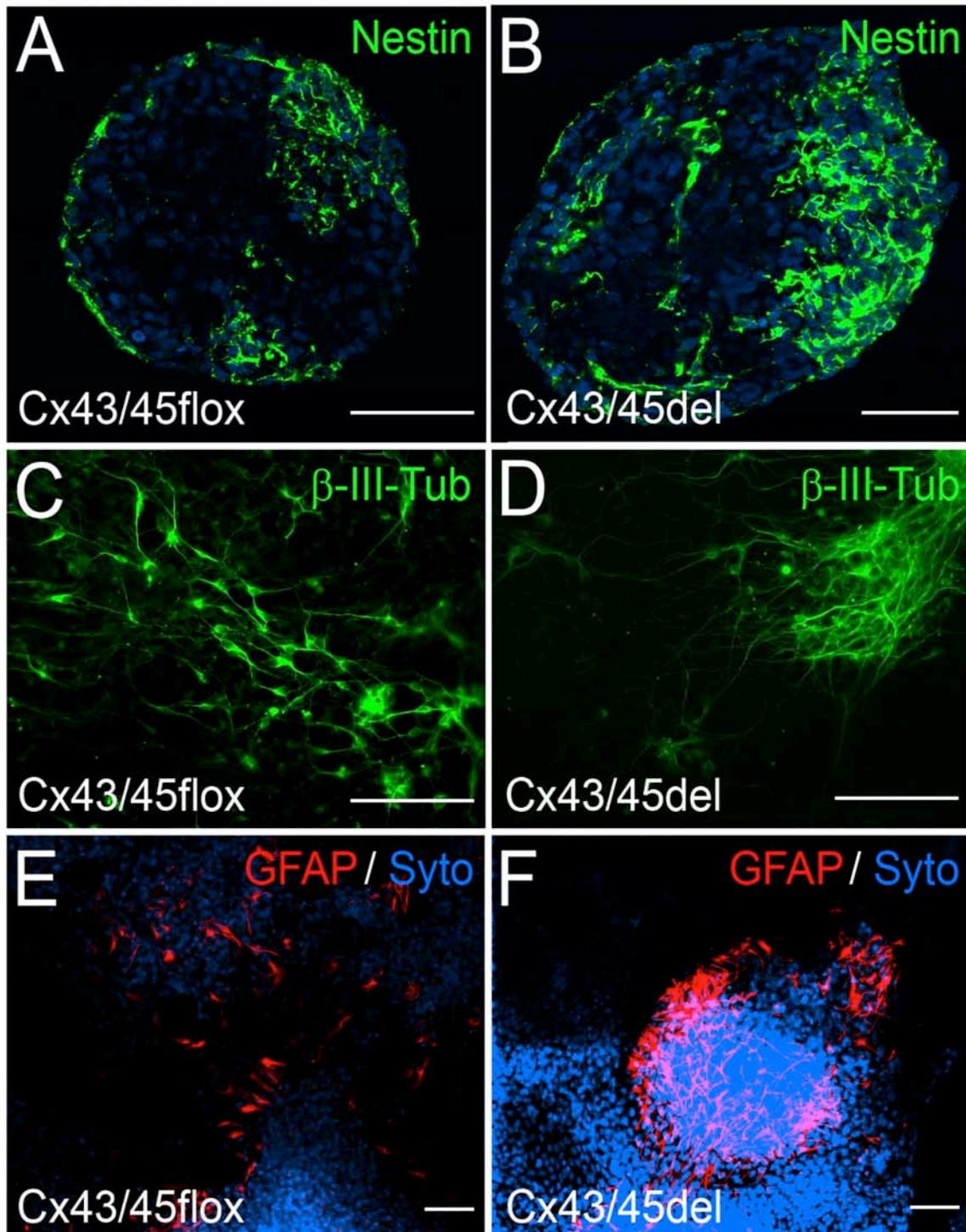
**Abb. 4.23: Differenzierung embryonaler Stammzellen in spontan kontrahierende Zellen (Kardiomyozyten ?).**

Graphische Darstellung des Anteils an Embryonalkörperchen mit spontan kontrahierenden Foci bei Verwendung von Cx43/Cx45flox ES-Zellen (gelb) und Cx43/Cx45del ES-Zellen (blau). Die Werte wurden jeweils an Tag 3-7 in adhärenter Kultur (6+X) ermittelt. Insgesamt wurden n=10 Experimente durchgeführt und 240 Embryonalkörperchen je Genotyp untersucht. Die Balken stellen die getrimmten Mittelwerte ( $\alpha=10\%$ ) aller 10 Experimente dar. Signifikanzen (p) wurden nach dem Studentischen t-Test ermittelt.

#### **4.11 *In vitro* Differenzierung von Cx43/Cx45del ES-Zellen in Neuronen und Astrozyten**

Um Neuronen und Astrozyten zu erzeugen, wurden aus den ES-Zellen zunächst Embryonalkörperchen hergestellt und diese für vier Tage in Suspension kultiviert. Während dieser Zeit wurde dem Differenzierungsmedium 0,1  $\mu$ M Retinsäure zugesetzt. Nach sechs Tagen in Kultur konnten an Gefrierschnitten von Embryonalkörperchen Nestin-exprimierende neurale Vorläuferzellen mittels Immunfluoreszenzanalyse nachgewiesen werden (Abb.4.24 A-B). Ab dem sechsten Tag in Suspensionskultur wurden die Zellaggregate auf mit Gelatine beschichtete Zellkulturschalen überführt. Nach weiteren vier Tagen in adhäsiver Kultur waren erstmals  $\beta$ -III-Tubulin exprimierende neuronale Zellen (Abb.4.24 C-D), ab Tag sechs GFAP-positive Astrozyten nachweisbar (Abb.4.24 E-F). Die Differenzierung in neurale Vorläuferzellen, Astrozyten sowie Neuronen konnte bei Cx43/Cx45flox und Cx43/Cx45del ES-Zellen in gleichem Maße beobachtet werden.

Bei den durchgeführten Experimenten konnte folgende Beobachtung gemacht werden. Neuronen und Astrozyten, die aus Cx43/Cx45flox ES-Zellen hervorgegangen waren, breiteten sich mit zunehmender Zeit in Kultur über große Teile der bewachsenen Kulturschale aus und bedeckten diese mit einem Netzwerk neuronaler Zellen. Neuronen und Astrozyten, die aus Cx43/Cx45del Zellen hervorgegangen waren wuchsen hingegen in großer Zahl dicht gepackt in bestimmten Arealen (Abb.4.24 C-F).



**Abb. 4.24: Differenzierung embryonaler Stammzellen in Neurone und Astrozyten.**

A-B: Gefrierschnitte ( $12\ \mu\text{m}$ ) von Cx43/Cx45flox (A) und Cx43/Cx45del Embryonalkörperchen (B). Neuronale Vorläuferzellen wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen Nestin markiert. Grün: Nestin-positive Zellen, Blau: Kernfärbung. C-D: Mittels  $\beta$ -III-Tubulin Antikörpern markierte Neurone welche aus Cx43/Cx45flox (C) und Cx43/Cx45del ES-Zellen (D) gewonnen wurden. Grün:  $\beta$ -III-Tubulin-positive Neurone. E-F: Mittels GFAP Antikörpern markierte Astrozyten welche aus Cx43/Cx45flox (E) und Cx43/Cx45del ES-Zellen (F) gewonnen wurden. Rot: GFAP-positive Astrozyten, Blau: Kernfärbung. Größenstandard:  $100\ \mu\text{m}$ .

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es gewesen, eine umfassende Expressionsanalyse aller Connexine in embryonalen Stammzellen der Maus durchzuführen und darüber hinaus ihre mögliche Rolle hinsichtlich Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung zu untersuchen. Im Zuge dieser Experimente sollte die Funktion bzw. Expression der Gap Junction-Kanäle mittels genetischer Deletion, RNA-Interferenz, sowie pharmakologischer Blockade moduliert werden, um Rückschlüsse auf die Bedeutung der Connexine und der direkten interzellulären Zell-Zell-Kommunikation in embryonalen Stammzellen ziehen zu können.

### 5.1 Connexinexpression in embryonalen Stammzellen der Maus

Die Expression von Connexinen in Stammzellen wurde in den letzten Jahrzehnten kontrovers diskutiert. Eine Hypothese ist im Zusammenhang mit der „Stammzelltheorie der Tumorentwicklung“ beschrieben und besagt, dass Gap Junction-vermittelte Kommunikation ein Charakteristikum differenzierter Zellen sei. Stammzellen hingegen wiesen keine direkte Zell-Zell-Kopplung auf und seien somit potentiell „unsterblich“, bis sie Connexine exprimierten und differenzierten. Diese Hypothese beruht auf der Beobachtung, dass eine Vielzahl adulter Stammzellpopulationen keine Connexine bzw. keine funktionellen Gap Junction-Kanäle ausprägen (Trosko et al., 2003 und 2004). Im Gegensatz dazu sind Hinweise auf die Expression von Gap Junctions in embryonalen Stammzellen schon seit einigen Jahren in der Literatur beschrieben (Nishi et al., 1991; Oyamada et al., 1996; Wong et al., 2005; Hüttner et al., 2006). Darüber hinaus werden verschiedene Connexinisoformen während der frühen Embryogenese ausgeprägt, unter anderem auch in der inneren Zellmasse von Blastozysten (Houghton et al., 2002). Eine Analyse aller bekannten Isoformen in ES-Zellen wurde bisher jedoch nicht durchgeführt, daher sollte in dieser Arbeit das vollständige Expressionsprofil der Connexine bestimmt werden.

Umfassende RT-PCR-Analysen mit spezifischen Oligonukleotid-Startermolekülen zur Amplifikation aller 20 Connexinisoformen wiesen Transkripte von sieben Connexingenen (Cx26, Cx30.3, Cx31, Cx32, Cx37, Cx43 und Cx45) in HM1 ES-Zellen nach. Bei anschließenden Immunoblotanalysen konnten mit Cx31, Cx43 und Cx45 lediglich drei der zuvor gefundenen Connexintranskripte auch als Proteine detektiert werden. Die drei Connexine Cx26, Cx32 und Cx37 wurden zwar als mRNA, nicht aber als Protein nachgewiesen. Entweder sind diese Connexine so schwach exprimiert, dass ein Nachweis

mit den verwendeten Antikörpern nicht möglich ist, oder es findet eine posttranskriptionale Regulation z.B. über miRNAs statt. Ein solches regulatorisches System ist beispielsweise für Cx43 während der Myogenese beschrieben worden (Anderson et al., 2006).

Im Fall des Connexin30.3 war kein spezifischer Antikörper verfügbar, so dass eine Analyse der Proteinexpression nicht durchgeführt werden konnte. Eine  $\beta$ -Galaktosidase-Darstellung an mutierten ES-Zellen, die zur Erzeugung einer konventionalen Cx30.3-defizienten Maus hergestellt wurden (Zheng-Fischhöfer et al., 2007) und in denen Cx30.3 heterozygot durch eine NLS-lacZ-Sequenz ersetzt worden war, zeigte jedoch keine Blaufärbung. Da die mRNA für dieses Connexin nachweisbar ist, könnte dies auf eine posttranskriptionale Regulation der Cx30.3 mRNA beispielsweise über miRNAs hindeuten. Diese binden in der Regel die 3`UTR ihrer Ziel-mRNA und verhindern somit den Start der Translation (Carthew und Sontheimer, 2009). Da die 3`UTR des Connexins bei der genetischen Manipulation der ES-Zellen erhalten wurde und somit die Cx30.3 mRNA und die NLS-lacZ mRNA die gleiche 3`UTR besitzen, wäre es denkbar, dass sie auch von derselben miRNA reguliert werden.

Da neuere Ergebnisse darauf hindeuten, dass es sich bei den Pannexinen (Panx) um eine weitere Familie Gap Junction-bildender Proteine handeln könnte (Bruzzone et al., 2003), ist zusätzlich eine Analyse der drei bekannten Isoformen (Panx1, Panx2 und Panx3) auf Transkriptionsebene durchgeführt worden. Mittels RT-PCR-Analysen wurde lediglich die Transkription von Panx1 nachgewiesen, jedoch konnte dessen Translation mittels Immunoblot nicht bestätigt werden. Wie bereits für die Ausprägung der Connexine Cx26, Cx30.3, Cx32 und Cx37 vermutet, scheint auch im Fall von Panx1 eine posttranskriptionale Regulation bzw. eine schwache Proteinexpression unter der Nachweisgrenze des Antikörpers für diesen Befund verantwortlich zu sein. Da Pannexinproteine nicht nachweisbar sind, lässt sich folgern, dass die direkte Zell-Zell-Kommunikation zwischen embryonalen Stammzellen vermutlich ausschließlich von Gap Junction-Kanälen vermittelt wird, die aus Connexinuntereinheiten aufgebaut sind.

Im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation bestätigt eine Studie an humanen embryonalen Stammzellen die Ausprägung von Cx43 und Cx45 (Wong et al., 2005). Darüber hinaus zeigten Hüttner und Mitarbeiter (2006) die Expression von Connexin40 in hES-Zellen. In ES-Zellen der Maus konnte Cx40 jedoch weder auf mRNA, noch auf Proteinebene detektiert werden (Abb.4.1). Cx40 Transkripte werden in murinen Embryonalkörperchen erstmals zwischen Tag 3 und Tag 8 der Differenzierung ausgeprägt (Oyamada et al., 1996). Die Expression dieses Connexins in embryonalen Stammzellen stellt also einen Unterschied zwischen den Spezies Mensch und Maus dar. Trotz

größtenteils gleicher Eigenschaften handelt es sich bei murinen und humanen ES-Zellen um verschiedene Zelltypen, die messbare Unterschiede in ihrem Genexpressionsprofil aufweisen (Ginis et al., 2004; Maurer et al., 2008). Dies äußert sich beispielsweise phänotypisch in verschiedenen Ansprüchen hinsichtlich essentieller Wachstumsfaktoren, die ihre Differenzierung in Zellkultur zu unterbinden vermögen. Um embryonale Stammzellen der Maus in undifferenziertem Zustand kultivieren zu können, ist beispielsweise die Zugabe des Interleukins LIF (leukemia inhibitory factor) in das Nährmedium notwendig (Williams et al., 1988). Humane ES-Zellen werden hingegen in einem Medium, welches unter anderem das Signalprotein FGF (fibroblast growth factor) enthält, kultiviert (Xu et al., 2005). Möglicherweise sind die Unterschiede darin begründet, dass sich humane und murine ES-Zellen von zeitlich leicht unterschiedlichen Embryonalstadien ableiten (Tesar et al. 2007; Brons et al., 2007).

Die in dieser Dissertation beschriebene Proteinexpression von Connexin31 wurde zuvor weder für humane noch für ES-Zellen der Maus gezeigt. Bei Studien an Cx31-Defektmäusen, die lacZ unter der Kontrolle des endogenen Cx31-Promotors exprimieren, konnte jedoch in der inneren Zellmasse von Blastozysten eine Aktivität des lacZ-Reportergens nachgewiesen werden (Plum et al., 2001). Dies lässt eine Ausprägung von Cx31 in embryonalen Stammzellen vermuten, da sich diese von der inneren Zellmasse ableiten.

Die im Zuge dieser Forschungsarbeit durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen an HM1 Zellen zeigen eine Lokalisation der exprimierten Connexine Cx31, Cx43 und Cx45 in den Zellmembranen. Das punktförmige Muster der Fluoreszenzsignale ist für Connexin-Proteine typisch und lässt auf eine Organisation der Halbkanäle (Connexone) in Gap Junction-Plaques schließen. Bei Immunfluoreszenzanalysen bei denen gleichzeitig Antikörper gegen Cx31, Cx43 und Cx45 eingesetzt wurden, konnten Plaque-artige Strukturen identifiziert werden, die jeweils von nur einem der Antikörper erkannt wurden und deshalb aus nur einem Subtyp von Connexinen bestehen könnten. Weiterhin fanden sich Strukturen, welche von zwei bzw. allen eingesetzten Antikörpern detektiert wurden. Da mehrere Connexinisoformen in einem Plaque lokalisiert sind, besteht also die Möglichkeit, dass heterotypische Gap Junction-Kanäle bzw. heteromere Connexone vorliegen.

### 5.1.1 Zusammensetzung der Connexone in ES-Zellen

In Kooperation mit Christian Markopoulos wurde die Zusammensetzung der einzelnen Halbkanäle (Connexone) in HM1 Zellen aus den drei Connexinisoformen Cx31, Cx43 und Cx45 untersucht.

Um die Ausprägung heteromerer Connexone in ES-Zellen nachzuweisen und die Zusammensetzung solcher Halbkanäle zu charakterisieren, wurden zuerst Connexone aus den Membranfraktionen von HM1 Zellen mittels Ultrazentrifugation im Saccharosegradienten aufgereinigt. Connexon-haltige Fraktionen konnten mit Hilfe eines Immunoblots mit spezifischen Antikörpern gegen Cx43 identifiziert und für die weiteren Experimente ausgewählt werden. Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen (Dr. G. Kirfel, Bonn) ließen hexamere Strukturen mit einer zentralen Pore erkennen und legen die Vermutung nahe, dass es sich aufgrund ihrer Größe um Connexone handeln könnte. Eine Ko-Immunpräzipitationsanalyse mit den Connexon-haltigen Fraktionen zeigte, dass in mit Cx43-Antikörpern präzipitierten Halbkanälen sowohl Cx31 als auch Cx43 enthalten sind. Gleiches galt für die mit Antikörpern gegen Cx31 präzipitierten Connexone. Auch Cx45 ließ sich in mit Cx43-Antikörpern präzipitierten Connexonen nachweisen und Cx43 fand sich umgekehrt in mit Antikörpern gegen Cx45 präzipitierten Connexonen. Im Gegensatz dazu konnte eine Interaktion von Cx31 mit Cx45 nicht nachgewiesen werden. Die Analysen demonstrieren, dass sowohl heteromere Halbkanäle aus Cx31- und Cx43- als auch aus Cx43- und Cx45-Untereinheiten in ES-Zellen der Maus gebildet werden, während Cx31 und Cx45 nicht im selben Halbkanal vorkommen.

Zusätzlich zu den heteromeren Connexonen werden ebenfalls homomere Halbkanäle ausgeprägt. Dies ist anzunehmen, da bei gleichzeitig durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen Cx31, Cx43 und Cx45 zusätzlich zu den teilweise kolokalisierten Fluoreszenzsignalen auch Gap Junction-Plaques nachgewiesen wurden, welche jeweils nur von einem der eingesetzten Antikörper detektiert worden waren.

Das Ergebnis dieser Untersuchung wirft nun zwei entscheidende Fragen auf:

- (1) Wieso werden in ES-Zellen drei verschiedene Connexinisoformen exprimiert ?
- (2) Was ist die Grundlage eingeschränkter Connexin-Kombinatorik im Halbkanal ?

### **5.1.2 Gap Junction-vermittelte Kommunikation**

Im Zuge dieser Arbeit wurden Mikroinjektionsanalysen durchgeführt, um nachzuweisen, dass Gap Junction-vermittelte Kommunikation unter physiologischen Bedingungen zwischen ES-Zellen stattfindet und dass auf diesem Weg ein passiver Austausch niedermolekularer Substanzen möglich ist. Dazu wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Lucifer Yellow und Ethidiumbromid sowie der Markierungsstoff Neurobiotin mittels einer spitzen Glaskapillare in einzelne Zellen injiziert. Die Experimente zeigen eine Ausbreitung der Moleküle von der injizierten in benachbarte ES-Zellen. Dabei war sowohl die Diffusion des negativ geladenen Moleküls Lucifer Yellow (-2) als auch der positiv geladenen Moleküle Ethidiumbromid (+1) und Neurobiotin (+1) über die Zellgrenzen hinweg zu beobachten. Das Molekulargewicht (MW) der injizierten Substanzen variierte vom kleinsten Molekül Neurobiotin (MW: 287) bis hin zum größten verwendeten Farbstoff Lucifer Yellow (MW: 443). Neurobiotin (MW: 287) breitete sich deutlich weiter im Zellverbund aus als das größere, gleich geladene Ethidiumbromid (MW: 394). Dies könnte mit dem Molekulargewicht der Farbstoffe zusammenhängen, aber auch mit dem Nachweis von Neurobiotin über eine Avidin-gekoppelte Peroxidase. Diese oxidiert das Substrat HistoGreen (Linaris) und es entsteht ein blauer Niederschlag. Ein solcher indirekter Nachweis ist deutlich sensitiver als die direkte Beobachtung eines fluoreszierenden Farbstoffes. Neben den verwendeten niedermolekularen Substanzen wurde auch Rhodamin Dextran injiziert. Das Molekül ist mit ca. 10 kDa zu groß, um durch Gap Junction-Kanäle diffundieren zu können. Dieses Experiment diente als Negativkontrolle um einen möglichen Farbstofftransfer über Plasmabrücken auszuschließen.

Die Mikroinjektionsanalysen zeigen, dass unter physiologischen Bedingungen ein Gap Junction-vermittelter, passiver Austausch von Ionen, Metaboliten sowie sekundären Botenstoffen zwischen benachbarten ES-Zellen innerhalb einer Kolonie möglich ist.

### **5.1.3 Connexinexpression in Blastozysten**

Immunfluoreszenzanalysen an C57BL/6-Blastozysten zeigten Cx31 und Cx43 in der inneren sowie in der äußeren Zellmasse (Fig.4.4). Über die Expression von Cx45 konnte in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden, da die mit den verfügbaren Antikörpern durchgeführte Immunfluoreszenzanalyse kein eindeutiges und somit überzeugendes Ergebnis zeigte. An Kolonien embryonaler Stammzellen konnte gezeigt werden, dass der Cx45 Antikörper grundsätzlich zuverlässig funktioniert. Da die Immunfluoreszenzanalyse

an Blastozysten jedoch schwierig und aufwendig durchzuführen ist, konnten die optimalen Bedingungen für eine Analyse mit dem Cx45 Antikörper aus Zeitgründen nicht zufriedenstellend etabliert und durchgeführt werden. In einer 2002 veröffentlichten Studie zeigten Houghton und Mitarbeiter bereits die Ausprägung von Cx26, Cx31, Cx43 und Cx45 in der inneren Zellmasse von Blastozysten der Ratte und Cx31, Cx43 und Cx45 in der inneren Zellmasse eines Mausembryos. Connexin26 wird nur in Rattenblastozysten exprimiert und stellt somit in seinem Expressionsmuster einen Unterschied zwischen den nahe verwandten Spezies Maus und Ratte dar. Dies lässt vermuten, dass Cx26 auch in ES-Zellen von Ratten als zusätzliches viertes Connexin ausgeprägt sein könnte.

Die Expression von Cx31, Cx43 und Cx45 in Blastozysten und embryonalen Stammzellen der Maus zeigt, dass es sich bei der Ausprägung von Connexinen nicht um eine Anpassung der Zellen in Folge der Kulturbedingungen *in vitro*, sondern um Eigenschaften der inneren Zellmasse der Blastozyste *in vivo* handelt. Somit eignen sich ES-Zellen als Modellsystem, um die Funktion von Connexinen und Gap Junctions in der frühen Embryogenese zu untersuchen.

### **5.1.4 Zusammenfassung der Untersuchungen zur Expression von Connexinen**

In HM1 ES-Zellen werden sieben Connexin-mRNAs ausgeprägt, von denen drei translatiert werden und als Protein nachweisbar sind. Es handelt sich hierbei um Cx31, Cx43 und Cx45 deren Expression bereits in der inneren Zellmasse von Blastozysten der Maus und der Ratte gezeigt wurde (Houghton et al., 2002). Die Connexone sind in den Zellmembranen der embryonalen Stammzellen lokalisiert und zeigen in der Immunfluoreszenzanalyse ein punktförmiges Signalmuster, was auf eine Anordnung in Gap Junction-Plaques hindeutet. Ko-Immunopräzipitationsanalysen an aufgereinigten Connexonen belegen, dass heteromere Halbkanäle aus Cx31 und Cx43 sowie Cx43 und Cx45 ausgeprägt werden. Darüber hinaus sind auch homomere Connexone aus jeweils einer der drei Connexinisoformen möglich. Mikroinjektionsanalysen zeigen die Ausbreitung injizierter niedermolekularer Fluoreszenzfarbstoffe mit negativer und positiver Ladung sowie verschiedenen Molekulargewichten zwischen 287 und 443. Dies ist ein direkter Nachweis für Gap Junction-vermittelte Kommunikation zwischen embryonalen Stammzellen. Eine Ausbreitung via Plasmabrücken lässt sich durch Injektionen des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin Dextran (10 kDa) ausschließen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ES-Zellen mittels Gap Junction-Kanälen verbunden und somit im Stande sind, ein funktionelles Synzytium auszubilden. Innerhalb

des Zellverbundes können sich somit Ionen, Metabolite oder sekundäre Botenstoffe durch Diffusion ausbreiten (Goldberg et al., 2004). Des Weiteren ist ebenfalls ein Austausch kleiner Peptide (Neijssen et al., 2007) und siRNAs (Wolvetang et al., 2007) möglich. Aufgrund der Tatsache, dass siRNAs mittels Gap Junction-Kanälen zwischen benachbarten ES-Zellen ausgetauscht werden können, sollte dies auch für miRNAs denkbar sein. Diese sind unter anderem als Regulatoren für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen beschrieben (Chen et al., 2008). Auch Kalziumoszillationen können mittels Gap Junction-Kanälen in benachbarte Zellen weitergeleitet werden und dort möglicherweise die Genexpression regulieren (Muller-Borer et al., 2006 und 2007; Anderson et al., 2007). Solche spontanen Oszillationen sind in embryonalen Stammzellen messbar (Dr. Radoslaw Dobrowolski, persönliche Mitteilung) und sind dort unter anderem an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Kapur et al., 2007). Kalziumoszillationen spielen auch während der Differenzierung von Stammzellen eine Rolle (Muller-Borer et al., 2006, Anderson et al., 2007). Darüber hinaus wird ein Einfluss Gap Junction-vermittelter Kommunikation auf Prozesse wie Apoptose und Proliferation diskutiert (Krysko et al., 2005; Kardami et al., 2007). Möglicherweise ist ein funktionell gekoppeltes Synzytium weniger anfällig gegenüber Zell-Stress (z.B. oxidativem Stress), was sich auf die Überlebensraten bzw. die Proliferationsrate der ES-Zellen auswirken könnte (Lin et al., 2003; Giardina et al., 2007; Hutnik et al., 2008).

Ein Hinweis auf die mögliche Funktion von Connexinen in ES-Zellen ist die Identifikation der Promotorregion von Cx43 als Bindestelle der drei Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und nanog, welche für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz in ES-Zellen verantwortlich sind (Boyer et al., 2005; Niwa et al., 2007). Für die Promotoren der Connexine Cx31 und Cx45 sind solche Bindestellen noch nicht beschrieben. Des Weiteren haben Assou und Mitarbeiter (2007) die Connexine Cx43 und Cx45 auf einer „Konsensus-Liste“ für Marker undifferenzierter humaner ES-Zellen aufgeführt, welche die Autoren aus 38 bereits zuvor publizierten Transkriptomanalysen zusammenstellten.

	Blastozyste (IZM)	ES-Zellen		Referenzen
	Protein	mRNA	Protein	
Maus	Cx31, Cx43, Cx45	Cx26, Cx30.3, Cx31, Cx32, Cx37, Cx43, Cx45	Cx31, Cx43, Cx45	Houghton et al., 2002; Wörsdörfer et al., 2007
Ratte	Cx26, Cx31, Cx43, Cx45	keine Daten vorhanden	keine Daten vorhanden	Houghton et al., 2002
Mensch	Cx43	alle außer Cx40.1 und Cx50	Cx40, Cx43, Cx45	Hardy et al., 1996; Wong et al., 2006; Hüttner et al., 2006

**Tab.1: Tabellarische Darstellung der exprimierten Connexin-mRNAs und -proteine in der inneren Zellmasse (IZM) von Blastozysten und in ES-Zellen von Maus, Ratte und Mensch.** Für ES-Zellen der Maus liegt mit dieser Dissertation eine vollständige Charakterisierung der Connexinexpression vor. Alle anderen Auflistungen stellen die bis dato identifizierten Connexine dar und geben damit vermutlich nicht das komplette Expressionsprofil wider.

## **5.2 Analysen zur Funktion der Gap Junction-vermittelten Zell-Zell-Kommunikation in ES-Zellen**

### **5.2.1 Pharmakologische Blockade der Gap Junction-vermittelten Zell-Zell-Kopplung**

Nach der umfassenden Beschreibung der Connexinexpression sollten Experimente zur Aufklärung der Funktion von Gap Junction-vermittelter Kommunikation in embryonalen Stammzellen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck sollte die direkte interzelluläre Kopplung zwischen benachbarten ES-Zellen unterbunden werden. In einem ersten Ansatz wurden HM1 Zellen mit den pharmakologischen Gap Junction-Inhibitoren 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure (18-AGA) und Carbenoxolon behandelt. Dies reduzierte die interzelluläre Diffusion von mikroinjiziertem Neurobiotin innerhalb des Zellverbundes um 96%. Dabei war zu beobachten, dass die Zahl apoptotischer ES-Zellen von 10% auf 60% in Anwesenheit von 18-AGA und von 10% auf 40% in Gegenwart von Carbenoxolon anstieg, was mittels einer AnnexinV-Färbung unfixierter Zellen und dem Nachweis von gespaltenem PARP gezeigt werden konnte. Die Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Gap Junction-vermittelte Kommunikation für das Überleben embryonaler Stammzellen nicht nur förderlich, sondern möglicherweise sogar notwendig ist. Eine solche Annahme wird durch Ergebnissen von Ngezahayo und Mitarbeitern. (2005) unterstützt, die einen Anstieg der Apoptoserate nach Entkopplung von Granulosazellen mittels pharmakologischer Gap Junction-Inhibitoren beschrieben haben. Bannermann et al. (2000) publizierten einen ähnlichen Effekt in Neuralleistenzellen und Cheng et al. (2004) beobachteten einen Anstieg der Apoptose in kortikalen, neuralen Vorläuferzellen nach Behandlung mit 18-AGA.

Möglicherweise könnten Signalmoleküle zwischen ES-Zellen ausgetauscht werden, welche sich positiv auf das Überleben auswirken. Als Botenstoffe kommen dabei kleine Moleküle wie z.B. IP<sub>3</sub>, cAMP, ATP oder Kalziumionen in Frage. Diese Modulatoren des Zellschicksals können sowohl bei der Initiation der Apoptose eine Rolle spielen, als auch Zellen vor dem programmierten Zelltod schützen. Ob diese Botenstoffe pro- oder antiapoptotisch wirken, hängt dabei jeweils vom Zustand der Zelle, dem Zelltyp bzw. den äußeren Einflüssen ab, denen die Zellen ausgesetzt sind (Krysko et al., 2005). Darüber hinaus ist bekannt, dass Gap Junction-vermittelte Kommunikation Zellen vor stressbedingter Apoptose z.B. durch oxidativen Stress schützt (Lin et al., 2003; Giardina et al., 2007; Hutnik et al., 2008).

Ein weiterer antiapoptotischer Signalweg bei dem Connexinhalbkanäle beteiligt sind, wurde

von Plotkin et al. (2002) publiziert. Die Autoren zeigten, dass Cx43 an einer antiapoptotischen Signalkaskade beteiligt ist, welche die Aktivierung der Src-Kinase beinhaltet und letztendlich zu einer Phosphorylierung von ERK führt. Dies vermittelt wiederum den antiapoptotischen Effekt. Das Modell, das nach Untersuchungen an mit Connexinen transfizierten HeLa-Zellen entwickelt wurde, beruht lediglich auf Cx43. Cx31 und Cx45 vermitteln diesen Effekt nicht. Da bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Cx43-defizienten Zellen jedoch keinerlei Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zu Wildtypzellen zu beobachten war, ist das Modell von Plotkin und Mitarbeitern nicht auf den vorliegenden Fall übertragbar.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Dissertation in Kombination mit den Hinweisen aus der Literatur den Schluss zu, dass ein antiapoptotischer Effekt, vermittelt durch Gap Junction-vermittelte Kommunikation, in embryonalen Stammzellen möglich ist.

### **5.2.2 Hinweise auf unspezifische Seiteneffekte pharmakologischer Gap Junction-Inhibitoren**

Suadiciani et al. beschreiben 2006 die antagonistische Wirkung der pharmakologischen Gap Junction-Inhibitoren Carbenoxolon und 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure auf purinerge Rezeptoren (P2 Rezeptoren). Da sich in der Literatur Hinweise darauf finden, dass P2 Rezeptoren, insbesondere P2X7, bei der Initiation von Apoptose und Pseudoapoptose in bestimmten Zelltypen eine Rolle spielen (Tsukimoto et al., 2006; Mackenzie et al., 2005) wurden die HM1 ES-Zellen neben den Gap Junction-Inhibitoren auch mit PPADS, einem generellen Antagonisten von P2 Rezeptoren behandelt. Dabei war selbst bei einem Einsatz hoher Dosen PPADS (100  $\mu$ M) kein Anstieg der Apoptoserate zu beobachten. Dies zeigt, dass der von 18-AGA bzw. Carbenoxolon ausgelöste Zelltod nicht durch eine antagonistische Wirkung der Inhibitoren auf P2 Rezeptoren hervorgerufen werden kann.

Neben der unspezifischen Wirkung der verwendeten Gap Junction-Inhibitoren auf P2 Rezeptoren sind jedoch noch eine Reihe weiterer Effekte der 18-AGA, beispielsweise als Inhibitor der 11-beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 in der Literatur beschrieben (Horigome et al., 1999 und 2001; Classen-Houben et al., 2009). Außerdem zeigen verschiedene Studien die proapoptotische Wirkung von 18-AGA auf diverse Zelltypen wie z.B. auf eine Leberkarzinomzelllinie (HepG2 Zellen) (Satomi et al., 2005), auf Thymozyten oder Splenozyten (Horigome et al., 1999 und 2001). In allen diesen Publikationen wird ein Connexin-unabhängiger Mechanismus als Auslöser der Apoptose diskutiert. In der Leber und in der Niere werden darüber hinaus eigene Rezeptoren für Glycyrrhetinsäurederivate

ausgebildet, was auf eine physiologische Rolle der Substanzen in diesen Organen hindeutet (Negishi et al., 1991).

### **5.2.3 Deletion von Cx43 und Reduktion der Cx31 und Cx45 mRNA-Menge mittels siRNA**

Die während der vorliegenden Studien mittels pharmakologischer Inhibitoren durchgeführten Experimente gaben Anlass zu der Vermutung, dass die Blockade Gap Junction-vermittelter Kommunikation in embryonalen Stammzellen Apoptose auslösen könnte. Zugleich bietet die Literatur zahlreiche Hinweise auf Effekte von 18-AGA, die über deren Wirkung auf Gap Junctions hinausgehen. Deshalb sollte zusätzlich zu dem Einsatz pharmakologischer Inhibitoren eine Reduktion der Gap Junction-vermittelten Kommunikation mittels genetischer Methoden erreicht werden. Zu diesem Zweck wurde ein Ansatz gewählt, welcher die komplette Deletion von Cx43 mit einer Reduktion der Transkriptmenge von Cx31 und Cx45 durch siRNAs kombiniert. Um Cx43-defiziente ES-Zellen zu erhalten, wurden zunächst Cx43<sup>flox</sup>CreER(T) Zellen, die von Dr. Dominik Eckardt während seiner Dissertation an diesem Institut erzeugt wurden, mit einer membrangängigen Cre-Rekombinase transduziert. Anschließend wurden die ES-Zellen klonal ausgesät und einzelne Cx43 defiziente Klone isoliert und charakterisiert.

Nach der Mikroinjektion von Neurobiotin in Cx43-Defektzellen konnte eine Reduktion der Gap Junction-vermittelten Kommunikation um 90% beobachtet werden. Dies zeigt, dass Cx43 einen Großteil der direkten Zell-Zell-Kopplung in ES-Zellen vermittelt. Die Cx43-defizienten Zellen zeigten keine augenscheinlichen morphologischen Unterschiede zu Wildtyp ES-Zellen und wiesen keine erhöhten Apoptoseraten auf.

Mittels spezifischer siRNAs konnte anschließend zusätzlich eine durchschnittliche Herabregulation von Cx31 um 87% und von Cx45 um 75% erreicht werden. 96 Stunden nach der Transfektion zeigte sich eine Reduktion der Gap Junction-vermittelten Kommunikation um ca. 50%, verglichen mit Cx43-defizienten Zellen, was mittels Mikroinjektion von Neurobiotin nachgewiesen werden konnte. Bezogen auf HM1 Zellen ergab sich damit eine Verminderung der Zell-Zell-Kommunikation um 95%. Dies entspricht ungefähr der Reduktion, die nach Blockade der Gap Junction-vermittelten Kommunikation mit dem pharmakologischen Inhibitor 18-AGA bei HM1 Zellen beobachtet wurde. Trotz dieses starken Kopplungsverlustes konnte jedoch keine Erhöhung der Apoptoserate beobachtet werden.

### 5.2.4 Wirkungsweise von 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure auf ES-Zellen

Um die Diskrepanz zwischen Pharmakologie und Genetik erklären zu können, wurden nähere Analysen zur Wirkungsweise der Inhibitoren auf HM1 bzw. auf Cx43-defiziente ES-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure behandelt. Anschließend wurde Neurobiotin in einzelne Zellen injiziert und die Ausbreitung des Markierungsstoffes im Zellverbund quantifiziert. Bei den injizierten HM1 Zellen zeigte sich, dass ab einer Konzentration von 60  $\mu$ M 18-AGA die Gap Junction-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation um 90% vermindert wurde. Bei einer Erhöhung der Inhibitorkonzentration auf 80  $\mu$ M war eine weitere Reduktion der Farbstoffausbreitung auf 4% der ursprünglichen Kopplung zu beobachten. Höhere Konzentrationen führten zu keinem weiteren Kopplungsverlust. Wurden die gleichen Experimente an Cx43-defizienten ES-Zellen durchgeführt, zeigte sich interessanterweise kein Effekt auf den Gap Junction-vermittelten interzellulären Neurobiotin-Transfer. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure Gap Junctions aus Cx43-Untereinheiten blockiert, aber nicht auf Cx31 und Cx45 zu wirken scheint. Die These wird durch eine Studie von He et al. (2005) unterstützt. Die Autoren zeigten, dass die von Connexin31 vermittelte Zell-Zell-Kopplung in transfizierten HeLa Zellen nicht durch Gabe von 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure blockiert werden kann. Die während dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Wirkung von 18-AGA auf Connexin45 konnten darüberhinaus an vaskulären Glattmuskelzellen verifiziert werden (Hanner et al., 2008). Dies zeigt, dass 18-AGA kein genereller Inhibitor Gap Junction-vermittelter Kommunikation ist, wie bisher angenommen wurde. Dies könnte darin begründet liegen, dass der pharmakologische Inhibitor seine Wirkung über die Aktivierung der Proteinkinase C entfaltet. Diese phosphoryliert anschließend Cx43 an Ser368, was wiederum zum Verschluss des Gap Junction-Kanals führt (Goldberg et al., 1996; Guan et al., 1996; Liang et al., 2008). Connexine, die keine entsprechende Phosphorylierungsstelle besitzen bzw. deren Öffnungs- und Schließverhalten auf andere Weise reguliert wird, würden somit nicht beeinflusst.

Interessant ist weiterhin, dass die Farbstoffausbreitung in HM1 Zellen nach Gabe von mehr als 80  $\mu$ M 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure unter die in Cx43-defizienten Zellen beobachtete Zell-Zell-Kopplung sinkt. Dies könnte ein indirekter Nachweis für heteromere Kanäle aus Cx31 und Cx43 bzw. Cx43 und Cx45 sein. Diese werden, da sie Connexin43 enthalten, ebenfalls von dem Gap Junction-Inhibitor blockiert. Die zu beobachtende restliche Kopplung von 4% wird wahrscheinlich von den weiterhin geöffneten homomeren Cx31- bzw. Cx45-Kanälen vermittelt.

Untersucht man die Apoptoseraten von HM1 und Cx43-defizienten ES-Zellen bei verschiedenen 18-AGA-Konzentrationen, lässt sich bei beiden Zelllinien ein kontinuierlicher Anstieg der Apoptose mit steigenden Inhibitorkonzentrationen beobachten. Dabei erhöht sich die Zahl apoptotischer Zellen auch bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  18-AGA weiter, obwohl in HM1 Zellen bereits bei 80  $\mu\text{M}$  des Inhibitors eine maximale Reduktion der Zell-Zell-Kopplung erreicht ist. Darüber hinaus löst 18-AGA in Cx43CreER(T) Zellen Apoptose aus, obwohl der pharmakologische Inhibitor die interzelluläre Kommunikation nicht beeinflusst. Diese Beobachtungen zeigen, dass 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure die ES-Zellen unabhängig von dem Effekt auf die Gap Junction-vermittelte Kopplung in den apoptotischen Zelltod treibt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der pharmakologische Gap Junction-Inhibitor 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure Connexin43 effizient blockiert, während die Kopplung, welche von den Connexinen Cx31 und Cx45 vermittelt wird nicht beeinflusst ist. Darüber hinaus wird die von 18-AGA induzierte Apoptose unabhängig von der Blockade der Gap Junction-vermittelten Kommunikation ausgelöst und geht wahrscheinlich auf einen unbekanntem Nebeneffekt des Inhibitors zurück. Somit konnte die zunächst in dieser Arbeit aufgestellte These, dass Gap Junctions in embryonalen Stammzellen einen Schutz vor dem programmierten Zelltod vermitteln, nicht bestätigt werden. Die Experimente zeigen, dass mit Hilfe pharmakologischer Gap Junction-Inhibitoren erzielte Ergebnisse, insbesondere im Hinblick auf Apoptose, vorsichtig interpretiert werden müssen und mit zusätzlichen genetischen Methoden überprüft werden sollten. Dies gilt im Kontext dieser Dissertation beispielsweise für eine Arbeit von Wong et al. (2006). Die Autoren beschreiben dort erhöhte Apoptoseraten und eine Reduktion der Zell-Proliferation in humanen embryonalen Stammzellen, die zuvor mit 18-AGA behandelt wurden. Des Weiteren legte eine Studie an Mausembryonen, die in Anwesenheit von 18-AGA vom 8-Zellstadium bis zum Blastozystenstadium kultiviert wurden die Vermutung nahe, dass Gap Junction-vermittelte Kommunikation während der Präimplantationsentwicklung der Maus keine entscheidende Rolle spielt (Vance und Wiley, 1999). In Anbetracht der Tatsache, dass bei diesen Experimenten jedoch lediglich ein Teil der Zell-Zell-Kopplung inhibiert wurde, wäre es interessant diese Studien mittels genetischer Ablation von Connexinen zu wiederholen.

### 5.3 Erzeugung Cx43/Cx45 doppelt defizienter embryonaler Stammzellen

Um die Funktion von Connexinen in embryonalen Stammzellen weiter untersuchen zu können, ohne dabei auf pharmakologische Gap Junction-Inhibitoren bzw. siRNAs zurückgreifen zu müssen, wurden Blastozysten transgener Mäuse isoliert. Aus diesen wurde eine ES-Zelllinie hergestellt, in deren Genom Cx43 und Cx45 homozygot von loxP-Stellen flankiert vorliegen. Die Tiere gingen aus einer Kreuzung von Cx43flox/flox und Cx45flox/flox Mäusen hervor, welche zuvor an diesem Institut erzeugt worden waren (Eckardt et al., 2004; Maxeiner et al., 2005).

Eine der isolierten Zelllinien (Cx43/Cx45flox) wurde für die weiteren Experimente ausgewählt und auf einen korrekten Karyotyp (38+XY) hin überprüft. Die embryonalen Stammzellen ließen sich in Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren. Dies konnte mittels spezifischer Antikörper gegen Markerproteine für Zellen des Mesoderm (alpha-aktinin), Ektoderm (GFAP und  $\beta$ -TubulinIII) und Endoderm ( $\alpha$ -Fetoprotein) nachgewiesen werden und beweist die Pluripotenz der isolierten Stammzelllinie. Darüber hinaus wurden die Cx43/Cx45flox Zellen in Blastozysten von swiss webster (CFW) albino Mäusen injiziert und diese scheinchwangeren Leihmüttern implantiert. Bei den Experimenten ging aus zwei Würfen insgesamt nur ein gering chimäres Tier hervor. Die injizierten Zellen trugen jedoch nicht zur Bildung der Keimbahn bei. Daraus lässt sich folgern, dass die isolierten ES-Zellen grundsätzlich das Potential besitzen, sich in eine Blastozyste zu integrieren und einen chimären Organismus zu erzeugen. Der Grad des Fellfarbenschimärismus war jedoch sehr gering, was auf ein reduziertes Potential der Zellen hindeuten kann. Da die Injektion in swiss webster (CFW) Blastozysten in diesem Labor zum ersten Mal durchgeführt wurde, könnte es aber auch sein, dass die optimalen Injektionsbedingungen erst noch etabliert werden müssen. Die Differenzierungsexperimente zeigen in jedem Fall, dass die isolierten ES-Zellen grundsätzlich das Potential besitzen in Zelltypen aller drei Keimblätter zu differenzieren und zu einem chimären Organismus beizutragen.

Die Cx43/Cx45flox ES-Zellen wurden mit einer transduzierbaren Cre-Rekombinase behandelt, um die beiden Connexine zu deletieren. Anschließend wurden die Zellen stark vereinzelt ausgesät, sodass sich Kolonien bildeten, die aus jeweils einer Zelle herangewachsen waren. Diese wurden isoliert, charakterisiert und expandiert, um homozygot Cx43/Cx45 defiziente Klone zu erhalten. Die erfolgreiche Deletion wurde mittels PCR-, RT-PCR- und Immunoblotanalysen überprüft. Zudem führte die Deletion der Connexine zur Expression der Reportergene lacZ und eGFP unter Kontrolle des Cx43- bzw. Cx45-Promotors (siehe Eckhardt et al., 2004, und Maxeiner et al., 2005). Die

Ausprägung der Reportergene wurde mit Hilfe einer  $\beta$ -Galaktosidase-Darstellung, durch Fluoreszenzmikroskopie und durch Immunoblotanalyse nachgewiesen.

Mikroinjektionen mit dem Markierungsstoff Neurobiotin zeigten, dass der Verlust der beiden Connexine zu einer Verminderung der Zell-Zell-Kopplung um 96% führt. Damit liegt in diesen Zellen eine ähnlich starke Reduktion der interzellulären Kommunikation vor, wie sie auch nach der Behandlung von HM1-Zellen mit pharmakologischen Gap Junction-Inhibitoren oder der Deletion von Cx43 bei gleichzeitiger Reduktion der Cx31 und Cx45 Transkriptmenge mittels siRNAs zu beobachten war.

Ausgangspopulation für die Erzeugung der Cx43/Cx45 doppeldefizienten ES-Zelllinie waren Zellen, in denen sowohl das Exon 3 von Cx43 als auch von das Exon 3 von Cx45 flankiert von loxP Stellen vorliegen. Während Cx43 auf Chromosom 10 lokalisiert ist, liegt der genetische Locus von Cx45 auf Chromosom 11. Theoretisch ist neben der Deletion der Connexine ebenfalls eine Cre-vermittelte interchromosomale Translokation möglich. Mittels der durchgeführten PCR-Analysen ist ein solches Ereignis nicht auszuschließen. In der Literatur ist die Cre-vermittelte interchromosomale Translokation beschrieben (Smith et al., 1995; van Deursen et al., 1995; Buchholz et al., 2005) und die Wahrscheinlichkeit für ein solches Ereignis wird je nach untersuchtem genomischem Locus mit  $2 \times 10^{-3}$  bis  $10^{-8}$  angegeben. Auch wenn ein solches Rekombinationsereignis somit unwahrscheinlich ist und die Cre-Rekombinase aufgrund der Proteintransduktion nur wenige Stunden transient in den Zellen aktiv war, sollte ein Southernblot durchgeführt werden, um ein solches Rekombinationsereignis auszuschließen.

### **5.3.1 Vergleich der Cx43/Cx45flox ES-Zellen mit den Cx43/Cx45-doppeldefizienten ES-Zellen im Bezug auf Morphologie, Proliferation und Apoptose**

Im direkten Vergleich mit den Kontrollzellen wiesen die Connexin-defizienten ES-Zellen keine morphologischen Unterschiede auf. Die kleinen, kugeligen Zellen wuchsen dicht gepackt in runden bis ovalen Kolonien mit klar begrenzten Rändern. Ein mittels Immunoblotanalyse durchgeführter Vergleich der Expressionsstärke des Stammzellmarkers Oct4 zeigte keinen Unterschied zwischen beiden Zelllinien. Oct4 ist ein in embryonalen Stammzellen exprimierter Transkriptionsfaktor, welcher zusammen mit Sox2 und nanog für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz verantwortlich ist (Niwa et al., 2007). Wurde den ES-Zellen für zwei bzw. vier Tage das Interleukin LIF entzogen, führte dies zu einer leichten Reduktion der Oct4-Expression. Diese Abnahme der Proteinmenge fand in beiden Zelllinien in einem vergleichbaren Maße statt. Studien von Todorova et al.

(2008) beschreiben eine deutliche Reduktion der Oct4 und nanog Proteinexpression in humanen ES-Zellen, in denen die Cx43 Proteinmenge mittels siRNA um 90% reduziert wurde. Diese Beobachtung konnte während dieser Arbeit an Cx43/Cx45-defizienten murinen ES-Zellen nicht bestätigt werden.

Da die Beteiligung von Connexinen bzw. von Gap Junction-Kanälen sowohl im Hinblick auf die Kontrolle von Apoptose als auch im Hinblick auf Zellproliferation diskutiert wird (Krysko et al., 2005; Kardami et al., 2007), wurden Analysen zur Bestimmung der Proliferations- sowie Apotoseraten durchgeführt. Mittels Propidiumiodidfärbung und anschließender FACS-Analyse (**F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orting) wurden die Wachstumsraten der beiden Zelllinien miteinander verglichen. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den Connexin-defizienten und den Kontrollzellen festgestellt werden. Gleiches galt für die Bestimmung der Apotoseraten. Auch hier wurden keine Unterschiede zwischen den Zellpopulationen gemessen, weder mittels eines kommerziell erhältlichen AnnexinV-Testverfahrens, noch durch Immunoblotanalysen mit Antikörpern gegen PARP bzw. die gespaltene Caspase3.

Man könnte nun argumentieren, dass dieses Ergebnis zu erwarten war. Denn wie schon zuvor in dieser Arbeit beschrieben, hatte der komplette Verlust von Cx43 bei gleichzeitiger Reduktion der Transkriptmenge von Cx31 und Cx45 keinen offensichtlichen Effekt auf HM1 Zellen. Jedoch weisen die nun verwendeten Cx43/Cx45-defizienten ES-Zellen eine homozygote Deletion von Cx45 auf. Bei den vorangegangenen Experimenten war die Expression dieses Connexins mittels siRNA lediglich um durchschnittlich 75% reduziert worden. Es bestand also die Möglichkeit, dass die 25% Restexpression ausreichend sind, um einen möglichen Effekt zu kompensieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz einer Reduktion der Gap Junction-vermittelten Zell-Zell-Kommunikation um 96% keine Veränderung der Zellmorphologie bzw. der Proliferations- oder Apotoseraten von Cx43/Cx45del Zellen festgestellt wurde. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass ein Gap Junction-vermittelter antiapoptotischer Effekt unter optimalen Kulturbedingungen nicht zu beobachten ist, aber unter gewissen Umständen doch eine Rolle spielt. So ist bekannt, dass direkte Zell-Zell-Kommunikation ein funktionales Synzytium vor apoptotischem Zelltod, z.B. bei oxidativem Stress, schützt (Lin et al., 2003; Giardina et al., 2007). Weiterführende Experimente unter induzierten Stressbedingungen wurden aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Dennoch wäre es interessant zu untersuchen, ob ein Connexin-abhängiger Mechanismus zur Stressabwehr auch in ES-Zellen eine Rolle spielt. Dazu könnte dem Kulturmedium Menandion zugesetzt werden. Dies führt zu einem Anstieg von Sauerstoffradikalen

(Giardina et al., 2007). Ebenso wäre es möglich, das Medium mit Wasserstoffperoxid anzureichern. Erfüllen Connexine eine antiapoptotische Funktion, sollten Cx43/Cx45-Defektzellen Konditionen jenseits der optimalen Kulturbedingungen weniger gut ertragen können als die Kontrollzellen.

Es wäre möglich, dass Connexin31 den Verlust der anderen Connexinisoformen komplett kompensieren kann. So ist beispielsweise beschrieben, dass nach Deletion von Cx43 in Astrozyten, die verbleibenden 5% der ursprünglichen Zell-Zell-Kommunikation ausreichend sind, um Kalziumwellen weiterzuleiten (Scemes et al., 1998). Entsprechend könnten auch die verbleibenden 4% an Zell-Zell-Kopplung in Cx43/Cx45del ES-Zellen ausreichen, um keine phänotypischen Unterschiede entstehen zu lassen. Um dies zu überprüfen, müsste die Cx31-Genexpression in Cx43/Cx45-Defektzellen z.B. mit Hilfe von siRNAs reduziert werden, um eine möglichst komplette Entkopplung zu erreichen.

Neben Cx31 kommen weiterhin die Connexine Cx26, Cx32, Cx37 und Cx30.3 in Frage, den Verlust von Cx43 und Cx45 zu kompensieren. Diese werden in ES-Zellen transkribiert, sind aber nicht als Proteine detektierbar. Möglicherweise werden diese Connexine in Cx43/Cx45del Zellen translatiert. Dagegen spricht allerdings, dass mittels Mikroinjektion eine stark reduzierte Kopplung in den Defektzellen nachgewiesen werden konnte. Dies lässt vermuten, dass nur Cx31 ausgeprägt wird. Auch Immunoblotanalysen mit spezifischen Antikörpern gegen Cx26, Cx32 und Cx37 lieferten weder in Cx43/Cx45 defizienten ES-Zellen noch in den verwendeten Kontrollzellen einen Nachweis für die Expression dieser Proteine.

Methode	Cx31	Cx43	Cx45	GJIC	Apoptose ↑
pharmakologischer Inhibitor (18-AGA)	- (He et al., 2005)	Kanäle geschlossen	- (Hanner et al., 2008)	-96%	ja
Deletion von Cx43	-	deletiert	-	-90%	nein
Deletion von Cx43 und siRNA vermittelte Herabregulation von Cx31 und Cx45	- 87%	deletiert	-75%	-95%	nein
Deletion von Cx43 und Cx45	-	deletiert	deletiert	-96%	nein

**Tab.2: Tabellarische Darstellung der Effekte unterschiedlicher Methoden zur Modulation von Gap Junction-vermittelter Kommunikation auf die direkte Zell-Zell-Kopplung und auf das Apoptose Ausmaß in ES-Zellen.** GJIC: Intercellular Gap Junctional Communication. - : kein messbarer Effekt.

#### 5.4 Überlegungen zur Funktion von Connexinen in ES-Zellen und während der frühen Embryonalentwicklung

Im Zuge dieser Dissertation wurde die Funktion bzw. Expression von Gap Junction-Kanälen in embryonalen Stammzellen mittels genetischer Deletion, RNA-Interferenz bzw. pharmakologischer Blockade moduliert. Dennoch konnte die Frage nach der Funktion von Gap Junctions in ES-Zellen nicht beantwortet werden. Trotz starker Reduktion der Connexinexpression bzw. kompletter Deletion der Connexine, sowie starker Verminderung der Gap Junction-vermittelten Kopplung, wurden keine Unterschiede zu den entsprechenden Kontrollzellen festgestellt.

Connexine werden sowohl in ES-Zellen als auch in der inneren Zellmasse von Blastozysten exprimiert. Ihre Ausprägung stellt jedoch kein ausschließliches Charakteristikum dieser Zellen dar, sondern zieht sich durch die komplette frühe Embryonalentwicklung. Connexinproteine sind in Mäuseembryonen ab dem 8-Zellstadium nachweisbar und bilden bei der Kompaktierung der Morula erstmals Gap Junction-Kanäle (Davies et al., 1996; Houghton et al., 2002). Auch nach der Implantation und während der darauf folgenden Entwicklungsschritte werden Connexine ausgeprägt, wobei eine Kompartimentierung stattfindet. Connexin31, Cx43 und Cx45 findet man im Blastozystenstadium in der inneren wie äußeren Zellmasse. Ab der Einnistung im Uterus ist Cx31 fast ausschließlich in Zellen der trophektodermalen Linie nachweisbar, während

sich die Ausprägung von Cx43 und Cx45 weitestgehend auf Zellen beschränkt die sich von der inneren Zellmasse ableiten (Dahl et al., 1996). Cx43 und Cx45 sind darüber hinaus sowohl während der Kardiomyozytendifferenzierung als auch in schlagenden Herzmuskelzellen ausgeprägt (Oyamada et al., 1996). Außerdem werden beide Connexine bei der neuralen Differenzierung koexprimiert (Rozental et al., 2000; Cai et al., 2004).

Als embryonale Stammzellen bezeichnet man eine Zellpopulation, die sich aus der inneren Zellmasse der Blastozyste ableitet. Somit sind sie eine Momentaufnahme einer kurzen Phase während der Entwicklung des Embryos (Evans et al., 1981; Martin et al., 1981). Die Zellen der inneren Zellmasse stellen einen Übergangszustand dar, der *in vivo* lediglich wenige Stunden existiert. Deshalb ist es denkbar, dass Connexine dort überhaupt keine Rolle spielen, sondern bereits translatiert vorliegen, um in späteren Entwicklungsstadien zur funktionellen Kompartimentierung ad hoc beizutragen, wie beispielsweise während der Bildung des primitiven Endoderms oder der weiteren Differenzierung des Epiblasten. Darüberhinaus ist ebenfalls eine Funktion der Connexine während der Entwicklung der Morula hin zur Blastozyste möglich.

Selbst wenn Connexine und Gap Junctions in den Zellen der inneren Zellmasse eine wichtige Funktion erfüllen, muss dies nicht auch für embryonale Stammzellen *in vitro* gelten. Erstens fehlt den Zellen in Kultur die Interaktion mit der äußeren Zellmasse und zweitens werden sie in einer artifizialen Umgebung unter Bedingungen kultiviert, die nicht denen im Uterus entsprechen. Zudem sind die ES-Zellen, im Gegensatz zur inneren Zellmasse vom streng zeitlich getakteten Entwicklungsprozess des Embryos abgekoppelt. *In vivo* könnte die Funktion der Connexine jedoch gerade in dieser exakten Koordination der Differenzierungsschritte liegen. Daher ist die Differenzierung der doppelt Cx43/45-defizienten ES-Zellen in unterschiedliche Zelltypen notwendig, um die Bedeutung der Connexine vollständig zu erfassen.

Interessanterweise zeigen weder Cx31, Cx43 oder Cx45 Defektmäuse Komplikationen während der frühen Embryogenese (Reaume et al., 1995; Krüger et al., 2000; Kumai et al., 2000; Plum et al., 2001). Auch bei Cx31/Cx43-doppeltdefizienten Mäusen lassen sich keine Beeinträchtigungen beobachten (Kibschull et al., 2005). Von Bedeutung wäre weiterhin die Analyse der frühen Embryonalentwicklung von Cx43/Cx45-doppeltdefizienten Mäusen.

## **5.5 Funktion der Connexine während der ES-Zelldifferenzierung**

### **5.5.1 Spontane Differenzierung von Cx43/Cx45-doppeltdefizienten ES-Zellen in Embryonalkörperchen**

Neben den Untersuchungen zur Funktion von Connexinen in embryonalen Stammzellen sollten ebenfalls Experimente durchgeführt werden um die Rolle dieser Proteine während der ES-Zelldifferenzierung zu bestimmen.

Die Entwicklungsschritte während der spontanen Differenzierung von ES-Zellen in Embryonalkörperchen ähneln in Teilen den Vorgängen während der Entwicklung des Embryos von der Blastozyste bis zur Gastrulation. Aus diesem Grund sind Embryonalkörperchen auch als Modellsystem für die frühe Embryonalentwicklung beschrieben (Coucouvanis und Martin, 1999). So bildet sich aus den äußeren Zellen des Embryonalkörperchens zunächst eine Schicht viszeralen Endoderms. Diese Zellen synthetisieren in der Folge eine extrazelluläre Matrix (Reichert's Membran) und sezernieren anschließend Signalproteine wie BMP2 und BMP4. Diese führen dazu, dass die Zellen im Inneren des Embryonalkörperchens absterben und sich eine Höhlung ausbildet, welche der Amnionhöhle im frühen Embryo entspricht. Die Zellen mit direktem Kontakt zur extrazellulären Matrix überleben und bilden ein Epithel, welches das Innere der zentralen Höhlung auskleidet. Aus diesem Epithelverband, dem primitiven Ektoderm, gehen in der Folge die drei Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm hervor (Coucouvanis und Martin, 1999).

In einer 1989 veröffentlichten Studie beschreiben Sheardown und Hooper die Erzeugung einer kopplungsdefizienten ES-Zelllinie. Die Zellen wurden mittels genereller Mutagenese und anschließender „Kiss of Death“-Selektion gewonnen und zeigten keine morphologischen Auffälligkeiten. Anschließend wurden diese Zellen in Embryonalkörperchen differenziert. Dabei bildeten sich zwar Zellaggregate, diese zeigten aber auch nach langer Zeit in Suspensionskultur keine Anzeichen weiterer Differenzierung, wie z.B. die Ausbildung einer inneren Höhlung, epitheliale oder mesenchymale Strukturen bzw. spontan kontrahierende Kardiomyozyten. Die Autoren folgerten, dass der Verlust der Gap Junction-vermittelten Kommunikation zu einem Defekt der Entwicklung des viszeralen Endoderms führt, das wiederum die weiteren Differenzierungsvorgänge steuert.

Um die These von Sheardown und Hooper zu überprüfen und darüber hinaus den Einfluss von Cx43 und Cx45 auf die Differenzierung von ES-Zellen zu untersuchen, wurden während der vorliegenden Arbeit zunächst Embryonalkörperchen aus den Cx43/Cx45-defizienten ES-Zellen mittels der „hängende Tropfen“-Methode erzeugt. Dabei zeigte sich

jedoch, trotz 96% Kopplungsreduktion, nicht der von Sheardown und Hooper beschriebene Effekt. Aus den Cx43/Cx45del Zellen bildeten sich in den hängenden Tropfen Zellaggregate, die sich in Größe und Struktur nicht von den aus Kontrollzellen hergestellten Embryonalkörperchen unterschieden. Daraufhin wurden Gefrierschnitte angefertigt. In Präparaten von fünf Tagen kultivierten Embryonalkörperchen konnten mittels eines TUNEL-Tests apoptotische Zellen im Inneren der Zellaggregate nachgewiesen werden. Diese waren in Präparaten von drei Tage alten Embryonalkörperchen noch nicht zu beobachten. Ferner konnte bei Immunfluoreszenzanalysen mit Hilfe spezifischer Laminin1-Antikörper eine extrazelluläre Matrix unterhalb der äußersten Schicht des Embryonalkörperchens sichtbar gemacht werden. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um die Reicherts Membran. Diese extrazelluläre Matrix wird vom viszeralem Endoderm sezerniert, weshalb sie als Nachweis für die Bildung endodermaler Zellen angesehen werden kann (Martin und Evans, 1975). Bei weiterer Kultur der Zellaggregate in Suspension ließen sich ab Tag 10 zystische Embryonalkörperchen mit ballonartig aufgeblähten Strukturen beobachten. Diese gehen aus dem primitiven Endoderm hervor und ähneln dem Dottersack, welcher *in vivo* den Embryo umgibt (Abe et al., 1996). An gefärbten Paraffinschnitten von 22 Tage alten Embryonalkörperchen lassen sich sowohl epitheliale, mesenchymale als auch endotheliale Strukturen erkennen. Dies deutet auf ein gewisses Differenzierungspotential der Cx43/Cx45 doppeldefizienten Zellen in Embryonalkörperchen hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cx43/Cx45-defiziente ES-Zellen zu Embryonalkörperchen aggregieren und viszerales Endoderm, eine Reicherts Membran sowie eine zentrale Höhlung ausbilden. Außerdem entstehen nach längerer Zeit in Kultur zystische Embryonalkörperchen mit Dottersack-artigen Strukturen. Möglicherweise kompensiert das weiterhin exprimierte Cx31 für den Verlust der anderen beiden Connexine.

### **5.5.2 Untersuchungen zur Rolle von Cx43 und Cx45 bei der Kardiomyozyten-differenzierung**

Im Zuge der Differenzierung Cx43/Cx45-doppeldefizienter ES-Zellen in Embryonalkörperchen fiel auf, dass im Gegensatz zu den Kontrollzellen, keine spontan kontrahierenden Bereiche zu beobachten waren. Um dies zu belegen und statistisch zu quantifizieren, wurden Embryonalkörperchen aus Cx43/Cx45-defizienten ES-Zellen und Kontrollzellen mittels der „hängende Tropfen“ Methode hergestellt. Dabei wurde eine definierte Zellzahl von 1500 Zellen pro Tropfen eingesetzt. Nach zwei Tagen im

hängenden Tropfen und zusätzlichen sechs Tagen in Suspensionskultur erfolgte das Überführen der Embryonalkörperchen in einzelne Vertiefungen einer 24-Lochschale. In den darauf folgenden sieben Tagen wurden die einzelnen Embryonalkörperchen täglich unter dem Mikroskop kontrolliert und Vertiefungen, welche spontan kontrahierende Kardiomyozyten enthielten, wurden entsprechend markiert. Dabei zeigte sich, dass nach sieben Tagen 25% der aus Kontrollzellen entstandenen Embryonalkörperchen spontan kontrahierende Bereiche aufwiesen. Im Fall der Cx43/Cx45del Zellen waren es lediglich 5%.

Dies könnte bedeuten, dass der Verlust der Connexine Cx43 und Cx45 einen negativen Einfluss auf die Kardiomyozytendifferenzierung hat. Weiterführende Experimente müssen nun zuerst die Frage klären, ob weniger Herzmuskelzellen gebildet werden oder ob Kardiomyozyten in gleicher Anzahl wie bei den Kontrollen vorhanden sind, aber keine spontanen Kontraktionen zeigen. Hierzu könnte die Expressionsstärke der kardialen Transkriptionsfaktoren GATA-4 und Nkx2-5 in Embryonalkörperchen quantifiziert und zwischen den Zelllinien verglichen werden. Ebenfalls bieten sich  $\alpha$ -Aktinin und Cx40 als Marker an (Oyamada et al., 1996 ; David et al., 2008). Sollte sich zeigen, dass keine Kardiomyozyten gebildet werden, gilt es zu bestimmen, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung die Störung eintritt.

Zusätzlich sollte ein Kontrollexperiment durchgeführt werden. Zwischen der Transduktion der ES-Zellen mittels der Cre-Rekombinase und den durchgeführten Experimenten lagen mindestens zehn Passagen. In dieser Zeit wurden Cx43/Cx45-defiziente Klone isoliert, expandiert und charakterisiert. Obwohl die Kontrollzellen unter den gleichen Bedingungen parallel kultiviert wurden, besteht die Möglichkeit, dass die Cx43/Cx45del Zellen *in vitro* einen Teil ihres Entwicklungspotentials eingebüßt haben. Dies könnte sich auf die Kardiomyozytendifferenzierung auswirken. Da der Differenzierungsdefekt an zwei unterschiedlichen Cx43/Cx45-defizienten Klonen gezeigt werden konnte, ist dies jedoch unwahrscheinlich. Mittels eines Rettungsexperimentes könnte der Einfluss der Connexine jedoch bewiesen werden. Dabei würde Cx43 mit einem lentiviralen Vektor in die Cx43/Cx45del Zellen transduziert. Da Cx45-defiziente ES-Zellen keine Störung der Herzmuskelzellenentwicklung zeigen (Egashira et al., 2004), sollten die Cx43/Cx45del Zellen somit ihre Fähigkeit, in Kardiomyozyten zu differenzieren, zurückerlangen. Eine in diesem Zusammenhang interessante Beobachtung ist, dass humane ES-Zellen, in denen Cx43 mittels Transduktion lentiviraler Konstrukte überexprimiert wurde, ebenfalls einen Defekt in der Kardiomyozytenentwicklung aufweisen (Moore et al., 2008). Falls eine erfolgreiche Transduktion den beobachteten Phänotyp nicht rückgängig macht, könnte

dies auch an der konstitutiven Expression des Cx43 durch den viralen Promotor liegen. Abschließend lässt sich sagen, dass nach Deletion von Cx43 und Cx45 ein negativer Einfluss auf die Ausprägung spontan kontrahierender Bereiche in Embryonalkörperchen zu beobachten war. Bereits publizierte Studien lassen eine wichtige Funktion der beiden Connexine während der Herzmuskelzellendifferenzierung plausibel erscheinen. So sterben Cx43 wie auch Cx45 defiziente Mäuse pränatal an einem Herzdefekt. Im Falle von Cx43 wird der Tod durch morphologische Defekte des Ausflusstraktes ausgelöst (Reaume et al., 1991), während bei Cx45 Entwicklungsstörungen sowohl des Herzens als auch der Blutgefäße zum Tod der Tiere führen (Krüger et al., 2000; Nishii et al., 2001). *In vitro* werden Cx43 und Cx45 in ES-Zellen, in Embryonalkörperchen sowie in kontrahierenden Kardiomyozyten exprimiert (Oyamada et al., 2002). Cx43/Cx45-doppeltdefiziente Tiere wurden bisher nicht erzeugt.

Betrachtet man die Kardiomyozytendifferenzierung von Cx43- und Cx45-defizienten ES-Zellen, zeigen sich interessanterweise keine Auffälligkeiten im Vergleich zu den verwendeten Kontrollzellen (Reaume et al., 1991, Banach et al., 2003; Egashira et al., 2004). Die Tatsache, dass die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Deletion beider Connexine zu einer gestörten Entwicklung von Herzmuskelzellen führt, deutet deshalb auf eine redundante Funktion beider Connexine während des Differenzierungsprozesses hin. Bei Verlust des einen Connexins wird dessen Funktion vom anderen kompensiert.

Zu der Frage, welche molekulare Funktion Cx43 und Cx45 während der Differenzierung embryonaler Stammzellen in Kardiomyozyten spielen könnten, lassen sich bisher nur Spekulationen anstellen. Denkbar ist, dass kleine Botenstoffe zwischen den Zellen ausgetauscht werden, welche direkten Einfluss auf die Genexpression benachbarter Zellen nehmen. Dies könnte für die koordinierte Differenzierung einer Zellpopulation wichtig sein. Mögliche Kandidaten dafür sind beispielsweise Kalziumionen und  $IP_3$ . Es ist bekannt, dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration über die Steuerung kalziumabhängiger Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Genexpression einer Zelle hat. In diesem Zusammenhang beschreiben Muller-Borer et al. (2007) die Transdifferenzierung von Leberstammzellen in Kardiomyozyten. Diese geschieht spontan, wenn die Leberstammzellen in Kokultur mit embryonalen Kardiomyozyten gehalten werden. Dabei beobachteten die Autoren Kalziumoszillationen in den Kardiomyozyten. Diese übertrugen sich auf die kokultivierten Leberstammzellen. Ferner beschreiben die Autoren, dass Cx43 in Leberstammzellen exprimiert wird und eine funktionelle Gap Junction-vermittelte Kopplung zwischen Kardiomyozyten und Leberstammzellen ermöglicht. Wurde diese interzelluläre Kommunikation mittels pharmakologischer Gap Junction-Inhibitoren bzw.

siRNAs gegen Cx43 unterbrochen, übertrugen sich die Oszillationen nicht mehr auf die Leberstammzellen und eine Transdifferenzierung fand nicht statt. Auch der morphologische Defekt an Herzen Cx45 defizienter Mäuse geht möglicherweise auf eine Störung der intrazellulären Kalziumkonzentration zurück, was wiederum über eine reduzierte Aktivierung des kalziumabhängigen Transkriptionsfaktors NF-ATc1 zu einer Veränderung der Genexpression führt (Kumai et al., 2000).

### **5.5.3 Untersuchungen zur Rolle von Cx43 und Cx45 bei der neuralen Differenzierung**

Neben der Kardiomyozytendifferenzierung wurde ebenfalls die Differenzierung Cx43/Cx45-defizienter ES-Zellen in Neuronen und Astrozyten untersucht. Dieses Differenzierungssystem war in so fern interessant, da beide Connexine in ES-Zellen sowie in neuralen Vorläuferzellen ausgeprägt werden. Im weiteren Verlauf der Differenzierung beschränkt sich die Expression von Cx45 auf neuronale Zelltypen, während Cx43 hauptsächlich in Astrozyten ausgeprägt ist (Rozenal et al., 2000; Cai et al., 2004). Die Experimente ergaben jedoch keinen augenscheinlichen Unterschied im neuralen Differenzierungspotential zwischen Cx43/Cx45flox und Cx43/Cx45del ES-Zellen. Beide Zelllinien aggregierten in Gegenwart von 0,1  $\mu$  M all-trans-Retinsäure zu Embryonalkörperchen, die nach sechs Tagen in Suspensionskultur vergleichbare Mengen an neuralen Vorläuferzellen enthielten. Dies konnte mittels einer Immunfluoreszenzanalyse mit Antikörpern gegen Nestin nachgewiesen werden. Nach vier bis sechs Tagen in adhärenter Kultur zeigten sich bei beiden Genotypen Astrozyten wie auch Neuronen. Diese konnten mit Hilfe von Antikörpern gegen die Markerproteine GFAP und  $\beta$ -III-Tubulin identifiziert werden. Obwohl keine augenscheinlichen Unterschiede im Differenzierungsverhalten der beiden Zelllinien erkennbar waren, sollte die genaue Expressionsstärke der einzelnen neuralen Markerproteine in weiterführenden Experimenten mittels Immunoblot bestimmt und verglichen werden. Solche Experimente wurden bereits im Zuge dieser Arbeit begonnen. Die Menge an entstandenen Neuronen und Astrozyten variierte jedoch stark von Experiment zu Experiment, weshalb sehr viele Analysen notwendig sein werden, um eine verlässliche Aussage treffen zu können.

Im Gegensatz zum generellen Differenzierungspotential, waren bezüglich des Verhaltens der Zellen in Kultur augenscheinliche Unterschiede zwischen den Genotypen zu beobachten. So waren die Cx43/Cx45flox Neurone und Astrozyten in weiten Teilen der bewachsenen Fläche der Kulturschale zu finden, während die Cx43/Cx45del Zellen in dicht gepackten Arealen wuchsen. Dies könnte auf eine verminderte Migrationsfähigkeit

der Connexin-defizienten Zellen hindeuten. Ein solcher Effekt ist nach Deletion von Cx43 sowohl für Neuronen als auch für Astrozyten beschrieben (Fushiki et al., 2003; Elias et al., 2007; Wienken-Barger et al., 2007; Marins et al., 2009). Somit ist ein solcher Befund kein unerwarteter Phänotyp. Dennoch wäre es interessant das Migrationsverhalten der Zellen mit adäquaten Testverfahren zu bestätigen und statistisch zu quantifizieren.

## 6. Ausblick

### Connexine in ES-Zellen

Der Einfluss von Connexinen und Gap Junction-vermittelter Kommunikation auf Tod und Überleben von Zellen wird schon seit einigen Jahren in der Literatur diskutiert. In zahlreichen Studien konnte dabei in Abhängigkeit vom Zelltyp bzw. dem zellulären Kontext sowohl ein pro- wie auch ein anti-apoptotischer Effekt von Gap Junctions gezeigt werden (zusammengefasst von Krysko et al., 2005). Während dieser Arbeit wurde mittels verschiedener genetischer Methoden die Gap Junction-vermittelte Kommunikation moduliert. Jedoch führte selbst eine starke Reduktion der Zell-Zell-Kopplung von bis zu 96% zu keinerlei Anstieg der Apoptoseraten. Möglicherweise ist ein solcher Effekt unter optimalen Kulturbedingungen auch gar nicht zu erwarten. Zahlreiche Studien zeigen jedoch einen anti-apoptotischen Effekt von Connexinen unter Stressbedingungen wie beispielsweise bei erhöhtem oxidativem Stress (Lin et al., 2003; Giardina et al., 2007). Solche Bedingungen können herbeigeführt werden, indem man dem Kulturmedium Menadion oder Wasserstoffperoxid zusetzt, bzw. die Zellen in Kulturmedium ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol kultiviert werden. Es wäre interessant zu vergleichen, ob Cx43/Cx45flox und Cx43/Cx45del ES-Zellen unter diesen suboptimalen Kulturbedingungen unterschiedlich gut wachsen bzw. überleben können.

Des Weiteren wurden in den Cx43/Cx45del ES-Zellen zwar Cx43 und Cx45 deletiert und die Zell-Zell-Kopplung auf 4% reduziert, das dritte in ES-Zellen exprimierte Connexin Cx31 wird jedoch weiterhin ausgeprägt. Mittels siRNAs wäre es möglich die Expression dieses Connexins zu reduzieren und die Gap Junction-vermittelte Kommunikation in ES-Zellen nahezu komplett zu unterbinden.

### Connexine während der neuralen Differenzierung

Generell war die Differenzierung von Cx43/Cx45flox wie auch Cx43/Cx45del ES-Zellen in Neurone wie Astrozyten möglich. Auffällig war jedoch, dass Cx43/Cx45flox Neurone bzw. Astrozyten nach 8 Tagen in adhärenter Kultur über die komplette bewachsene Fläche der Kulturschale verteilt vorlagen, während die Connexin-defizienten neuronalen Zellen dicht gepackt in definierten Arealen lokalisiert waren. Dies lässt ein gestörtes Migrationsverhalten der Cx43/Cx45del Zellen vermuten. Ein solcher Phänotyp ist bereits in mehreren Publikationen für Cx43 defiziente Astrozyten und Neurone *in vivo* beschrieben

(Fushiki et al., 2003; Elias et al., 2007; Wienken-Barger et al., 2007; Marins et al., 2009). Um den möglichen Migrationsdefekt *in vitro* zu quantifizieren könnte beispielsweise das „oris cell migration“ Testverfahren der Firma AMS Biotechnologie verwendet werden. Dabei wird ein kreisrunder Bereich im Zentrum jeder Vertiefung einer 24-Lochschaale mittels eines Stempels ausgespart. Nun werden die Zellen auf die Kulturschale ausgesät. Sobald die Zellen am Boden der Schale angewachsen sind wird der Stempel entfernt. In den nächsten Tagen können die Zellen in den zuvor ausgesparten Bereich einwandern. Nach einem definierten Zeitraum wird die 24-Lochschaale fotografiert und der Durchmesser der noch unbewachsenen Fläche bestimmt. Je mehr Zellmigration stattfindet, desto kleiner wird der Durchmesser der Fläche auf der keine Zellen zu finden sind. Um dieses Testverfahren durchführen zu können, müssten aus den Nestin positiven Embryonalkörperchen zunächst mittels Trypsinbehandlung eine Einzelzellsuspension erzeugt werden werden.

### Connexine während der Kardiomyozytendifferenzierung

Die im Zusammenhang mit dieser Dissertation durchgeführten Experimente lassen darauf schließen, dass der Verlust der Connexine Cx43 und Cx45 einen negativen Einfluss auf die Kardiomyozytendifferenzierung hat. Weiterführende Experimente müssen nun zuerst die Frage klären, ob keine Herzmuskelzellen gebildet werden oder ob Kardiomyozyten vorhanden sind, aber keine spontanen Kontraktionen zeigen. Hierzu könnte die Expressionsstärke der kardialen Transkriptionsfaktoren GATA-4 und Nkx2-5 in Embryonalkörperchen quantifiziert und zwischen den Zelllinien verglichen werden. Ebenfalls bieten sich  $\alpha$ -Aktinin und Cx40 als kardiale Marker an (Oyamada et al., 1996 ; David et al., 2008). Die Expressionsstärke der Markerproteine könnte mittels Immunoblotanalysen bzw. quantitativer PCR-Analyse verglichen werden. Die während der spontanen Differenzierung von ES-Zellen entstehenden Kardiomyozyten machen lediglich einen kleinen Prozentsatz der Zellen im Embryonalkörperchen aus. Daher ist es fraglich, ob die Proteinmenge ausreichend ist um eine Immunoblotanalyse durchführen zu können. Daher erscheint die quantitative PCR als bessere Alternative, auch wenn mit dieser Methode die tatsächliche Proteinmenge nicht zu ermitteln ist. Sollte sich zeigen, dass keine Kardiomyozyten gebildet werden, gilt es zu bestimmen, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung die Störung eintritt.

Zusätzlich sollte ein Kontrollexperiment durchgeführt werden, da zwischen der Transduktion der ES-Zellen mittels der Cre-Rekombinase und den durchgeführten

Experimenten mindestens zehn Passagen lagen. In dieser Zeit wurden die Cx43/Cx45-defizienten Klone isoliert, expandiert und charakterisiert. Obwohl die Kontrollzellen unter den gleichen Bedingungen parallel kultiviert wurden, besteht die Möglichkeit, dass die Cx43/Cx45del Zellen *in vitro* einen Teil ihres Entwicklungspotentials eingebüßt haben. Dies könnte sich auf die Kardiomyozytendifferenzierung auswirken. Im Zuge eines Rettungsexperiments könnte Cx43 mit einem lentiviralen Vektor in die Cx43/Cx45del Zellen transduziert werden. Da Cx45-defiziente ES-Zellen keine Störung der Herzmuskelzellenentwicklung zeigen (Egashira et al., 2004), sollten die Cx43/Cx45del Zellen somit ihre Fähigkeit, in Kardiomyozyten zu differenzieren, zurückerlangen.

Falls das Rettungsexperiment glückt, wäre es darüberhinaus denkbar weitere Connexinisoformen in die Zellen einzubringen um zu ermitteln, ob auch andere Connexine die Fähigkeit zur Herzmuskelzellendifferenzierung wiederherstellen können.

### 7. Zusammenfassung

In HM1 ES-Zellen werden sieben Connexin-mRNAs ausgeprägt, von denen drei translatiert werden und als Protein nachweisbar sind. Es handelt sich hierbei um Cx31, Cx43 und Cx45 deren Expression bereits in der inneren Zellmasse von Blastozysten der Maus und der Ratte gezeigt wurde (Houghton et al., 2002). Im Gegensatz zu humanen ES-Zellen konnte Cx40 in mES-Zellen nicht nachgewiesen werden. Die Connexone sind in den Zellmembranen der embryonalen Stammzellen lokalisiert und zeigen in der Immunfluoreszenzanalyse ein punktförmiges Signalmuster, was auf eine Anordnung in Gap Junction-Plaques hindeutet. Ko-Immunopräzipitationsanalysen an aufgereinigten Connexonen belegen, dass heteromere Halbkanäle aus Cx31 und Cx43 sowie Cx43 und Cx45 ausgeprägt werden. Darüber hinaus sind auch homomere Connexone aus jeweils einer der drei Connexinisoformen möglich. Mikroinjektionsanalysen zeigen die Ausbreitung injizierter niedermolekularer Fluoreszenzfarbstoffe mit negativer und positiver Ladung sowie verschiedenen Molekulargewichten zwischen 287 und 443. Dies ist ein direkter Nachweis für Gap Junction-vermittelte Kommunikation zwischen embryonalen Stammzellen. Eine Ausbreitung via Plasmabrücken lässt sich durch Injektionen des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin Dextran (10 kDa) ausschließen.

Werden HM1 Zellen mit den pharmakologischen Gap-Junction Inhibitoren 18-AGA bzw. Carbenoxolon behandelt, löst dies in den ES-Zellen einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate aus. Dies führte zu der Hypothese, dass Gap Junction-vermittelte Zell-Zell-Kopplung ES-Zellen vor Apoptose schützt. Um die These zu verifizieren wurde Cx43 in ES-Zellen deletiert und zusätzlich wurden Cx31 und Cx45 mittels siRNA um durchschnittlich 87% bzw. 75% reduziert. Dies führte zu einer vergleichbaren Reduktion der Zell-Zell-Kopplung wie sie bereits zuvor mittels der pharmakologischen Inhibitoren erreicht wurde. Es konnte dabei jedoch keinerlei Anstieg der Apoptoserate beobachtet werden. Um die Diskrepanz zwischen Pharmakologie und Genetik zu erklären, wurden genauere Untersuchungen der Wirkweise von 18-AGA durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der pharmakologische Inhibitor keinerlei Einfluss auf die Zell-Zell-Kopplung in Cx43 defizienten ES-Zellen hatte, jedoch in gleichem Maße Apoptose auslöste wie bereits bei HM1 Zellen beobachtet. Daraus darf gefolgert werden, dass 18- $\alpha$ -Glycyrrhetinsäure Connexin43 effizient blockiert, während die Kopplung, die von den Connexinen Cx31 und Cx45 vermittelt wird nicht beeinflusst ist. Darüber hinaus wird die von 18-AGA induzierte Apoptose unabhängig von der Blockade der Gap Junction-vermittelten Kommunikation

ausgelöst und geht somit auf einen bisher unbekanntem Nebeneffekt des Inhibitors zurück. Weiterhin wurden Cx43/Cx45 doppelt defiziente ES-Zellen erzeugt. Diese zeigten, trotz Reduktion der Zell-Zell-Kopplung auf 4%, bezüglich Zellmorphologie, Proliferation und Apoptose keinerlei Unterschiede zu den verwendeten Kontrollzellen. Auch die Expressionsstärke des Stammzellmarkers Oct4 war nicht verändert. Wurden die Zellen differenziert, ergaben sich jedoch Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Kardiomyozytenentwicklung. Im Verlauf der neuralen Differenzierung zeigten Cx43/Cx45del ES-Zellen keinerlei Auffälligkeiten. Immunfluoreszenzanalysen deuten jedoch möglicherweise auf eine Migrationsstörung der Cx43/Cx45 defizienten neuralen Vorläuferzellen bzw. der Neurone und Astrozyten hin.

## 8. Referenzen

1. Abe K, Niwa H, Iwase K, u. a. Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. *Exp. Cell Res.* 1996;229(1):27-34.
2. Abremski K, Wierzbicki A, Frommer B, Hoess RH. Bacteriophage P1 Cre-loxP site-specific recombination. Site-specific DNA topoisomerase activity of the Cre recombination protein. *J. Biol. Chem.* 1986;261(1):391-396.
3. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998;281(5381):1322-1326.
4. Ahmad S, Evans WH. Post-translational integration and oligomerization of connexin 26 in plasma membranes and evidence of formation of membrane pores: implications for the assembly of gap junctions. *Biochem. J.* 2002;365(Pt 3):693-699.
5. Anderson C, Catoe H, Werner R. MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(20):5863-5871.
6. Anderson PAW, Muller-Borer BJ, Esch GL, u. a. Calcium signals induce liver stem cells to acquire a cardiac phenotype. *Cell Cycle.* 2007;6(13):1565-1569.
7. Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* 2000;256(1):50-57.
8. Assou S, Lecarrou T, Tondeur S, u. a. A meta-analysis of human embryonic stem cells transcriptome integrated into a web-based expression atlas. *Stem Cells.* . 2007;25(4):961–973.
9. Banach K, Halbach MD, Hu P, Hescheler J, Egert U. Development of electrical activity in cardiac myocyte aggregates derived from mouse embryonic stem cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003;284(6):H2114-2123.
10. Bannerman P, Nichols W, Puhalla S, u. a. Early migratory rat neural crest cells express functional gap junctions: evidence that neural crest cell survival requires gap junction function. *J. Neurosci. Res.* 2000;61(6):605-615.
11. Bao L, Locovei S, Dahl G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett.* 2004;572(1-3):65-68.
12. Baranova A, Ivanov D, Petrash N, u. a. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics.* 2004;83(4):706-716.
13. Becker DL, Davies CS. Role of gap junctions in the development of the preimplantation mouse embryo. *Microsc. Res. Tech.* 1995;31(5):364-374.
14. Bennett MVL, Zukin RS. Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron.* 2004;41(4):495-511.
15. Berthoud VM, Minogue PJ, Laing JG, Beyer EC. Pathways for degradation of connexins and gap junctions. *Cardiovasc. Res.* 2004;62(2):256-267.
16. Bevans CG, Kordel M, Rhee SK, Harris AL. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J. Biol. Chem.* 1998;273(5):2808-2816.
17. Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J. Cell Biol.* 1987;105(6 Pt 1):2621-2629.
18. Bloor DJ, Wilson Y, Kibschull M, u. a. Expression of connexins in human

- preimplantation embryos in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2004;2:25.
19. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, u. a. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell.* 2005;122(6):947-956.
20. Braude P, Pickering S, Flinter F, Ogilvie CM. Preimplantation genetic diagnosis. *Nat. Rev. Genet.* 2002;3(12):941-953.
21. Brons IGM, Smithers LE, Trotter MWB, u. a. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature.* 2007;448(7150):191-195.
22. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 1996;238(1):1-27.
23. Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100(23):13644-13649.
24. Buchholz F, Refaeli Y, Trumpp A, Bishop JM. Inducible chromosomal translocation of AML1 and ETO genes through Cre/loxP-mediated recombination in the mouse. *EMBO Rep.* 2000;1(2):133-139.
25. Cai J, Cheng A, Luo Y, u. a. Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells. *J. Neurochem.* 2004;88(1):212-226.
26. Campbell GR, Pasquier E, Watkins J, u. a. The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2004;279(46):48197-48204.
27. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009;136(4):642-655.
28. Caspar D, Goodenough D, Makowski L, Phillips W. Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction. *J. Cell Biol.* 1977;74(2):605-628.
29. Chen L, Daley GQ. Molecular basis of pluripotency. *Hum. Mol. Genet.* 2008;17(R1):R23-27.
30. Cheng A, Tang H, Cai J, u. a. Gap junctional communication is required to maintain mouse cortical neural progenitor cells in a proliferative state. *Dev. Biol.* 2004;272(1):203-216.
31. Classen-Houben D, Schuster D, Da Cunha T, u. a. Selective inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 by 18alpha-glycyrrhetic acid but not 18beta-glycyrrhetic acid. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2009;113(3-5):248-252.
32. Coucouvanis E, Martin GR. Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell.* 1995;83(2):279-287.
33. Coucouvanis E, Martin GR. BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development.* 1999;126(3):535-546.
34. Cullen BR. The HIV-1 Tat protein: An RNA sequence-specific processivity factor? *Cell.* 1990;63(4):655-657.
35. Dahl E, Winterhager E, Reuss B, u. a. Expression of the gap junction proteins connexin31 and connexin43 correlates with communication compartments in extraembryonic tissues and in the gastrulating mouse embryo, respectively. *J. Cell. Sci.* 1996;109 ( Pt 1):191-197.
36. Dahl G, Locovei S. Pannexin: to gap or not to gap, is that a question? *IUBMB Life.* 2006;58(7):409-419.

37. David R, Theiss H, Franz W. Connexin 40 promoter-based enrichment of embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Cells Tissues Organs (Print)*. 2008;188(1-2):62-69.
38. Davidson JS, Baumgarten IM, Harley EH. Reversible inhibition of intercellular junctional communication by glycyrrhetic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986;134(1):29-36.
39. Davidson JS, Baumgarten IM. Glycyrrhetic acid derivatives: a novel class of inhibitors of gap-junctional intercellular communication. Structure-activity relationships. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988;246(3):1104-1107.
40. Davies TC, Barr KJ, Jones DH, Zhu D, Kidder GM. Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse. *Dev. Genet.* 1996;18(3):234-243.
41. Desplantez T, Dupont E, Severs NJ, Weingart R. Gap junction channels and cardiac impulse propagation. *J. Membr. Biol.* 2007;218(1-3):13-28.
42. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol.* 1985;87:27-45.
43. Duffy HS, Delmar M, Spray DC. Formation of the gap junction nexus: binding partners for connexins. *J. Physiol. Paris.* 2002;96(3-4):243-249.
44. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 1999;68:383-424.
45. Eberstadt M, Huang B, Chen Z, u. a. NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature.* 1998;392(6679):941-945.
46. Eckardt D, Theis M, Degen J, u. a. Functional role of connexin43 gap junction channels in adult mouse heart assessed by inducible gene deletion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004;36(1):101-110.
47. Efthymiadis A, Briggs LJ, Jans DA. The HIV-1 Tat nuclear localization sequence confers novel nuclear import properties. *J. Biol. Chem.* 1998;273(3):1623-1628.
48. Egashira K, Nishii K, Nakamura K, u. a. Conduction abnormality in gap junction protein connexin45-deficient embryonic stem cell-derived cardiac myocytes. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004;280(2):973-979.
49. Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Fraté H, u. a. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* 1995;129(3):805-817.
50. Elias LAB, Wang DD, Kriegstein AR. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature.* 2007;448(7156):901-907.
51. Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem. J.* 2006;397(1):1-14.
52. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292(5819):154-156.
53. Fleishman SJ, Unger VM, Yeager M, Ben-Tal N. A Calpha model for the transmembrane alpha helices of gap junction intercellular channels. *Mol. Cell.* 2004;15(6):879-888.
54. Foote CI, Zhou L, Zhu X, Nicholson BJ. 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.* 1998;140(5):1187-1197.
55. Fujiwara H, Hayashi Y, Sanzen N, u. a. Regulation of mesodermal differentiation of mouse embryonic stem cells by basement membranes. *J. Biol. Chem.* 2007;282(40):29701-29711.
56. Fushiki S, Perez Velazquez JL, Zhang L, u. a. Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003;62(3):304-314.
57. Giardina SF, Mikami M, Goubaeva F, Yang J. Connexin 43 confers resistance to hydrogen peroxide-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;362(3):747-752.
58. Ginis I, Luo Y, Miura T, u. a. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 2004;269(2):360-380.
59. Goldberg GS, Moreno AP, Bechberger JF, u. a. Evidence that disruption of connexon particle arrangements in gap junction plaques is associated with inhibition of gap junctional communication by a glycyrrhetic acid derivative. *Exp. Cell Res.* 1996;222(1):48-53.
60. Goldberg GS, Lampe PD, Nicholson BJ. Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nat. Cell Biol.* 1999;1(7):457-459.
61. Goldberg GS, Valiunas V, Brink PR. Selective permeability of gap junction channels. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004;1662(1-2):96-101.
62. Gossler A, Balling R. The molecular and genetic analysis of mouse development. *Eur. J. Biochem.* 1992;204(1):5-11.
63. Grindley NDF, Whiteson KL, Rice PA. Mechanisms of site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 2006;75:567-605.
64. Gros DB, Jongsma HJ. Connexins in mammalian heart function. *Bioessays.* 1996;18(9):719-730.
65. Gross A, Yin XM, Wang K, u. a. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* 1999;274(2):1156-1163.
66. Guan X, Wilson S, Schlender KK, Ruch RJ. Gap-junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18 beta-glycyrrhetic acid. *Mol. Carcinog.* 1996;16(3):157-164.
67. Gump JM, Dowdy SF. TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends Mol Med.* 2007;13(10):443-448.
68. Han YM, Yoo OJ, Lee KK. Sex determination in single mouse blastomeres by polymerase chain reaction. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1993;10(2):151-156.
69. Hanner F, von Maltzahn J, Maxeiner S, u. a. Connexin45 is expressed in the juxtaglomerular apparatus and is involved in the regulation of renin secretion and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295(2):R371-380.
70. Hardy K, Warner A, Winston RM, Becker DL. Expression of intercellular junctions during preimplantation development of the human embryo. *Mol. Hum. Reprod.* 1996;2(8):621-632.
71. He LQ, Cai F, Liu Y, u. a. Cx31 is assembled and trafficked to cell surface by ER-Golgi pathway and degraded by proteasomal or lysosomal pathways. *Cell Res.* 2005;15(6):455-

464.

72. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-776.
73. Hoess RH, Wierzbicki A, Abremski K. The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic Acids Res*. 1986;14(5):2287-2300.
74. Horigome H, Horigome A, Homma M, Hirano T, Oka K. Glycyrrhetic acid-induced apoptosis in thymocytes: impact of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition. *Am. J. Physiol*. 1999;277(4 Pt 1):E624-630.
75. Horigome H, Homma M, Hirano T, Oka K. Glycyrrhetic acid induced apoptosis in murine splenocytes. *Biol. Pharm. Bull*. 2001;24(1):54-58.
76. Houghton FD, Barr KJ, Walter G, u. a. Functional significance of gap junctional coupling in preimplantation development. *Biol. Reprod*. 2002;66(5):1403-1412.
77. Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*. 1996;384(6610):638-641.
78. Huang Y, Maruyama Y, Dvoryanchikov G, u. a. The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2007;104(15):6436-6441.
79. Huettner JE, Lu A, Qu Y, u. a. Gap junctions and connexon hemichannels in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(7):1654-1667.
80. Hutnik CML, Pocrnich CE, Liu H, Laird DW, Shao Q. The protective effect of functional connexin43 channels on a human epithelial cell line exposed to oxidative stress. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2008;49(2):800-806.
81. Kang J, Kang N, Lovatt D, u. a. Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J. Neurosci*. 2008;28(18):4702-4711.
82. Kapur N, Mignery GA, Banach K. Cell cycle-dependent calcium oscillations in mouse embryonic stem cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol*. 2007;292(4):C1510-1518.
83. Kardami E, Dang X, Iacobas DA, u. a. The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. *Prog. Biophys. Mol. Biol*. 2007;94(1-2):245-264.
84. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. 1972;26(4):239-257.
85. Kibschull M, Magin TM, Traub O, Winterhager E. Cx31 and Cx43 double-deficient mice reveal independent functions in murine placental and skin development. *Dev. Dyn*. 2005;233(3):853-863.
86. Krüger O, Plum A, Kim JS, u. a. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development*. 2000;127(19):4179-4193.
87. Krysko DV, Leybaert L, Vandenabeele P, D'Herde K. Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals. *Apoptosis*. 2005;10(3):459-469.
88. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell*. 1996;84(3):381-388.
89. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
90. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J*. 2006;394(Pt 3):527-543.
91. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial

- damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998;94(4):491-501.
92. Liang J, Wang S, Chung T, Yang S, Wu J. Effects of 18-glycyrrhetic acid on serine 368 phosphorylation of connexin43 in rat neonatal cardiomyocytes. *Cell Biol. Int.* 2008;32(11):1371-1379.
93. Lin JH, Yang J, Liu S, u. a. Connexin mediates gap junction-independent resistance to cellular injury. *J. Neurosci.* 2003;23(2):430-441.
94. Mackenzie AB, Young MT, Adinolfi E, Surprenant A. Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J. Biol. Chem.* 2005;280(40):33968-33976.
95. Marins M, Xavier ALR, Viana NB, u. a. Gap junctions are involved in cell migration in the early postnatal subventricular zone. *Dev Neurobiol.* 2009;69(11):715-730.
96. Marquart KH. So-called annular gap junctions in bone cells of normal mice. *Experientia.* 1977;33(2):270-272.
97. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981;78(12):7634-7638.
98. Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1975;72(4):1441-1445.
99. Martín-Coello J, González R, Crespo C, Gomendio M, Roldan E. Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). *Theriogenology.* 2008;70(6):1004-1013.
100. Maurer J, Nelson B, Ceceña G, u. a. Contrasting expression of keratins in mouse and human embryonic stem cells. *PLoS ONE.* 2008;3(10):e3451.
101. Maxeiner S, Dedek K, Janssen-Bienhold U, u. a. Deletion of connexin45 in mouse retinal neurons disrupts the rod/cone signaling pathway between All amacrine and ON cone bipolar cells and leads to impaired visual transmission. *J. Neurosci.* 2005;25(3):566-576.
102. Milks LC, Kumar NM, Houghten R, Unwin N, Gilula NB. Topology of the 32-kd liver gap junction protein determined by site-directed antibody localizations. *EMBO J.* 1988;7(10):2967-2975.
103. Moore JC, Tsang S, Rushing SN, u. a. Functional consequences of overexpressing the gap junction Cx43 in the cardiogenic potential of pluripotent human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;377(1):46-51.
104. Moreno AP, Lau AF. Gap junction channel gating modulated through protein phosphorylation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2007;94(1-2):107-119.
105. Morley GE, Ek-Vitorín JF, Taffet SM, Delmar M. Structure of connexin43 and its regulation by pHi. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 1997;8(8):939-951.
106. Muller-Borer BJ, Cascio WE, Esch GL, u. a. Acquired cell-to-cell coupling and "cardiac-like" calcium oscillations in adult stem cells in a cardiomyocyte microenvironment. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2006;1:576-579.
107. Muller-Borer BJ, Cascio WE, Esch GL, u. a. Mechanisms controlling the acquisition of a cardiac phenotype by liver stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(10):3877-3882.
108. Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, u. a. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat. Med.*

1998;4(12):1449-1452.

109. Negishi M, Irie A, Nagata N, Ichikawa A. Specific binding of glycyrrhetic acid to the rat liver membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991;1066(1):77-82.

110. Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, u. a. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature.* 2005;434(7029):83-88.

111. Neijssen J, Pang B, Neefjes J. Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2007;94(1-2):207-218.

112. Ngezahayo A, Altmann B, Steffens M, Kolb H. Gap junction coupling and apoptosis in GFSHR-17 granulosa cells. *J. Membr. Biol.* 2005;204(3):137-144.

113. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999;6(11):1028-1042.

114. Nishi M, Kumar NM, Gilula NB. Developmental regulation of gap junction gene expression during mouse embryonic development. *Dev. Biol.* 1991;146(1):117-130.

115. Nishii K, Kumai M, Shibata Y. Regulation of the epithelial-mesenchymal transformation through gap junction channels in heart development. *Trends Cardiovasc. Med.* 2001;11(6):213-218.

116. Niwa H. How is pluripotency determined and maintained? *Development.* 2007;134(4):635-646.

117. Nolden L, Edenhofer F, Haupt S, u. a. Site-specific recombination in human embryonic stem cells induced by cell-permeant Cre recombinase. *Nat Meth.* 2006;3(6):461-467.

118. Nunes-Düby SE, Kwon HJ, Tirumalai RS, Ellenberger T, Landy A. Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(2):391-406.

119. Oyamada Y, Komatsu K, Kimura H, Mori M, Oyamada M. Differential regulation of gap junction protein (connexin) genes during cardiomyocytic differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Exp. Cell Res.* 1996;229(2):318-326.

120. Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, u. a. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr. Biol.* 2000;10(13):R473-474.

121. Parekkadan B, Berdichevsky Y, Irimia D, u. a. Cell-cell interaction modulates neuroectodermal specification of embryonic stem cells. *Neurosci. Lett.* 2008;438(2):190-195.

122. Payton BW, Bennett MV, Pappas GD. Permeability and structure of junctional membranes at an electrotonic synapse. *Science.* 1969;166(913):1641-1643.

123. Peitz M, Pfannkuche K, Rajewsky K, Edenhofer F. Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99(7):4489-4494.

124. Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 2006;25(21):5071-5082.

125. Phelan A, Elliott G, O'Hare P. Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat. Biotechnol.* 1998;16(5):440-443.

126. Phelan P, Bacon JP, Davies JA, u. a. Innexins: a family of invertebrate gap-junction proteins. *Trends Genet.* 1998;14(9):348-349.

127. Phelan P, Starich TA. Innexins get into the gap. *Bioessays*. 2001;23(5):388-396.
128. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J. Biol. Chem.* 2002;277(10):8648-8657.
129. Plücker A. Conditional mutagenesis in mice: the Cre/loxP recombination system. *Int J Exp Pathol.* 1996;77(6):269-278.
130. Plum A, Winterhager E, Pesch J, u. a. Connexin31-deficiency in mice causes transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation. *Dev. Biol.* 2001;231(2):334-347.
131. Prochnow N, Dermietzel R. Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochem. Cell Biol.* 2008;130(1):71-77.
132. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell.* 1999;3(3):287-296.
133. Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, u. a. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*. 1995;267(5205):1831-1834.
134. Revel JP, Karnovsky MJ. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* 1967;33(3):C7-C12.
135. Rhee DY, Zhao X, Francis RJB, u. a. Connexin 43 regulates epicardial cell polarity and migration in coronary vascular development. *Development*. 2009;136(18):3185-3193.
136. Rohr S. Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential. *Cardiovasc. Res.* 2004;62(2):309-322.
137. Rozental R, Srinivas M, Gökhan S, u. a. Temporal expression of neuronal connexins during hippocampal ontogeny. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2000;32(1):57-71.
138. Sasaki T, Garant PR. Fate of annular gap junctions in the papillary cells of the enamel organ in the rat incisor. *Cell Tissue Res.* 1986;246(3):523-530.
139. Satomi Y, Nishino H, Shibata S. Glycyrrhetic acid and related compounds induce G1 arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2. *Anticancer Res.* 2005;25(6B):4043-4047.
140. Scemes E, Dermietzel R, Spray DC. Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice. *Glia*. 1998;24(1):65-73.
141. Severs NJ, Shovel KS, Slade AM, u. a. Fate of gap junctions in isolated adult mammalian cardiomyocytes. *Circ. Res.* 1989;65(1):22-42.
142. Sheardown SA, Hooper ML. A relationship between gap junction-mediated intercellular communication and the in vitro developmental capacity of murine embryonic stem cells. *Exp. Cell Res.* 1992;198(2):276-282.
143. Simon AM, Chen H, Jackson CL. Cx37 and Cx43 localize to zona pellucida in mouse ovarian follicles. *Cell Commun. Adhes.* 2006;13(1-2):61-77.
144. Smith AJ, De Sousa MA, Kwabi-Addo B, u. a. A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination. *Nat. Genet.* 1995;9(4):376-385.
145. Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* 2004;62(2):228-232.
146. Spray DC, White RL, de Carvalho AC, Harris AL, Bennett MV. Gating of gap junction

channels. *Biophys. J.* 1984;45(1):219-230.

147. Spray DC, Ye Z, Ransom BR. Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia.* 2006;54(7):758-773.

148. Stout C, Goodenough DA, Paul DL. Connexins: functions without junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004;16(5):507-512.

149. Suadicani SO, Brosnan CF, Scemes E. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *J. Neurosci.* 2006;26(5):1378-1385.

150. Suadicani SO, Iglesias R, Spray DC, Scemes E. Point mutation in the mouse P2X7 receptor affects intercellular calcium waves in astrocytes. *ASN Neuro.* 2009;1(1).

151. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, u. a. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature.* 2007;448(7150):196-199.

152. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998;281(5381):1312-1316.

153. Todorova MG, Soria B, Quesada I. Gap junctional intercellular communication is required to maintain embryonic stem cells in a non-differentiated and proliferative state. *J. Cell. Physiol.* 2008;214(2):354-362.

154. Trosko JE. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2003;36(1):43-48.

155. Trosko JE, Chang C, Upham BL, Tai M. Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004;1028:192-201.

156. Tsukimoto M, Maehata M, Harada H, u. a. P2X7 receptor-dependent cell death is modulated during murine T cell maturation and mediated by dual signaling pathways. *J. Immunol.* 2006;177(5):2842-2850.

157. Van Deursen J, Fornerod M, Van Rees B, Grosveld G. Cre-mediated site-specific translocation between nonhomologous mouse chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995;92(16):7376-7380.

158. Vance MM, Wiley LM. Gap junction intercellular communication mediates the competitive cell proliferation disadvantage of irradiated mouse preimplantation embryos in aggregation chimeras. *Radiat. Res.* 1999;152(5):544-551.

159. Vance MM, Wiley LM. Gap junction intercellular communication mediates the competitive cell proliferation disadvantage of irradiated mouse preimplantation embryos in aggregation chimeras. *Radiat. Res.* 1999;152(5):544-551.

160. VanSlyke JK, Musil LS. Cytosolic stress reduces degradation of connexin43 internalized from the cell surface and enhances gap junction formation and function. *Mol. Biol. Cell.* 2005;16(11):5247-5257.

161. Viebahn C. Epithelio-mesenchymal transformation during formation of the mesoderm in the mammalian embryo. *Acta Anat (Basel).* 1995;154(1):79-97.

162. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat. Rev. Genet.* 2006;7(3):185-199.

163. Wiencken-Barger AE, Djukic B, Casper KB, McCarthy KD. A role for Connexin43 during neurodevelopment. *Glia.* 2007;55(7):675-686.

164. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, u. a. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature.* 1988;336(6200):684-687.

165. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, u. a. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 1997;139(5):1281-1292.
166. Wolvetang EJ, Pera MF, Zuckerman KS. Gap junction mediated transport of shRNA between human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;363(3):610-615.
167. Wong RCB, Pébay A, Nguyen LTV, Koh KLL, Pera MF. Presence of functional gap junctions in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2004;22(6):883-889.
168. Wong RCB, Dottori M, Koh KLL, u. a. Gap junctions modulate apoptosis and colony growth of human embryonic stem cells maintained in a serum-free system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;344(1):181-188.
169. Wong RCB, Pera MF, Pébay A. Role of gap junctions in embryonic and somatic stem cells. *Stem Cell Rev.* 2008;4(4):283-292.
170. Wörsdörfer P, Maxeiner S, Markopoulos C, u. a. Connexin expression and functional analysis of gap junctional communication in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2008;26(2):431-439.
171. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 1980;68:251-306.
172. Xu R, Peck RM, Li DS, u. a. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat. Methods.* 2005;2(3):185-190.
173. Zheng-Fischhöfer Q, Schnichels M, Dere E, u. a. Characterization of connexin30.3-deficient mice suggests a possible role of connexin30.3 in olfaction. *Eur. J. Cell Biol.* 2007;86(11-12):683-700.

## 9. Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

A. bidest	zweifach destilliertes Wasser	mg	Milligramm
Abb.	Abbildung	min	Minute(n)
abs.	Absolut	ml	Milliliter
Amp	Ampizillin(-Resistenzgen)	mM	Millimolar
APS	Ammoniumpersulfat	mRNA	Boten-RNA
bp	Basenpaare	NAD+	Nikotinamid-adenindinukleotid
BCA	Bichinonsäure	Neurobiotin	N-[2-aminoethyl]-biotinamid
BSA	Rinderserum Albumin	nm	Nanometer
bspw.	beispielsweise	µm	Mikrometer
bzw.	beziehungsweise	nM	Nanomolar
°C	Grad Celcius	NLS	Kernlokalisationssequenz
cAMP	zyklisches Adenosin monophosphat	N-Terminus	aminotermiales Ende eines Peptids
cDNA	copy DNA	MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
C-Terminus	carboxyterminales Ende eines Peptids	MW	Molekulargewicht
Cx	Connexin	Panx	Pannexin
Da	Dalton	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
dATP	Desoxy-adenosintriphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
deion.	deionisiert	PKC	Proteinkinase C
del	deletiert	PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotrophin
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PTD	Proteintransduktionsdomäne
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium	Puro	Puromyzin(-Resistenzgen)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNase	Ribonuklease
DNase	Desoxyribonuklease	RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-5'- Triphosphat	RT	Raumtemperatur
DSP	Downstream Primer	RT(-PCR)	Reverse Transkription
DTT	Dithioereitol	SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>E. coli</i>	Escherichia coli	sec	Sekunde
EB	Embryoid body (Embryonalkörperchen)	siRNA	Short interfering RNA
ED	Embryonaltag	SSC	Trinatriumcitrat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Tab.	Tabelle
eGFP	enhanced green fluorescent protein	TAT	Transactivator of transcription
engl.	englisch	TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen	TE	Tris-EDTA Puffer
et al.	et altera	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
EtOH	Ethanol	TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
FCS	fötales Kälberserum	U	Enzymeinheit (Unit)
FSH	Follikel stimulierendes Hormon	Upm	Umdrehungen pro Minute
µg	Mikrogramm	USP	Upstream Primer
g	Gramm	UTR	untranslatierter Bereich
h	Stunde(n)	UV	ultraviolett
kb	Kilobasenpaare (1000 bp)	VP	Vaginalpfropf
kDa	Kilodalton (1000 Da)	v/v	Volumen pro Volumen
konz.	konzentriert	Vol.	Volumen
µl	Mikroliter	w/v	Gewicht pro Volumen
HIV	Human Immunodeficiency Virus	WT	Wildtyp
hCG	Humanes Chorion-Gonadotrophin	X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktosid
l	Liter	z. B.	zum Beispiel
LH	Luteinisierungshormon	18-AGA	18-alpha-Glycyrrhetinsäure
LIF	Leukemia inhibitory factor		
Lsg.	Lösung		
M	Molar		
mA	Milliampere		