

**Charakterisierung von Cx30 und Cx26
Punktmutationen in der Maus, die im Menschen
zu syndromischer und nicht-syndromischer
Taubheit führen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Melanie Schütz

aus Leverkusen

Bonn, Februar 2011

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Willecke

Zweitgutachter: Prof. Dr. Walter Witke

Tag der Promotion: 24.05.2011

Erscheinungsjahr: 2011

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, Februar 2011

Melanie Schütz

Erklärung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung1

1.1 Gap Junctions1

1.1.1 Struktur von Gap Junctions, Connexonen und Connexinen2

1.1.2 Funktion von Connexinen und Gap Junction Kanälen5

1.1.3 Regulation von Connexinen und Gap Junction Kanälen5

1.1.4 Expressionsmuster der Connexine Cx26, Cx30 und Cx327

1.2 Das Gehör9

1.2.1 Aufbau und Funktion des Ohres9

1.2.2 Connexinexpression und Funktion im Innenohr12

1.2.3 Connexin-defiziente Mauslinien und ihre Bedeutung für das Hören.....16

1.3 Die Epidermis.....17

1.3.1 Struktur der Epidermis17

1.3.2 Die epidermale Permeabilitätsbarriere19

1.3.3 Connexinexpression in der Epidermis und Funktion20

1.4 Mutationen in Connexingenen als Ursache humaner Erkrankungen21

1.4.1 Connexinmutationen, die im Menschen zu nicht-syndromischer und syndromischer Taubheit führen22

1.5 Transgene Mäuse und Reportergene26

1.5.1 Erzeugung genetisch veränderter Mäuse durch homologe Rekombination27

1.5.2 Das Cre-loxP/ Flp-frt System zur gezielten Gen-Deletion27

1.5.3	Reporterproteine	28
1.6	Zielsetzung.....	30
2	Material.....	31
2.1	Chemikalien	31
2.2	Stammlösungen, Puffer und Medien.....	31
2.2.1	Allgemeine Lösungen	31
2.2.2	Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	31
2.2.3	Lösungen für die Proteinanalytik.....	33
2.2.4	Lösungen und Medien für die Kultivierung von Bakterien	35
2.2.5	Lösungen und Medien zur Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen.....	37
2.2.6	Lösungen zur Decalzifizierung und Kryoprotektion der Cochlea	38
2.2.7	Lösungen für histologische Färbungen und zur Überprüfung der Funktion der epidermalen Barriere	38
2.3	Anästhetikum	39
2.4	Kommerzielle Lösungen und Reagenziensätze	39
2.4.1	Kommerzielle Lösungen	39
2.4.2	Kommerzielle Reagenziensätze	40
2.5	Geräte.....	40
2.6	Sonstige Materialien	42
2.7	Nukleinsäuren.....	42
2.7.1	Oligonukleotide.....	42
2.7.2	Southern Blot Hybridisierungssonden	45
2.7.3	Verwendete Plasmide	46

2.8	Bakterienstämme	47
2.9	Eukaryontische Zelllinie	47
2.10	Mausstämme und Mauslinien	47
2.11	Antikörper	48
2.11.1	Primäre Antikörper	48
2.11.2	Sekundäre Antikörper	49
2.11.3	Fluoreszenzfarbstoffe/-marker.....	49
2.12	Größenstandards	50
3	Methoden.....	51
3.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren	51
3.1.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	51
3.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	55
3.1.3	Enzymatische Modifikation von DNS	55
3.1.4	Transformation in <i>Escherichia coli</i>	56
3.1.5	DNS-Sequenzierung	58
3.1.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	58
3.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	67
3.1.8	Gelelution mit kommerziellen Reagenziensätzen	68
3.1.9	Southern Blot Hybridisierungen	68
3.2	Kultivierung embryonaler Stammzellen der Maus.....	70
3.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen	70
3.2.2	Passagieren von ES-Zellen der Maus	71
3.2.3	Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen der Maus	71

3.2.4	Elektroporation der ES-Zellen.....	71
3.2.5	Selektion auf stabile Integration und homologe Rekombination	72
3.2.6	Karyotypanalyse.....	73
3.3	Zucht und Haltung von Mäusen	73
3.3.1	Blastozysteninjektion und Uterustransfer	73
3.4	Immunoblotanalysen	74
3.4.1	Herstellung von Gewebelysaten.....	74
3.4.2	Herstellung von Cochlea-Proteinlysaten.....	75
3.4.3	Herstellung von Haut-Proteinlysaten.....	75
3.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	75
3.4.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	76
3.4.6	Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran	77
3.4.7	Immunoblotanalyse mittels Chemilumineszenz (ECL).....	77
3.4.8	Entfernung gebundener Antikörper von Nitrozellulosemembranen	78
3.4.9	Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Brilliant-Blue TM	78
3.4.10	Ponceau-Färbung.....	78
3.5	Herstellung von Gewebeschnitten	78
3.5.1	Ganzkörperperfusion von Mäusen	78
3.5.2	Herstellung von Gefrierschnitten	79
3.5.3	Herstellung von Paraffinschnitten der Cochlea.....	80
3.5.4	Herstellung von Vibratomschnitten der Cochlea	80
3.6	Indirekte Immunfluoreszenzanalysen.....	81
3.6.1	Immunfluoreszenzanalysen an Gefrierschnitten	81

3.6.2	Immunfluoreszenzanalysen an Vibratomschnitten der Cochlea	81
3.7	Histologische Färbetechniken	82
3.7.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	82
3.7.2	LacZ-Färbung.....	82
3.7.3	Toluidinblau-Färbung zur Untersuchung der epidermalen Wasserpermeabilitätsbarriere.....	83
4	Ergebnisse	84
4.1	Analyse der Mutation Cx30T5M in der Maus	84
4.1.1	Der Cx30T5M Austauschvektor	84
4.1.2	Erzeugung und Isolierung homolog rekombinierter ES-Zellen	87
4.1.3	Erzeugung chimärer Mäuse durch Blastozysten-Injektion	91
4.1.4	Untersuchung der Cx30T5M-Mauslinie mittels PCR-Analysen und Southern Blot Hybridisierung.....	92
4.1.5	Expressionsanalysen der Cx30T5M Mutation in der Maus.....	94
4.1.6	Hämalaun/ Eosin-Färbung der Cochlea	95
4.1.7	Expressionsanalysen im Innenohr	96
4.1.8	Ableitung der Hörschwellen am Hirnstamm und Analyse des endocochlearen Potentials.....	100
4.1.9	Gap-FRAP Analyse zur Überprüfung der Permeabilität von Cx30T5M Gap Junction Kanälen.....	102
4.1.10	Untersuchung der ATP-Freisetzung durch Connexin Halbkanäle	104
4.2	Erzeugung der Cx30A88V-Mauslinie.....	107
4.2.1	Der konditionale Austauschvektor „Cx30KICx30A88V“	107
4.2.2	Erzeugung des konditionalen Cx30A88V Austauschvektors.....	108
4.2.3	Erzeugung und Isolierung homolog rekombinierter muriner ES-Zellen.....	113

4.2.4	PCR-Analysen zur Charakterisierung der homolog rekombinierten Cx30A88V-ES-Zellklone	114
4.2.5	Nachweis der homologen Rekombination durch Southern Blot Hybridisierungen	116
4.2.6	Erzeugung chimärer Mäuse durch Blastozysten-Injektion	119
4.3	Charakterisierung der Cx26S17F-Mauslinie	121
4.3.1	Die Cx26S17F-Mauslinie	121
4.3.2	Phänotypische Ausprägung der Mutation Cx26S17F in transgenen Mäusen...	123
4.3.3	Charakterisierung des Hautphänotyps	124
4.3.4	Charakterisierung des Hörphänotyps	131
4.4	Die Cx26floxLacZ[Cx32]-Mauslinie.....	134
4.4.1	Nachweis der β -Galaktosidase Aktivität in der Cochlea von Cx26floxLacZ[Cx32]-Mäusen.....	135
4.4.2	Immunfluoreszenzanalysen der Connexine Cx26, Cx30 und Cx32 in der Cochlea von Cx26floxLacZ[Cx32]-Mäusen.....	136
4.4.3	Messung der Hörschwellen der Cx26floxLacZ[Cx32]-Mäuse	138
5	Diskussion.....	140
5.1	Cx26 und Cx30 punktmutierte Mäuse	140
5.1.1	Die Cx30T5M-Mauslinie	140
5.1.2	Die Cx30A88V-Mauslinie	145
5.1.3	Die Cx26S17F-Mauslinie.....	148
5.2	Die Cx26floxLacZ[Cx32]-Mauslinie.....	154
6	Ausblick	157
6.1.1	Weitere Analysen der Cx30T5M-Mauslinie.....	157
6.1.2	Weitere Analysen der Cx30A88V-Mauslinie	157

6.1.3	Weitere Analysen der Cx26S17F-Mauslinie	159
6.1.4	Weiterführende Analysen der Cx26floxLacZ[Cx32]-Mauslinie.....	162
7	Zusammenfassung.....	163
8	Literaturverzeichnis	165
9	Anhang	181
	Vektorkarten	181
	Publikationsliste	185

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	h	Stunde
A. bidest	Zweifach destilliertes Wasser	hCG	humanes Chorion Gonadotropin
ABR	Auditory brainstem response	K	Kalium
abs.	absolut	Kap.	Kapitel
ATP	Adenosintriphosphat	kb	Kilobasenpaare
BAC	Bakterielles artifizielles Chromosom	kD	Kilodalton
bp	Basenpaare	KI	„Knock-In“
BSA	Rinderserumalbumin	KO	„Knock-Out“
bzw.	beziehungsweise	konz.	konzentriert
Ca	Calcium	l	Liter
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	LB-Medium	Luria-Bertani Medium
cDNA	DNS-Kopie einer RNS	LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
C-Terminus	Carboxyterminales Ende eines Peptids	Lsg.	Lösung
Cx	Connexin	M	Molar (Mol pro Liter)
DEPC	Diethylpyrokarbonat	mA	Milliampere
DMEM	Dubecco's Modified Eagle Medium	MCS	Multiple cloning site (Vielfachklonierungsstelle)
DMSO	Dimethylsulfoxid	mg	Milligramm
DNS	Desoxyribonukleinsäure	mM	Millimolar
DNase	Nuklease	mRNS	Boten-RNS
dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat	min	Minute
E	Embryonaler Tag	mV	Millivolt
E. coli	Escherichia coli	n	Anzahl
ECL	Enhanced Chemiluminescence Reaction	Na	Natrium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NAD ⁺	Nikotinamadenindinukleotid
eGFP	enhanced green fluorescent protein	Neo	Neomycinresistenzgen
et al.	et altera	NLS	Kernlokalisationssequenz
EP	Endocochleares Potential	N-Terminus	Aminotermiales Ende eines Peptids
EtBr	Ethidiumbromid	ODx	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
EtOH	Ethanol	P	Postnataler Tag
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen	p	Wahrscheinlichkeit
FCS	Fötales Kälberserum	poly(A)	Polyadenylierungssignal
FSH	Follikelstimulierendes Hormon	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

Abkürzungsverzeichnis

g	Gramm	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd	üN	über Nacht
pgk	Phosphoglyzeratkinase	Upm	Umdrehungen pro Minute
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration	UTR	nicht-translatierte Region
RNS	Ribonukleinsäure	UV	Ultraviolett
RNase	Ribonuklease	vgl.	vergleiche
RT	Raumtemperatur/ Reverse Transkription	v/v	Volumen pro Volumen
SDS	Natriumdodecylsulfat	w/v	Gewicht pro Volumeneinheit
s	Sekunde	wt	Wildtyp
SSC	Trinatriumcitrat	X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktosid
St.	Stratum	z. B.	zum Beispiel
Tab.	Tabelle	μ g	Mikrogramm
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer	μ l	Mikroliter
TE	Tris-EDTA-Puffer	μ M	Mikromolar
U	Enzymeinheit (Unit)	$^{\circ}$ C	Grad Celsius

1 Einleitung

Eine Grundvoraussetzung für die mechanische Stabilität und die Abstimmung physiologischer Prozesse in Organen und Geweben multizellulärer Organismen bilden spezialisierte Zellverbindungen, welche die intrazelluläre Kommunikation aufrechterhalten. Entsprechend ihrer Aufgaben werden diese Zellverbindungen in drei funktionelle Klassen unterteilt:

Tight Junctions (engl. „tight“ = dicht, engl. „junction“ = Verbindung) stellen undurchlässige Zell-Zell-Verbindungen dar, die zur Stabilisierung von Gewebeverbänden beitragen und eine Diffusionsbarriere zwischen Epithelzellen bilden.

Adherens Junctions (engl. „to adhere“ = haften, engl. „junction“ = Verbindung) gewährleisten die mechanische Stabilität von Geweben durch die Verknüpfung des Zytoskeletts benachbarter Zellen.

Gap Junctions (engl. „gap“ = Lücke, engl. „junction“ = Verbindung) sind kommunizierende Verbindungen, die in den nachfolgenden Abschnitten dieser Arbeit ausführlicher erläutert werden.

1.1 Gap Junctions

Die in der Zellmembran lokalisierten Gap Junction Kanäle erlauben durch die Verbindung der Zytoplasmata benachbarter Zellen eine direkte interzelluläre Kommunikation. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass sich in diesen Regionen die Plasmamembranen benachbarter Zellen auf nur 3-5 nm annähern (Revel und Karnovsky, 1967). Der übliche Abstand benachbarter Zellen beträgt 20 bis 30 nm (Abb. 1.1 A und B). Gap Junction Kanäle werden in nahezu allen eukaryontischen Zelltypen ausgeprägt. Ausnahmen bilden Erythrozyten, Thrombozyten und Spermien (Willecke et al., 2002).

Die zelluläre Kommunikation über Gap Junction Kanäle wurde im Tierreich sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten dokumentiert, wobei sich die, an der Bildung der Gap Junction Kanäle, beteiligten Proteine voneinander unterscheiden. Während sich Gap Junctions in Vertebraten aus Connexinen (Willecke et al., 2002) zusammensetzen, bilden in Invertebraten Innexine (Scemes et al., 2007) das Grundgerüst der Gap Junction Kanäle. Beide Familien entstanden vermutlich durch konvergente Evolution. In den Vertebraten wurde zusätzlich zu den Connexinen eine weitere an der direkten Kommunikation beteiligte Familie gefunden: die Pannexine (Scemes et al., 2007). In der Maus und im Menschen wurden bis jetzt drei Pannexingene beschrieben, *Panx1*, *Panx2* und *Panx3*. Diese sind homolog zu den

Innexinen der Invertebraten (Panchin et al., 2000; Yen und Saier, 2007). Panx1 wird ubiquitär exprimiert, während Panx2 hauptsächlich in Neuronen und Panx3 in Epithelzellen beschrieben wird (Bruzzone et al., 2003). Bis jetzt ist unklar, ob Pannexine Gap Junction Vollkanäle ausbilden können. Allein für Panx1 wird die Möglichkeit beschrieben Gap Junction Kanäle auszuprägen (Barbe et al., 2006). Ansonsten fungieren Pannexine über Halbkanäle, die u. a. die Freisetzung parakriner Faktoren, wie z. B. ATP, vermitteln (D'Hondt et al., 2009).

Die nachfolgenden Abschnitte beziehen sich ausschließlich auf die aus Connexinen aufgebauten Gap Junction Kanäle.

1.1.1 Struktur von Gap Junctions, Connexonen und Connexinen

Gap Junction Kanäle sind in der Zellmembran als sogenannte Gap Junction Plaques (Abb. 1 A, B) organisiert, die aus bis zu 1000 Einzelkanälen bestehen können (Falk, 2000). Das Grundgerüst dieser Gap Junction Kanäle formen die Connexine. Diese bilden eine Multigenfamilie, deren Mitglieder eine hohe Ähnlichkeit der Proteinsequenz und konservierte Sequenzmotive aufweisen, die sich vermutlich durch Genduplikationen und -modifikationen aus einem Ursprungsgen entwickelt haben (Bennett, 1994; Bruzzone et al., 1996). Bis heute wurden im Genom des Menschen 21 und im Genom der Maus 20 Connexingene beschrieben, wobei 19 zueinander ortholog sind (Söhl und Willecke, 2003). Jedes Connexin besitzt vier Transmembrandomänen, die über zwei extrazelluläre und eine intrazelluläre (zytoplasmatische) Schleife miteinander verbunden sind (Abb. 1.1 C). Die extrazellulären Schleifen sind maßgeblich an der Zusammenlagerung zweier Connexone benachbarter Zellen beteiligt (Mese et al., 2007). Eine stabilisierende Funktion wird dabei drei in den extrazellulären Domänen lokalisierten, hochkonservierten Cysteinresten zugewiesen, die intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden (Krutovskikh und Yamasaki, 2000). Die Transmembrandomänen und extrazellulären Schleifen sind innerhalb der Connexinfamilie hochkonserviert. Connexine besitzen außerdem zytoplasmatisch lokalisierte C- und N-Termini (Abb. 1.1 C). Im Gegensatz zum N-Terminus, welcher konserviert ist, zeigen die zytoplasmatische Schleife und der C-Terminus eine hohe Variabilität, sowohl die Sequenz als auch die Länge dieser Connexinregionen betreffend (Saéz et al., 2003). Beispielsweise variiert die Länge des C-Terminus zwischen 16 Aminosäuren bei Cx26 (Zhang und Nicholson, 1989) und 269 Aminosäuren bei Cx57 (Hombach et al., 2004). Sowohl der C-Terminus als auch die zytoplasmatische Schleife unterliegen post-translationalen Modifikationen, z. B. Phosphorylierungen, die eine Rolle bei der Regulation der Kanäle einnehmen (Cruciani und Mikalsen, 2002). Sie dienen zudem der Interaktion mit anderen Proteinen, so konnte für Cx43 u. a. eine Interaktion mit dem Zonula occludens Protein ZO-1 sowie α - und β -Tubulin nachgewiesen werden (Toyofuku et al., 1998; Giepmans et al., 2001).

Sechs Connexine bilden einen Halbkanal (Connexon, Abb. 1.1 D), der eine hydrophile Pore mit einem Durchmesser von 1,6 nm bildet (Perkins et al., 1997), die reversibel verschließbar ist (Simpson et al., 1977). Zwei Connexone, die jeweils von benachbarten Zellen beigesteuert werden, bilden einen Gap Junction Kanal, der durch nicht kovalente Bindung der extrazellulären Schleifen beider Connexone stabilisiert wird (Rahman und Evans, 1991). Ein Gap Junction Kanal kann aus zwei identischen Connexonen (homotypisch, Abb. 1.1 D) oder aus unterschiedlichen Connexonen (heterotypisch, Abb. 1.1 D) aufgebaut sein. Zu der daraus resultierenden hohen Diversität der Gap Junction Kanäle trägt auch die Zusammensetzung der Connexone bei, die aus einer Connexin-Isoform (homomer) oder aus mehreren Connexin-Isoformen (heteromer) aufgebaut sein können (Abb. 1.1 D) (Jiang und Goodenough, 1996). Diese hohe Variabilität hat je nach Zusammensetzung eines Gap Junction Kanals eine Veränderung der Selektivität der Pore für verschiedene Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften zur Folge (Sosinsky und Nicholson, 2005).

Neben der Proteinsequenz zeigen die meisten Connexine auch Ähnlichkeiten in der genetischen Organisation. Connexingene setzen sich meist aus zwei Exons zusammen, die durch ein Intron voneinander getrennt vorliegen. Dabei enthält Exon 1 die 5' untranslatierte Region und Exon 2 die gesamte Kodierungsregion sowie die 3' untranslatierte Region (Zhang und Nicholson, 1989; Hennemann et al., 1992). Ausnahmen bilden beim Menschen die Connexine hCx36 und hCx40.1 und bei der Maus die Connexine mCx23, mCx36, mCx39 sowie mCx57, bei denen die kodierende Region auf mehrere Exons aufgeteilt ist (Söhl und Willecke, 2003). Ein alternatives Spleißen in der 5' untranslatierten Region wurde für die Connexine Cx45, Cx32 und Cx30 beschrieben (Söhl et al., 2001; Essenfelder et al., 2005). Dieser Mechanismus dient vermutlich einer post-transkriptionellen Regulation der Genaktivität durch Modifikation der Transkriptstabilität oder der Translationseffizienz (Essenfelder et al., 2005).

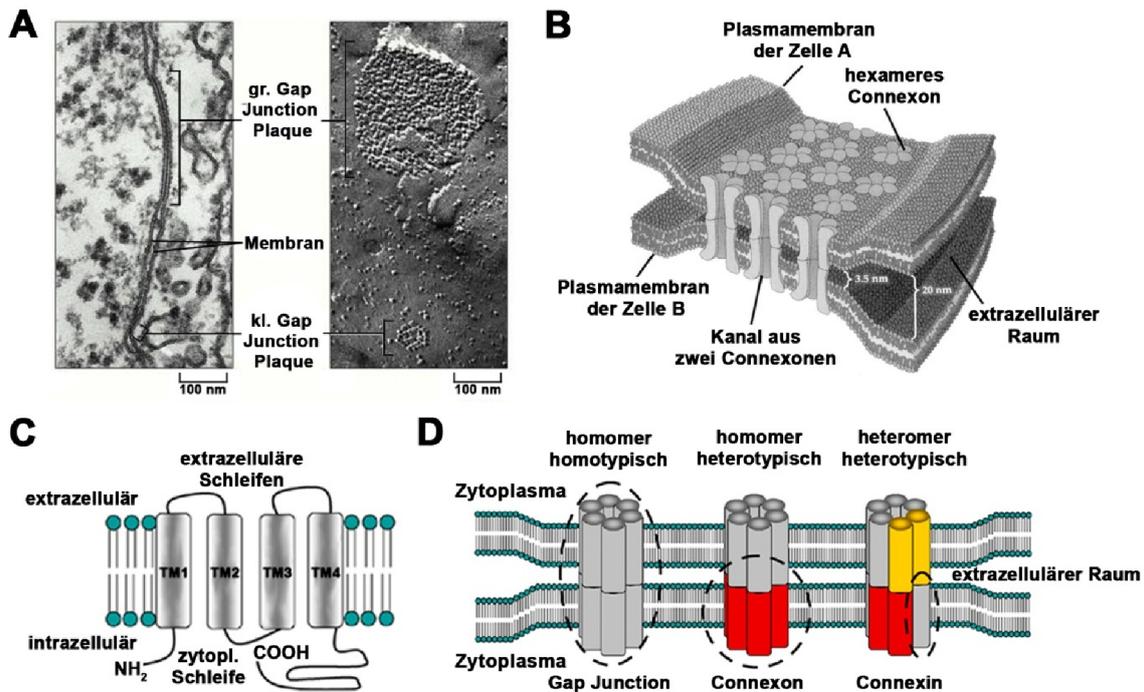


Abb. 1.1 Molekulare Organisation und Topologie eine Gap Junction Plaques.

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gap Junction Plaques (verändert nach Alberts, Molecular Biology of the Cell, 4. Auflage, 2002). Links: Dünnschichtaufnahme von Gap Junctions zwischen Fibroblasten. Die Zellmembranen benachbarter Zellen nähern sich bei der Ausbildung eines Gap Junction Plaques auf 3-5 nm an. Rechts: Gefrierbruch-Aufnahme von Gap Junction Plaques, die aus bis 1000 Einzelkanälen bestehen können. (B) Schematische Darstellung eines Gap Junction Plaques. (C) Struktur eines Connexins (verändert nach Wagner, 2008). Connexine durchziehen die Zellmembran mit vier α -helikalen Transmembrandomänen (TM). Außerdem verfügen sie über eine zytoplasmatische und zwei extrazelluläre Schleifen sowie zytoplasmatisch lokalisiert C- und N-Termini. (D) Schematische Darstellung verschiedener Gap Junction Kanäle (verändert nach Wagner, 2008). Zwei Connexone benachbarter Zellen können Gap Junction Kanäle ausbilden, die je nach ihrer Zusammensetzung als homomer homotypisch, homomer heterotypisch und heteromer heterotypisch bezeichnet werden.

Die Benennung der Connexine geht auf zwei unterschiedliche Nomenklaturen zurück. Seit 1988 werden Connexinproteine nach der aus der cDNS abgeleiteten theoretischen Molekülmasse in Kilodalton (kDa) sowie der Abkürzung Cx benannt (Beyer et al., 1988). Als zusätzliches Merkmal kann eine Abkürzung für die jeweilige Spezies vorangestellt werden (z. B. „h“ für human, „m“ für murin). Nach der zweiten Nomenklatur werden Connexine entsprechend ihrer Sequenzähnlichkeit und Länge der zytoplasmatischen Schleife den Klassen α - ϵ zugeteilt. Unter Voranstellen der Abkürzung Gj (Gap Junction) werden Connexingene in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert z. B. Gjb6 für mCx30 (Söhl und Willecke, 2003; Cruciani und Mikalsen, 2007). Im Jahr 2007 wurde eine einheitliche Nomenklatur für Connexine kodierende Gene beschlossen. Eine Übersicht ist für die humanen Gene unter <http://www.genenames.org/genefamily/gj.php> und für die murinen

Gene unter <http://www.informatics.jax.org/> einzusehen. In der vorliegenden Arbeit wird die Nomenklatur nach Beyer et al., 1988 verwendet.

1.1.2 Funktion von Connexinen und Gap Junction Kanälen

Gap Junction Kanäle vermitteln die elektrische und biochemische Kopplung zwischen benachbarten Zellen und erlauben den Austausch von Ionen, Metaboliten und Sekundärbotenstoffen wie z. B. cAMP (zyklisches AMP) (Bedner et al., 2006), Ca²⁺-Ionen (Sun et al., 2005) oder IP₃ (Inositol-1,4,5-trisphosphat) (Beltramello et al., 2005) bis zu einer Größe von 1,2 kDa (Harris, 2007). Zudem wurde die Diffusion von siRNS durch Gap Junction Kanäle nachgewiesen (Valiunas et al., 2005). Je nach ihrer Zusammensetzung aus verschiedenen Connexin-Isoformen unterscheiden sich Gap Junction Kanäle in ihrer Permeabilität und Einzelkanalleitfähigkeit (Harris, 2007). Dies hat auch zur Folge, dass die Funktion eines Connexingens nicht vollständig durch ein anderes übernommen werden kann (Plum et al., 2000; Winterhager et al., 2007). Anstelle der Gap Junction Vollkanäle können Connexine auch funktionale Halbkanäle ausbilden, die an der Freisetzung von ATP beteiligt sind (Stout et al., 2004; Dobrowolski et al., 2007).

Im Herzen vermitteln Gap Junctions als „elektrische Synapsen“ die synchrone Kontraktion der Kardiomyozyten (Severs et al., 2004). Zudem gewährleisten sie in neuronalen Geweben eine schnelle Reizweiterleitung (Zoidl und Dermietzel, 2002) und Synchronisation der Neuronen (Landisman et al., 2002). Gap Junctions erlauben auch die Versorgung schlecht durchbluteter Gewebe wie z. B. den Faserzellen der Augenlinse (White und Bruzzone, 2000) mit Nährstoffen. Darüber hinaus wird Gap Junction Kanälen eine Funktion als Tumorsuppressoren (Zhang et al., 2003), in der Wachstumskontrolle (Moorby und Patel, 2001), während Apoptoseprozessen (Krysko et al., 2005) sowie der Zelladhäsion und Zellmortalität (Wei et al., 2004) zugesprochen.

1.1.3 Regulation von Connexinen und Gap Junction Kanälen

Die Regulation der Gap Junction vermittelten Kommunikation unterliegt verschiedenen Mechanismen. Die Öffnungswahrscheinlichkeit eines Gap Junction Kanals kann durch eine post-translationale Phosphorylierung verschiedener Aminosäuren des C-Terminus oder der zytoplasmatischen Schleife als Antwort auf z. B. durch Wachstumsfaktoren oder Entzündungsmediatoren ausgelöste intrazelluläre Signalwege beeinflusst werden (Warn-Cramer und Lau, 2004; Moreno, 2005). Diese können sowohl das Schließen (z. B. Cx43) als auch das Öffnen (z. B. Cx45) eines Kanals hervorrufen (Warn-Cramer und Lau, 2004). Auch eine lokal begrenzte Erniedrigung des extra- und intrazellulären pH-Wertes als Folge einer Sauerstoff-Unterversorgung (Hypoxie) kann zu einem schnellen Verschluss des Kanals

führen, wobei die pH-Sensitivität von der Zusammensetzung eines Connexons abhängig ist (Spray und Burt, 1990; Peracchia, 2004). Eine pathologische Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration, beispielsweise nach Verletzung einer benachbarten Zelle, vermittelt ebenfalls einen Verschluss der Gap Junction Kanäle (Peracchia, 2004). Neben den genannten Mechanismen kann das Öffnen und Schließen der Gap Junction Kanäle auch spannungsabhängig erfolgen, wobei die Kanäle je nach ihrer Connexin-Zusammensetzung stark unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften aufweisen (van Veen et al., 2001).

Zur Erklärung des Schließ- und Öffnungsmechanismus von Gap Junction Kanälen werden zwei Modelle herangezogen (Abb. 1.2). Das „Irisblenden-Modell“ (Abb. 1.2 A) geht davon aus, dass die Änderung des Neigungswinkels der Connexine zueinander, durch eine Drehung der Connexone, zum Verschluss eines Gap Junction Kanals führt (Unwin und Ennis, 1983; Perkins et al., 1998). Die favorisierte Erklärung des Öffnungsmechanismus pH-, Calcium- und spannungsabhängiger Gap Junction Kanäle bildet das „Ball-und Kette-Modell“ (Abb. 1.2 B). Hierbei bindet die äußerste Region des C-Terminus „Ball“ über eine flexible Domäne des C-Terminus „Kette“ an einen Rezeptor in der hydrophilen Kanalpore und verschließt diese (Delmar et al., 2004).

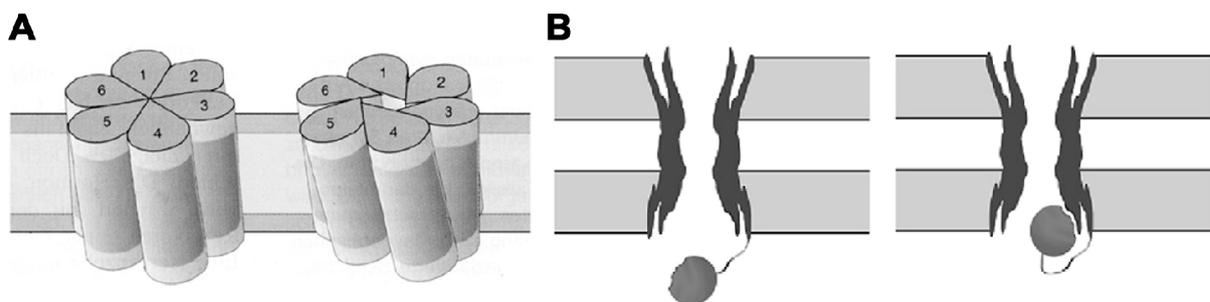


Abb. 1.2: Mechanismus der Öffnung und Schließung von Gap Junction Kanälen.

(A) „Irisblenden-Modell“. Eine Verdrehung der Connexine gegeneinander führt zum Verschluss der Kanalpore (Kandel et al., 1996). (B) „Ball-und-Kette-Modell“ (Delmar et al., 2004). Eine flexible Domäne führt den „Ball“, vermutlich der C-Terminus, an einen Rezeptor in der hydrophilen Pore und verschließt sie damit.

Röntgenstrukturanalysen des humanen Cx26 lassen vermuten, dass auch die N-terminale Domäne den Öffnungszustand eines Gap Junction Kanals regulieren kann (Maeda et al., 2009). Die N-terminalen Domänen der Cx26 Untereinheiten formen auf zytoplasmatischer Seite einen Trichter, der in der 1,4 nm großen Pore des Kanals endet. Eine Konformationsänderung der N-Termini, die vermutlich spannungsabhängig ist, führt zum Verschluss der Pore. Hierbei lagern sich die N-Termini zusammen und bilden einen „Stöpsel“ („Plug“), der den Gap Junction Kanal verschließt (Abb. 1.3).

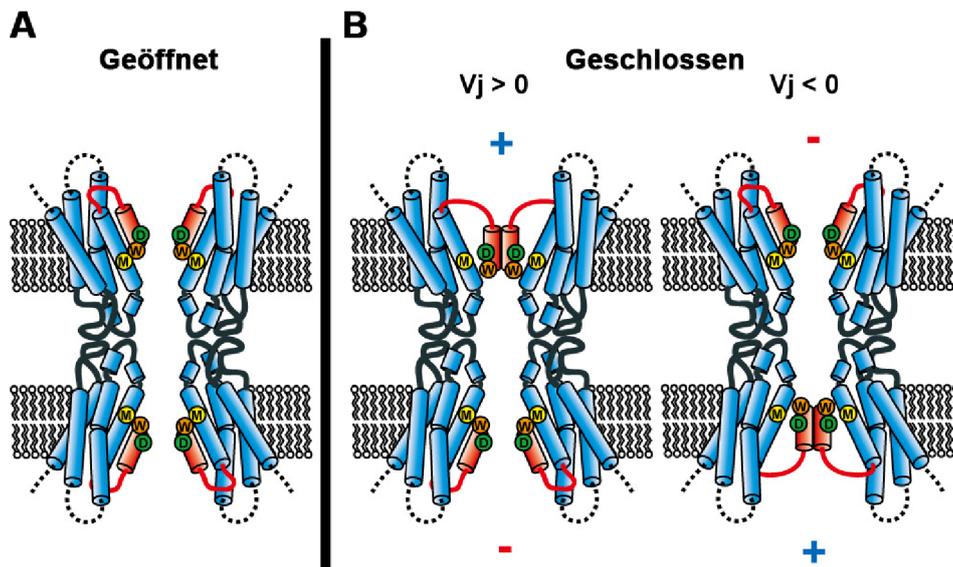


Abb. 1.3: Postulierter Mechanismus der spannungsabhängigen Öffnung und Schließung von hCx26 Gap Junction Kanälen (verändert nach Maeda et al., 2009).

(A) Modell eines geöffneten hCx26 Gap Junction Kanals basierend auf Kristallstrukturanalysen. Der N-Terminus (rot) ist mit den Transmembrandomänen des Connexins (blau) über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten Trp3 und Met34 verbunden. Dies repräsentiert den Zustand bei einer Spannung $V_j = 0$. (B) Modell eines geschlossenen hCx26 Gap Junction Kanals basierend auf elektronenmikroskopischen Strukturanalysen (Oshima et al., 2007). Der relative Potentialgradient wird als $V_j > 0$ dargestellt, wenn die obere Zelle eine positivere Ladung besitzt als die untere. In diesem Zustand führt eine Konformationsänderung durch das Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem N-Terminus und dem Aminosäurerest Met34 zum Verschluss des Gap Junction Kanals. Der zweite Halbkanal löst die Bindung zwischen dem N-Terminus und dem Aminosäurerest Met34 nicht auf.

Beeinflusst wird die intrazelluläre Kommunikation über Gap Junction Kanäle, unabhängig des Öffnungszustands eines Kanals auch über die Synthese und Degradation der Connexinproteine. Connexine haben eine kurze Halbwertszeit von nur 1-5 Stunden (Laird, 2006). Die meisten Connexine oligomerisieren, nach ihrer Translation im endoplasmatischen Retikulum, im Trans-Golgi Apparat (Laird, 2006) und werden als Connexone über Mikrotubuli zur Zelloberfläche transportiert (Mese et al., 2007). Dort werden sie an die Außenseite bereits bestehender Gap Junction Plaques internalisiert und aggregieren mit Connexonen benachbarter Zellen zu Vollkanälen (Gaietta et al., 2002). Der Abbau der internalisierten Gap Junction Kanäle führt unter Bildung annulärer Gap Junctions (Nickel et al., 2008) über den proteasomalen und lysosomalen Weg (Salameh, 2006).

1.1.4 Expressionsmuster der Connexine Cx26, Cx30 und Cx32

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion von Connexinen im Innenohr und in der Haut mittels der Charakterisierung von Cx26- bzw. Cx30- Mausmutanten untersucht werden. Aus diesem Grund folgt nach der allgemeinen Einleitung in die Funktion und Regulation von Gap

Junction Kanälen nun eine kurze Beschreibung der in dieser Arbeit untersuchten Connexine Cx26, Cx30 und Cx32.

1.1.4.1 Ausprägungsmuster von Connexin26

Mit einer Länge von 226 Aminosäuren gehört Cx26 zu den kleinsten Connexinen in Mensch und Maus. Das für das murine Cx26 kodierende Gen *Gjb2* liegt als Einzelkopie auf dem Chromosom 14, während das humane Gen *GJB2* auf Chromosom 13 lokalisiert ist (Söhl und Willecke, 2004). Lange Zeit wurde angenommen, dass Cx26 im Gegensatz zu den meisten anderen Connexinen bereits im endoplasmatischen Retikulum oligomerisiert (Falk et al., 1997) und das Golgi Netzwerk auf dem Weg zur Plasmamembran umgeht (George et al., 1999). Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass während der Gap Junction Biogenese die Hauptpopulation von Cx26 Proteinen den klassischen Weg, ähnlich dem von Cx43 (Evans et al., 1999), über das endoplasmatische Retikulum und das Golgi Netzwerk folgt (vgl. Abschnitt 1.1.3) (Thomas et al., 2005).

Die Expression von Cx26 wurde in den Hepatozyten der Leber (Rosenberg et al., 1992), den Keratinozyten der Haut (Salomon et al., 1994), in der Placenta (Gabriel et al., 1998), der Cochlea (Kikuchi et al., 2000), der Niere (Hennemann et al., 1992) sowie in der Schilddrüse (Meda et al., 1993) gezeigt. Die Cx26 Expression in verschiedenen Zelltypen des Gehirns wird kontrovers diskutiert. Gefunden wurde Cx26 in Neuronen (Nadarajah et al., 1997; Venance et al., 2000; Bittman et al., 2002) und in Astrozyten (Nagy et al., 2001). In anderen Studien wurde Cx26 weder in Neuronen noch in Astrozyten, aber in den embryonalen und adulten Meningen nachgewiesen (Dermietzel et al., 1989; Filippov et al., 2003).

1.1.4.2 Ausprägungsmuster von Connexin30

Das murine Cx30 wurde erstmals während des Durchmusterns einer genomischen Phagenbank der Maus entdeckt (Dahl et al., 1996). Kodiert wird das Cx30 Protein, das aus 261 Aminosäuren aufgebaut ist, durch das *Gjb6* Gen, welches bei der Maus als Einzelkopie auf Chromosom 14 und beim Menschen auf Chromosom 13 lokalisiert ist (Söhl und Willecke, 2004). Mit Cx26 verbindet Cx30 eine Peptidsequenzähnlichkeit von 77% und die Lage auf dem gleichen Chromosom. Deswegen wird vermutet, dass Cx30 als Folge einer Genduplikation entstanden sein könnte (Dahl et al., 1996). Als Hauptexpressionsorte des Cx30 werden die Astrozyten des Gehirns (Dahl et al., 1996), die Keratinozyten der Haut (Dahl et al., 1996; Kretz et al., 2004) und verschiedene Zelltypen der Cochlea beschrieben (Ahmad et al., 2003; vgl. Kap. 1.2.2). Auf mRNA-Ebene konnte Cx30 zudem in der Niere, dem Uterus, der Lunge und dem Auge nachgewiesen werden (Dahl et al., 1996).

1.1.4.3 Charakteristika der Cx32 Expression

Cx32 (283 Aminosäuren lang) wird in den Schwannzellen des peripheren Nervensystems exprimiert, wo es eine essentielle Rolle in der Myelinisierung peripherer Axone spielt (Bergoffen et al., 1993; Scherer et al., 1995). In Cx32 defizienten Mäusen (Cx32^{-/-}) (Nelles et al., 1996; Anzini et al., 1997) tritt eine veränderte Myelinisierung des peripheren Nervensystems sowie eine verringerte Leitungsgeschwindigkeit auf (Anzini et al., 1997; Scherer et al., 1998). Ähnliche Symptome wurden in Menschen beobachtet, die an der X-chromosomal vererbaren Form der Charcot-Marie-Tooth Krankheit (CMTX) leiden, die auf Mutationen des *GJB1* Gens (Cx32) zurückgeführt werden kann. CMT ist gekennzeichnet durch eine Störung der Myelinisierung des peripheren Nervensystems. (Bergoffen et al., 1993). Neben den Schwannzellen exprimieren auch Oligodendrozyten des zentralen Nervensystems Cx32 (Scherer et al., 1995; Li et al., 1997). Hier wurden leichtere Myelinisierungsdefekte in Mäusen im Alter von acht Monaten beschrieben, die durch Mutationen im *Gjb1* Gen verursacht wurden (Sargiannidou et al., 2009). In den Hepatozyten der Leber treten die Connexine Cx26 und Cx32 kolokalisiert auf und bilden neben homomeren auch heteromere Kanäle (Lee und Rhee, 1998; Locke et al., 2003). In Cx32^{-/-}-Mäusen ist die Expression von Cx26 in der Leber herunterreguliert, so dass ein stabilisierender Effekt von Cx32 auf Cx26 postuliert wurde (Nelles et al., 1996). In der Leber von Cx32^{-/-}-Mäusen führt die elektrische Stimulation des Nervus Sympaticus zu einer um 78% verringerten Glukosemobilisierung aus Glukosespeichern. Der Grund hierfür liegt in einer verhinderten Noradrenalin-Signalweiterleitung durch Cx32 Gap Junction Kanälen zu den Hepatozyten (Nelles et al., 1996).

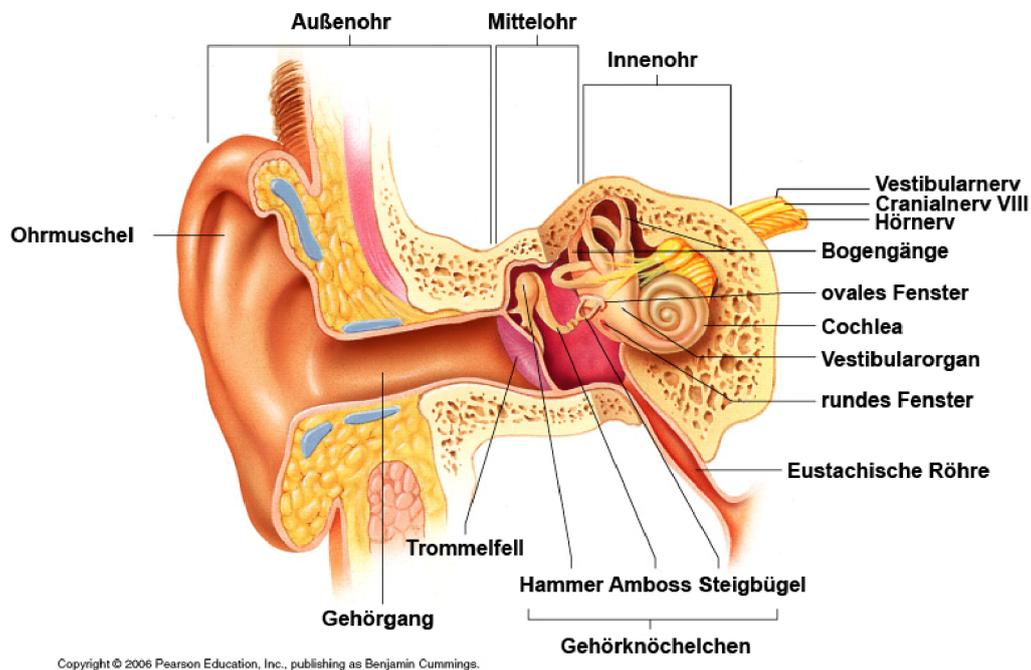
1.2 Das Gehör

Das Gehör erlaubt die Wahrnehmung von Schallreizen aus der Umwelt und zählt damit zu den wichtigsten Sinnesorganen der Säugetiere. Außen- und Mittelohr nehmen den Schall auf und übertragen ihn verstärkt an das Innenohr, das die Schallwellen in Nervensignale übersetzt und zum Gehirn weiterleitet, wo diese zu akustischen Informationen verarbeitet werden.

1.2.1 Aufbau und Funktion des Ohres

Die Ohrmuschel (Pinna) empfängt Schallwellen und überträgt diese über den äußeren Gehörgang auf das Trommelfell des Mittelohres, wo die Schallwellen in mechanische Reize transformiert werden. Diese Schwingungen erlauben eine verstärkte Reizweiterleitung über die Gehörknöchelchen Hammer (Malleus), Amboss (Incus) und Steigbügel (Stapes) auf das

ovale Fenster des Innenohres (Abb. 1.4). Das Innenohr besteht aus einem Labyrinth unterschiedlicher Gänge, in denen die Sinnesorgane des Gehörs (Cochlea) und des Gleichgewichtssinns (Vestibularorgan) liegen. In den nachfolgenden Ausführungen wird von einer näheren Beschreibung des Vestibularorgans abgesehen und der Fokus auf die Beschreibung des Aufbaus und der Funktion der Cochlea gelegt.



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Abb. 1.4: Aufbau des menschlichen Ohres (verändert nach Marieb, Essentials of Human Anatomy and Physiology, 7. Auflage, 2007).

Das Außenohr umfasst die sichtbare Ohrmuschel und den äußeren Gehörgang, über den die Schallwellen über das Trommelfell und die Gehörknöchelchen des Mittelohres auf das ovale Fenster des Innenohres übertragen werden. Das Innenohr beherbergt das Vestibularorgan und die Cochlea, über die die Schallwellen als Nervenimpulse an das Gehirn weitergegeben werden.

Die Cochlea ist ein spiralförmiges Organ, das aus drei flüssigkeitsgefüllten Kammern aufgebaut ist: Scala vestibuli, Scala media und Scala tympani (Abb. 1.5). Die Scala vestibuli und Scala tympani sind mit Perilymphe gefüllt, deren Ionenkomposition mit einer niedrigen Kaliumionenkonzentration [5 mM], der eines extrazellulären Mediums ähnelt. Die Scala media enthält dagegen Endolymphe, die sich durch eine hohe Kalium- [150 mM] und eine niedrige Natriumkonzentration auszeichnet. Sie ist von der Scala vestibuli durch die Reissner's Membran und von der Scala tympani durch die Basilarmembran getrennt. Auf der Basilarmembran befindet sich das Corti Organ, das die sensorischen Zellen (Haarsinneszellen) beherbergt (Abb. 1.5, vergrößerte Darstellung). Durch dieses Ionenkonzentrationsgefälle entsteht ein Ruhepotential von +80 mV, das so genannte endocochleare Potential. Aufrechterhalten wird das endocochleare Potential durch die Stria

vascularis, ein mehrlagiges Epithel an der lateralen Cochleawand (Hibino und Kurachi, 2006; Zdebik et al., 2009).

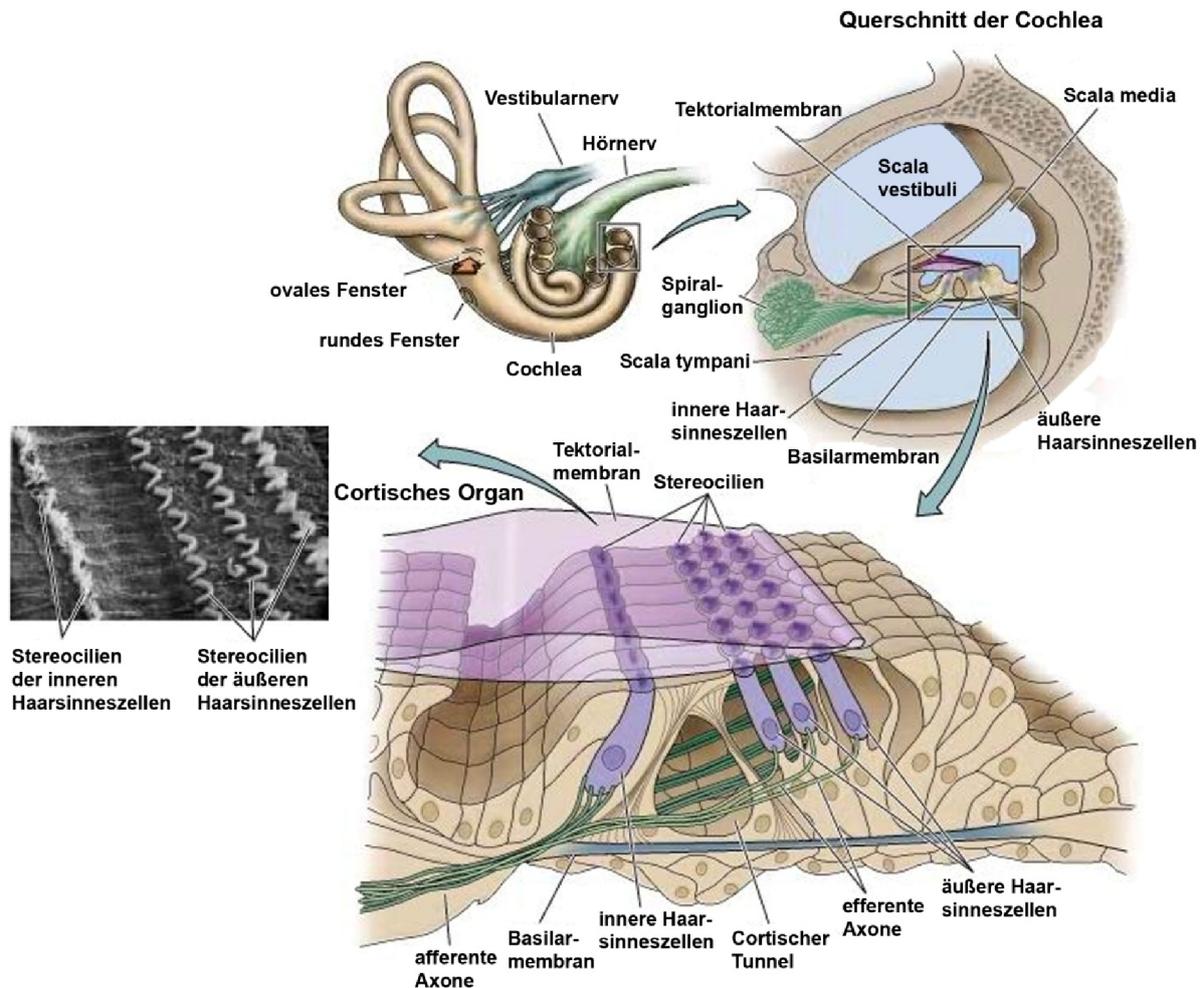


Abb. 1.5: Aufbau der Cochlea.

Der schematische Querschnitt durch die Cochlea zeigt die drei flüssigkeitsgefüllten Kompartimente der Cochlea: Scala vestibuli, Scala media und Scala tympani, die das Corti Organ umschließen. Die Vergrößerung des cortischen Organs zeigt die Lage der äußeren und inneren Haarsinneszellen (lila hervorgehoben) sowie der Tektorialmembran, die den Stereozilien der Haarsinneszellen aufliegt (verändert nach Purves, Neuroscience, 2. Auflage, 2001). Links ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Stereozilien der inneren und äußeren Haarsinneszellen dargestellt (verändert nach Kessel und Kardon, 1979).

Treffen Schallwellen über die Gehörknöchelchen auf das ovale Fenster, so werden diese als Schwingungen über die Reissner's Membran auf die Endolymphe in der Scala media übertragen. Dies führt durch Delokalisation der Tektorialmembran zu einer Auslenkung der mit ihr verbundenen Stereozilien der Haarsinneszellen (Abb. 1.5). Hierdurch kommt es zu einem Kaliumstrom (K^+ -Einstrom), dem elektrochemischen Gradienten folgend aus der Endolymphe über die Stereozilien in die Haarsinneszellen, wodurch spannungsabhängige Calciumkanäle (Ca^{2+} -Kanäle) in der Membran geöffnet werden (Abb. 1.6). Diese bewirken durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen die Depolarisation der Haarsinneszellen. Die damit

einhergehende Neurotransmitter-Freisetzung führt zur Innervierung des Hörnervs (Purves et al., 2001). Um eine erneute Erregung zu ermöglichen, müssen die Haarsinneszellen durch den Rücktransport der K^+ -Ionen in die Endolymphe repolarisiert werden (Steel und Kros, 2001).

Die Rolle der Connexine Cx26 und Cx30 an der Rückführung der K^+ -Ionen in die Endolymphe ist bis heute umstritten. Zum einen könnten Cx26 und Cx30 Gap Junction Kanäle direkt in den Rücktransport der K^+ -Ionen involviert sein, in dem sie die Diffusion der K^+ -Ionen ermöglichen (vgl. Kap. 1.2.2.1), zum anderen könnte aber auch der Transport von Sekundärbotenstoffen (vgl. Kap. 1.2.2.2) und die damit einhergehende Aktivierung von K^+ -Kanälen und K^+ -Kotransportern den K^+ -Rücktransport indirekt beeinflussen. Im nachfolgenden Abschnitt werden beide Hypothesen zur Funktion der Connexine in der Cochlea gegenübergestellt.

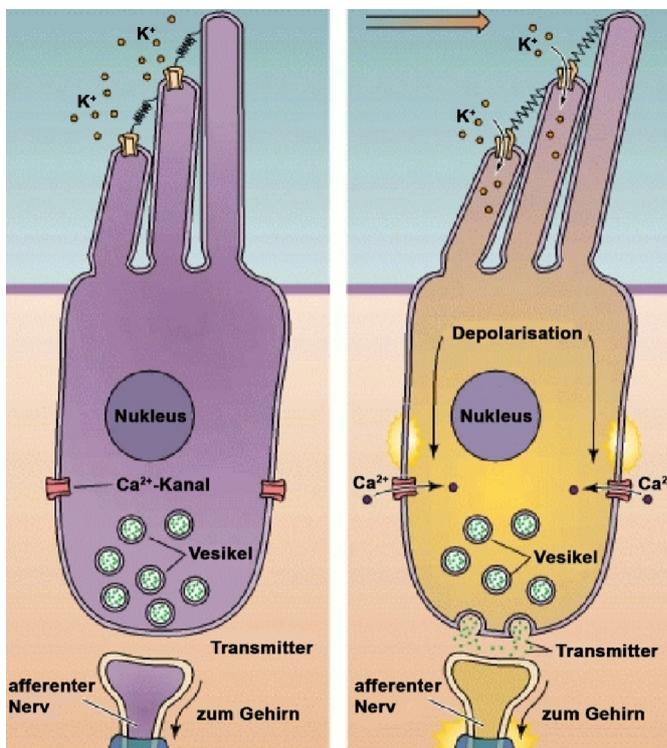


Abb. 1.6: Depolarisation der Haarsinneszellen (verändert nach Lewis und Hudspeth, 1983).

(A) Ruhezustand. (B) Depolarisation. Die Auslenkung der Stereozilien führt zur Öffnung von K^+ -Kanälen in den Spitzen der Stereozilien und zum Einstrom von K^+ -Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten. Dadurch öffnen sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und der Einstrom der Ca^{2+} -Ionen bewirkt die Freisetzung von Neurotransmittern und die Innervierung des Hörnervs.

1.2.2 Connexinexpression und Funktion im Innenohr

Mutationen in den zuvor beschriebenen Connexinen Cx26 (Kikuchi et al., 1995) und Cx30 (Lautermann et al., 1999) gehören zu den häufigsten Ursachen genetisch bedingter neurosensorischer Taubheit (Sugata et al., 2002). Neben der Expression der genannten Connexine wurde auch die Expression weiterer Connexine beschrieben: Cx29 (Eiberger et al., 2006), Cx31 (Forge et al., 2003), Cx32 (López-Bigas et al., 2002), Cx43 (Forge et al., 2003) und Cx45 (Cohen-Salmon et al., 2004). Die stärkste Expression in der Cochlea zeigen jedoch die

Connexine Cx26 und Cx30 (Ahmad et al., 2003). Daher beziehen sich alle nachfolgenden Beschreibungen auf diese beiden.

Ab embryonalem Tag 14,5 (E14,5) tritt eine überlappende Expression von Cx26 und Cx30 auf, wobei sich die Expression auf die Fibrozyten des sich entwickelnden Spiral limb und einige wenige die Stria vascularis umgebende Zellen des Spiral ligaments beschränkt. Im cortischen Organ findet zwischen E14,5 und E18,5 keine Expression dieser Connexine statt. Nach der Geburt, aber vor dem Beginn des Hörens an Tag 12 postnatal (P12), zeigt sich eine starke Expression in den Zellen des Spiral limb, den Stützzellen des cortischen Organs und den der Stria vascularis nahestehenden Fibrozyten. Im adulten Tier weitet sich die Expression der Connexine auf die Basalzellen der Stria vascularis und nahezu alle Zellen des Spiral ligaments aus (Sun et al., 2005). Cx26 und Cx30 bilden in der Cochlea heteromere Kanäle (Ahmad et al., 2003; Yum et al., 2007), die in ihren Eigenschaften von homomeren Kanälen abweichen. So ist der Ca^{2+} -Transfer über heteromere Gap Junction Kanäle schneller als über homomere Cx26- bzw. Cx30- Kanäle (Sun et al., 2005).

1.2.2.1 Der Kalium-Rücktransport

Während des Hörvorgangs nehmen Haarsinneszellen K^+ -Ionen auf (vgl. Abschnitt 1.2.1), wodurch sie depolarisiert werden. Eine erneute Reizweiterleitung erfordert die Abgabe der aufgenommenen K^+ -Ionen und ihren Rücktransport hin zur Endolymphe. Haarsinneszellen besitzen zwei Typen an K^+ -Kanälen: spannungsabhängige K^+ -Kanäle (KCNQ4) und Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle. Über diese Kanäle werden K^+ -Ionen in die Perilymphe abgegeben, wo sie von den Stützzellen des cortischen Organs über K^+Cl^- -Cotransporter (Kcc3, Kcc4) und über K^+ -Kanäle ($\text{K}_{\text{ir}}4.1$) aufgenommen werden. Die K^+ -Ionen diffundieren über das epitheliale Gap Junction Netzwerk, das sich von den Stützzellen des cortischen Organs über die auf der Basalmembran aufliegenden Epithelzellen bis zu den äußeren Sulcuszellen erstreckt. Dort werden die K^+ -Ionen in den Extrazellularraum abgegeben und von den Typ II und IV Fibrozyten des Spiral ligaments über $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{K}^+$ -Co-Transporter aufgenommen und über das Gap Junction Netzwerk der Bindegewebszellen bis zu den Intermediärzellen der Stria vascularis transportiert. Über Na^+/K^+ -ATPasen, $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{K}^+$ -Co-Transporter und K^+ -Kanäle (mgl. K_{ir} Kanäle) gelangen die K^+ -Ionen in die Marginalzellen der Stria vascularis, die diese schließlich über K^+ -Kanäle (KCNQ1, KCNE1) in die Endolymphe freisetzen. Eine schematische Darstellung des Kalium-Rücktransports ist in Abbildung 1.7 gezeigt.

Ein anderer Weg des K^+ -Rücktransports führt über die Interdentalzellen des Spiral limb. Die von den Haarsinneszellen aufgenommenen K^+ -Ionen diffundieren über ein System von Gap Junction Kanälen in den Extrazellularraum des Spiral limb, wo sie von den

1,4,5-trisphosphat (IP_3), dem eine bedeutende Rolle im Kalium-Rücktransport während des Hörvorgangs zugesprochen wird. Nach ihrer Depolarisation durch den Einstrom von K^+ -Ionen aus der Endolymphe geben Haarsinneszellen die K^+ -Ionen an die Perilymphe ab, aus der die Stützzellen die K^+ -Ionen mittels K^+Cl^- -Cotransporter (Kcc3 , Kcc4) aufnehmen. Die Aktivierung dieser K^+Cl^- -Cotransporter geschieht durch die ATP-abhängige Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen, die durch den Transport des Sekundärbotenstoffs IP_3 durch Gap Junction Kanäle induziert werden (Abb. 1.8) (Bruzzzone und Cohen-Salmon, 2005). Erste Hinweise auf diesen Mechanismus ergeben sich aus einer Zellkulturstudie, in der kopplungs-defiziente HeLa-Zellen mit der Taubheits-assoziierten Cx26 Mutation V84L transfiziert wurden. Die aus Cx26V84L gebildeten Gap Junction Kanäle unterschieden sich in Kopplungsanalysen gegenüber den Wildtyp-Cx26 (wtCx26) Kanälen hinsichtlich ihrer um 90% reduzierten Permeabilität für IP_3 (Beltramello et al., 2005). Durch die gestörte Weiterleitung von IP_3 über Cx26V84L-Gap Junction Kanäle unterbleibt die Ausbreitung der Ca^{2+} -Wellen und damit auch die Aktivierung von K^+Cl^- -Cotransportern, die am Rücktransport der K^+ -Ionen von den Haarsinneszellen über die Stützzellen in die Endolymphe beteiligt sind. Dies könnte zu einer extrazellulären Erhöhung der K^+ -Konzentration führen, welche direkt die Funktion des Glutamattransporters GLAST beeinträchtigt. Dieser Glutamattransporter wird in den Stützzellen des cortischen Organs stark exprimiert und spielt eine Schlüsselrolle in der Entfernung von Glutamat aus dem extrazellulären Medium. Die extrazelluläre Akkumulation von Glutamat führt daraufhin zu einer Inhibierung des Antioxidants Glutathion und somit zum Zelltod durch oxidativen Stress (Cohen-Salmon et al., 2002).

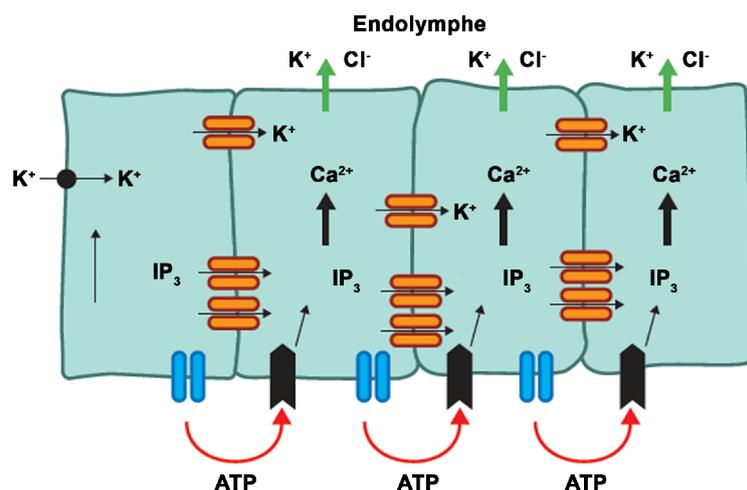


Abb. 1.8: Postulierte Rolle des IP_3 -Transports durch Gap Junction Kanäle während des Hörvorgangs (verändert nach Bruzzzone und Cohen-Salmon, 2005).

Die interzelluläre Weiterleitung von IP_3 durch Gap Junction Kanäle in den Stützzellen des cortischen Organs (orange) ermöglicht die ATP-abhängige (rote Pfeile) Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen (dicke schwarze Pfeile). Dies führt über die Aktivierung von K^+Cl^- -Cotransportern zu einem Ausstrom der K^+ -Ionen (grüne Pfeile) aus den Stützzellen in die Endolymphe. Schwarzer Punkt: K^+Cl^- -Cotransporter. Blau: Connexin-Halbkanäle.

1.2.3 Connexin-defiziente Mauslinien und ihre Bedeutung für das Hören

Cx26 bzw. Cx30 defiziente Mauslinien haben die essentielle Bedeutung dieser beiden Connexine für das Hören verdeutlicht. Aufgrund dessen werden in den nächsten Abschnitten kurz die Phänotypen dieser Mauslinien beschrieben.

1.2.3.1 Die konditionale Cx26-defiziente Mauslinie

Homozygot defiziente Cx26 Mäuse versterben an Tag E11 der embryonalen Entwicklung aufgrund eines Placentadefekts, der zu einer Nährstoffunterversorgung der Embryonen führt (Gabriel et al., 1998; Kibschull et al., 2008). Um die embryonale Letalität zu umgehen, wurde eine konditionale Cx26^{loxP/loxP}-Mauslinie erzeugt, welche die zelltyp-spezifische Deletion erlaubt. Für die Deletion von Cx26 wurden Cx26^{loxP/loxP}-Mäuse mit Otogelin-Cre (Otog-Cre)-Mäusen verpaart (Cohen-Salmon et al., 2002). Diese exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Otogelin-Promotors. Bei Otogelin handelt es sich um ein Glykoprotein, das spezifisch in verschiedenen Zelltypen des Innenohrs exprimiert wird: in den Stützzellen des cortischen Organs, den Epithelzellen und den Zellen des Spiral limb (Cohen-Salmon et al., 1997). Mäuse in denen Cx26 in Otogelin-positiven Zellen (Cx26^{OtogCre}) des Innenohrs deletiert wurde, weisen einen signifikanten progressiven Hörverlust zwischen 30 und 70 dB auf, der mit einem deutlich verringerten endocochlearen Potential und einer erniedrigten K⁺-Konzentration in der Endolymphe assoziiert ist. Bis zum postnatalen Tag 14 (P14) unterscheidet sich die Cochlea der Cx26^{OtogCre}-Mäuse nicht von der der Wildtyp-Kontrolltiere. Mit P14 beginnt die Degradation der inneren Haarsinneszellen und schreitet fort, bis auch die äußeren Haarsinneszellen und die Stützzellen des cortischen Organs betroffen sind (Cohen-Salmon et al., 2002). In Cx26^{-/-}-Mäusen, in denen eine induzierte ubiquitäre Deletion des Connexins in der adulten Maus durch Gebrauch Tamoxifen-induzierbarer Rosa26^{CreERT}-Mäuse erzielt wurde, sind auch die peripheren Nervenfasern und die Neuronen des Spiralganglions betroffen (Sun et al., 2009).

1.2.3.2 Die Cx30 defiziente Mauslinie

Cx30 defiziente Mäuse (Cx30^{-/-}), in denen das *LacZ* Gen anstelle des *Gjb6* Gens unter der Kontrolle des endogenen Cx30-Promotors exprimiert wird, sind lebensfähig und fertil. Der Verlust des Hörvermögens ist mit einer Erhöhung der Hörschwellen um 100 dB sehr viel ausgeprägter als in Cx26^{OtogCre}-Mäusen. Dies spiegelt sich auch im kompletten Verlust des endocochlearen Potentials und der nicht mehr messbaren K⁺-Konzentration in der Endolymphe wieder. Ab Tag P18 konnte die Apoptose der inneren und äußeren Haarsinneszellen beobachtet werden (Teubner et al., 2003). Bemerkenswert ist, dass die Überexpression von Cx26 durch die Verwendung einer BAC^{Cx26}-Maus (BAC, engl. **b**acterial

artificial chromosome) in Cx30^{-/-}-Mäusen zu einer Wiederherstellung des Hörvermögens und des endocochlearen Potentials führt (Ahmad et al., 2007), andersherum ist dies allerdings nicht möglich (Lin et al., 2009).

Die Charakteristika und der Zeit-abhängige Verlauf der zellulären Degeneration wurden in den Cochleae von Cx26^{RosaCreERT}- und Cx30^(-/-)-Mäusen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die zelluläre Degeneration in Cx26^{RosaCreERT}-Mäusen sehr viel schneller geschieht als in Cx30^{-/-}-Mäusen (Sun et al., 2009). Dieser Unterschied deutet auf verschiedene Ursachen der durch Cx26 bzw. Cx30 Defizienz vermittelten Taubheit hin. Die deutlich früher beginnende zelluläre Degeneration in Cx26^{RosaCreERT}-Mäusen lässt vermuten, dass dem Cx26 eine bedeutende Rolle während der postnatalen Reifung des cortischen Organs, vor dem eigentlichen Einsetzen des Hörens an P12, zukommt (Wang et al., 2009).

1.3 Die Epidermis

Als größtes Organ der Säugetiere nimmt die Haut die unterschiedlichsten Funktionen ein. Sie schützt vor mechanischen, thermischen oder chemischen Reizen sowie vor UV-Strahlung und mikrobiologischen Infektionen. Außerdem dient sie als sensorisches Organ, als Wasserbarriere und erlaubt die Regulation der Körpertemperatur sowie die Vitamin D-Synthese. Die Haut ist in drei Schichten unterteilt: die Unterhaut (Subcutis), die aus lockerem Bindegewebe, Fettzellen, Blutgefäßen und Nerven besteht und zudem Mechanosensoren beheimatet, die auf starke Druckreize reagieren. Die Lederhaut (Dermis), deren Bindegewebe durch feine Blutgefäße, Haarwurzeln sowie Schweiß- und Talgdrüsen durchzogen ist und die Oberhaut (Epidermis), die mit der Lederhaut über die Basallamina verbunden ist.

1.3.1 Struktur der Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, sich kontinuierlich selbsterneuerndes, schuppendes Epithel, deren Hauptzellmasse die Keratinozyten ausmachen. Keratinozyten sind in vier Schichten unterteilt: das Stratum basale, das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und das Stratum corneum (Abb. 1.9). Außerdem enthält sie noch Melanozyten, die durch die Produktion von Melanin zum UV-Schutz der Haut beitragen, Langerhans-Zellen sowie dendritische Zellen, die als Antigen-prozessierende bzw. präsentierende Zellen mit T-Zellen interagieren.

Das Stratum basale wird durch eine einzelne Zellschicht proliferierender, nicht-differenzierter Keratinozyten gebildet, die durch an Intermediärfilamente gebundene Hemidesmosomen mit der Basallamina verknüpft sind und so Epidermis und Dermis

miteinander verankern. Untereinander sind die Keratinozyten des Stratum basale über Desmosomen verbunden. Die Keratinozyten des Stratum basale durchlaufen eine asymmetrische mitotische Teilung, bei der eine Tochterzelle in die unterste Schicht des Stratum spinosum migriert, während die zweite im Stratum basale verbleibt und dort die Stammzellpopulation bildet. Zumindest ein Teil der proliferierenden Stammzellpopulation entstammt der so genannten Wölbungsregion (engl. „bulge region“) in der Wurzelscheide der Haarfollikel. Aus dieser Region wandern schnell proliferierende Zellen, so genannte „Transit Amplifying Cells“, in die Epidermis ein und durchlaufen eine bestimmte Anzahl an Teilungszyklen bevor sie dann den Prozess der terminalen Differenzierung beginnen (Potten und Booth, 2002; Morris et al., 2004; Tumber et al., 2004). In der untersten Zellschicht des Stratum spinosums beginnt der terminale Differenzierungsprozess von basal nach apikal. Die Keratinozyten sind nicht mehr teilungsfähig. Abgeschlossen ist der Differenzierungsprozess wenn die Keratinozyten als abgeflachte, kernlose Zellen das Stratum corneum erreichen und schließlich abblättern. Der gesamte Differenzierungsprozess dauert beim Menschen 2-4 Wochen, in der Maus 8-9,5 Tage (Potten et al., 1987).

Die epidermale Differenzierung ist charakterisiert durch eine sich nach und nach verändernde Proteinexpression (Candi et al., 2005; Proksch et al., 2008). In den undifferenzierten Zellen des Stratum basale werden hauptsächlich die Keratine K5 und K14 exprimiert (Abb. 1.9). Diese aggregieren zu Keratin-Intermediärfilamenten und bilden zusammen mit Mikrotubuli (Tubulin) und Mikrofilamenten (Aktin) das Zytoskelett der Keratinozyten. Diese Vernetzung der Keratinozyten trägt maßgeblich zur Festigkeit der Epidermis bei. Im Zuge des beginnenden Differenzierungsprozesses im Stratum spinosum werden zunächst die Keratine K5 und K14 gegen die Keratine K1 und K10 ersetzt (Abb. 1.9), die in den suprabasalen Schichten (Stratum spinosum, Stratum corneum) als Dimere exprimiert werden. Im Stratum granulosum kommt die Expression zweier weiterer Keratine hinzu: K2e und K9 (Candi et al., 2005).

Neben Keratinen besitzen die Keratinozyten des Stratum granulosum das Matrix-Protein Filaggrin. Dieses liegt zunächst als inaktives Profilaggrin in membranlosen Filaggrin-Granula vor und wird während der voranschreitenden Differenzierung zu der aktiven Form Filaggrin prozessiert, die die Keratinfilamente bündelt. Die starke Bündelung der Keratine führt zum Kollabieren der Intermediärfilamente, was die Zellen abgeflacht erscheinen lässt, bis sie im Stratum corneum zu kernlosen Keratinozyten terminal differenzieren. Die durch Filaggrin gebündelten Keratinfilamente tragen maßgeblich zur Ausbildung der epidermalen Permeabilitätsbarriere bei.

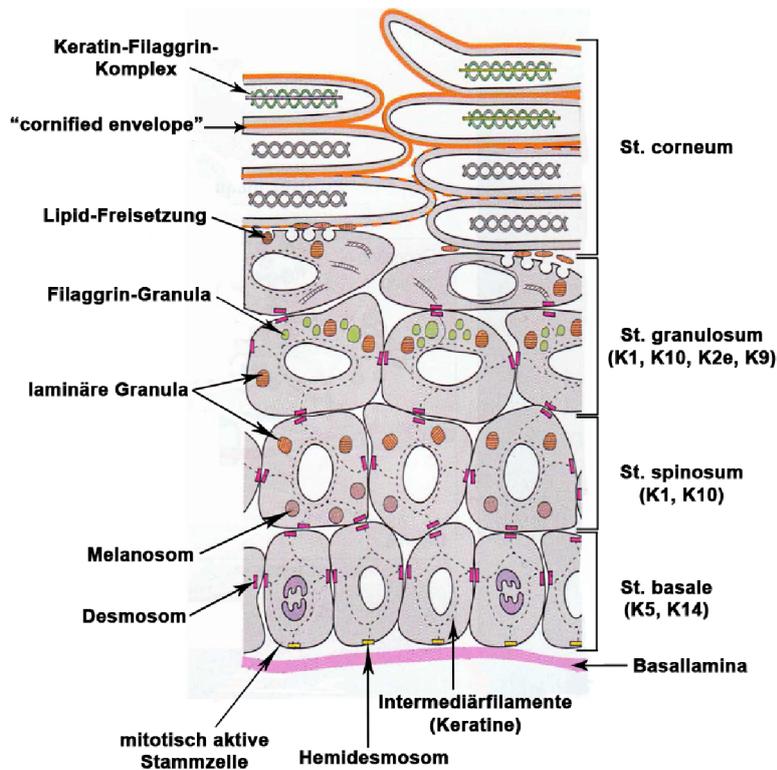


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der Epidermis (verändert nach Kierszenbaum, *Histology and Cell Biology: an Introduction to Pathology*, 1. Auflage, 2002).

Aufgezeigt sind die epidermalen Schichten und die mit der Differenzierung der Keratinozyten einhergehende differentielle Keratinexpression. St.: Stratum.

1.3.2 Die epidermale Permeabilitätsbarriere

Die Haut erhält ihre schützende Funktion durch die Ausbildung einer Permeabilitätsbarriere im Stratum corneum, die sich aus Korneozyten und spezialisierten Lipiden zusammensetzt (Madison, 2003). Korneozyten sind terminal differenzierte Keratinozyten, die kompakte Keratin-Filaggrin-Komplexe ausbilden und von einer Hülle quervernetzter Proteine und Lipide, dem so genannten „cornified envelope“, umgeben sind. Diese hydrophobe Hülle entwickelt sich im Zuge der terminalen Differenzierung aus den Proteinen Involucrin, Loricrin, Envoplakin, Periplakin und kleinen Prolin-reichen Proteinen (SPRPs, engl. small proline-rich proteins), die miteinander durch verschiedene Transglutaminasen (TG1, TG3, TG5) quervernetzt wurden und unmittelbar unterhalb der Plasmamembran liegen (Candi et al., 2005; Proksch et al., 2008). Die Lipidhülle, die die Korneozyten umgibt, setzt sich aus ω -Hydroxy-Ceramiden mit sehr langen Fettsäureketten, freien Fettsäuren, Cholesterol, Cholesterolestern und weiteren Ceramiden zusammen (Elias et al., 2004). Sie ist kovalent an die quervernetzten Proteine gebunden. Durch die Fusion der, in laminären Granula gespeicherten, Lipide mit der Plasmamembran auf der apikalen Seite zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum werden diese in die Extrazellularräume der Korneozyten eingelagert und verstärken so die Wasserbarriere, was einem Austrocknen der Haut entgegenwirkt (Behne et al., 2002).

1.3.3 Connexinexpression in der Epidermis und Funktion

In der Epidermis wurde ein umfangreiches Gap Junction Netzwerk beschrieben, das sich durch eine entwicklungspezifische und differentiell regulierte überlappende Expression verschiedener Connexine auszeichnet. Bis heute wurde in der Maus-Epidermis die Expression von neun Connexinen beschrieben (Abb. 1.10): Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx37, Cx40, Cx43 und Cx45 (Kretz et al., 2004; Aasen und Kelsell, 2008). In der gesunden Epidermis einer adulten Maus wurden die Connexine Cx43 und Cx40 sowie eine geringe Expression von Cx31 im Stratum basale nachgewiesen. Verglichen mit den suprabasalen Schichten Stratum spinosum und Stratum granulosum ist die Connexin Expression im Stratum basale sehr gering. Das Stratum spinosum zeichnet sich durch eine Expression der Connexine Cx43, Cx37 und Cx31 aus. Auf Transkriptebene konnte außerdem die Expression der Connexine Cx31.1 und Cx30.3 in den suprabasalen Schichten gezeigt werden. Das Stratum granulosum zeigt die Expression der Connexine Cx37, Cx31, Cx30.3 und in geringen Mengen Cx30 und Cx26. Cx45 wurde in der adulten Haut nicht gefunden, jedoch konnte die Expression dieses Connexins an Tag E19 der Embryonalentwicklung im Stratum basale nachgewiesen werden (Butterweck et al., 1994). Die kernlosen Korneozyten des Stratum corneum sind nicht über das Gap Junction Netzwerk verbunden (Aasen und Kelsell, 2008).

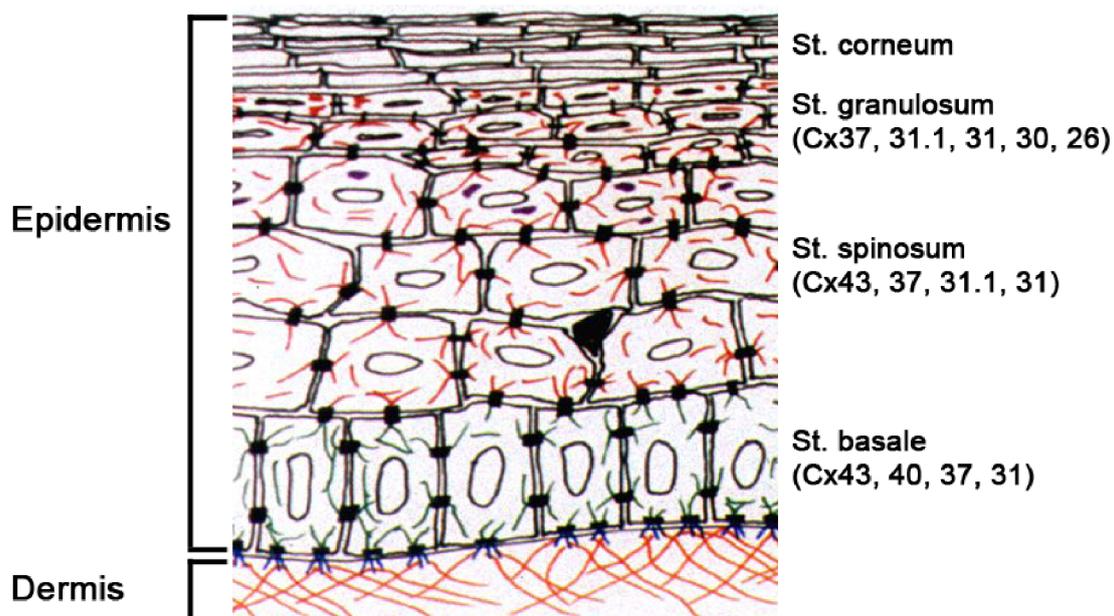


Abb. 1.10: Schematischer Querschnitt durch die adulte Maus-Epidermis (verändert nach Kretz et al., 2004). Dargestellt ist das Expressionsmuster der Connexine in der adulten, unverletzten Maus-Epidermis. St.: Stratum.

Im Menschen unterscheidet sich die Connexinexpression in einigen Punkten von der in der Maus (Aasen und Kelsell, 2008). Zusätzlich zu den schon erwähnten Connexinen wird Cx32 im Stratum basale exprimiert. Cx45 wurde in der adulten menschlichen Epidermis in den

suprabasalen Schichten nachgewiesen. Cx43 wird im Menschen hauptsächlich suprabasal und nur in geringen Mengen basal exprimiert, während die Expression der Connexine Cx26 und Cx30 in geringem Maße basal und in Haarfollikeln gefunden wurde. Letztere werden vor allem stark in der Epidermis der Fußsohlen und Handflächen exprimiert (Di et al., 2001a; Di et al., 2001b).

1.3.3.1 Connexinexpression während der Wundheilung

Die Prozesse der Wundheilung umfassen die Proliferation undifferenzierter Keratinozyten, ihre Migration zum Wundbereich, den Verschluss der Wunde unterhalb des Wundpfropfes, der sich nach der Verwundung aus nekrotischem Gewebe bildet, die Differenzierung der Keratinozyten und schließlich die Abstoßung des Wundpfropfes (Coulombe, 2003). Die Gesamtdauer dieser Prozesse in der Maus beträgt fünf Tage (Kretz et al., 2003). Im Zuge der Wundheilung verändert sich die Connexinexpression sehr stark, während die Connexine Cx26 und Cx30 in allen Schichten hochreguliert werden und ihr Expressionsmaximum an Tag drei der Wundheilung erreichen, um dann auf ihr Ausgangsexpressionsniveau zurückzufallen, werden die Cx43 und Cx31 herunterreguliert (Kretz et al., 2003). In Cx43 defizienten Mäusen (Cx43^{CreER(T)/flox}) konnte sogar eine beschleunigte Wundheilung nachgewiesen werden (Kretz et al., 2004), die möglicherweise als Folge der nicht mehr vorhandenen Kopplung der Keratinozyten im Stratum basale eine beschleunigte Proliferation und Migration in den Wundbereich nach sich zieht.

1.4 Mutationen in Connexingenen als Ursache humaner Erkrankungen

Die Grundlage einer Vielzahl menschlicher Erkrankungen liegt in defekten Connexingenen. Um die Funktion der betroffenen Gene zu ergründen, wurden Connexin-defiziente Mäuse erzeugt und charakterisiert. Eine tabellarische Gegenüberstellung der durch Connexinmutationen verursachten humanen Erkrankungen und den Phänotypen der entsprechenden Connexin-defizienten Mäuse (Tab. 1.1) wurde von Dobrowolski und Willecke (2009) zusammengestellt. Die gesamte Deletion eines Gens spiegelt jedoch nur bedingt die Situation im Menschen wieder, denn oftmals ist nicht das Fehlen des betroffenen Proteins die Ursache, sondern die durch Mutationen (Punktmutationen, Deletionen einzelner Aminosäuren) veränderten Eigenschaften eines Gap Junction Kanals. So ist in den letzten Jahren zunehmend das Einbringen humaner Mutationen in das orthologe Mausgen in den Vordergrund gerückt. Unter Abschnitt 1.4.1 werden die durch Cx26 und Cx30 verursachten humanen Erkrankungen eingehender beschrieben.

humanes Connexin	Erkrankung	murines Connexin	Phänotyp der Connexin-defizienter Mäuse
GJA1 (Cx43)	Oculodentodigitale Dysplasie (ODDD)	Gja1 (Cx43)	Herzfehlbildungen, postnatale Letalität
GJA3 (Cx46)	Zonular pulverulenter Katarakt-3 (CZP3)	Gja3 (Cx46)	Zonulärer nukleärer Katarakt
GJA4 (Cx37)	Predisposition für Arteriosklerose	Gja4 (Cx37)	Weibliche Sterilität
GJA5 (Cx40)	Idiopathisches Vorhofflimmern	Gja5 (Cx40)	Atriale Arrhythmien
GJA8 (Cx50)	Zonular pulverulenter Katarakt-1 (CZP1)	Gja8 (Cx50)	Microphthalmie, kongenitaler Katarakt
GJB1 (Cx32)	X-chromosomale Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMTX)	Gjb1 (Cx32)	progressive Neuropathie, erniedrigter Glycogen Abbau, erhöhte Leberkarzinogenese
GJB2 (Cx26)	neurosensorische Taubheit, Palmoplantare Hyperkeratose (PPK), Keratitis-Ichthyosis-Taubheits-Syndrom, Vohwinkel Syndrom, Bart-Pumphrey Syndrom	Gjb2 (Cx26)	Embryonale Letalität
GJB3 (Cx31)	Nicht-syndromische Taubheit, Erythrokeratoderma variabilis (EKV)	Gjb3 (Cx31)	Transiente plazentale Fehlbildung
GJB4 (Cx30.3)	Erythrokeratoderma variabilis (EKV)	Gjb4 (Cx30.3)	Beeinträchtigte Wahrnehmung von Vanilleduft
GJB6 (Cx30)	Nicht-syndromische Taubheit, hidrotische ektodermale Dysplasie (Clouston Syndrom)	Gjb6 (Cx30)	Gehörbeeinträchtigung
GJC2 (Cx47)	Pelizaeus-Merzbacher-ähnliche Erkrankung	Gjc2 (Cx47)	Sporadische Vakuolisierung von Nervenfasern
GJD2 (Cx36)	Prädisposition für juvenile myoklonische Epilepsie	Gjd2 (Cx36)	Nachtblindheit

Tab. 1.1: Gegenüberstellung der mit Connexin-Defekten assoziierten Erkrankungen und der in Connexin-defizienten Mäusen beobachteten Phänotypen (verändert nach Dobrowolski und Willecke, 2009).

1.4.1 Connexinmutationen, die im Menschen zu nicht-syndromischer und syndromischer Taubheit führen

6-8% der Bevölkerung leiden an Hördefekten, die von einer geringgradigen Schwerhörigkeit bis hin zu einer absoluten Taubheit reichen können. Die Ursachen für diese Erkrankungen sind vielschichtig und treten nicht immer isoliert auf. Dazu zählen Umweltfaktoren wie zum Beispiel Lärm oder Infektionen, aber auch genetische Defekte (z. B. DFNB1, DFNA3) (Schrijver, 2004), zu denen auch Mutationen in den Connexingenen *GJB1* (Cx32), *GJB2* (Cx26), *GJB3* (Cx31), *GJB6* (Cx30) und *GJA1* (Cx43) gehören (Martinez et al., 2009). In 30% der

durch Connexin vermittelten Hördefekte sind diese mit weiteren Erkrankungen assoziiert (syndromische Taubheit). Eine Übersicht über die humanen Erkrankungen, die durch Mutationen in den Connexinen Cx26 und Cx30 ausgeprägt werden, ist in Tabelle 1.2 dargestellt.

Mutation	Erkrankung
Cx26(35delG) Cx26M34T Cx26V84L Cx30T5M	Nicht-syndromische Taubheit (DFNB1, DFNA3)
Cx26ΔE42 Cx26R75W	Palmoplantare Hyperkeratose (PPK)
Cx26D66H	Vohwinkel Syndrom
Cx26N54K	Bart-Pumphrey Syndrom
Cx26G12R Cx26S17F Cx26D50N	Keratitis-Ichthyosis-Taubheits-Syndrom
Cx30G11R Cx30V37E Cx30A88V	Hidrotische ektodermale Dysplasie (HED, Clouston-Syndrom)

Tab. 1.2: Beispiele für Cx26 und Cx30 Mutationen, die im Menschen zu Erkrankungen des Gehörs und der Haut führen (Rabionet et al., 2002; Richard et al., 2004; Richard, 2005; Mese et al., 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Fokus auf die durch die Mutationen Cx30T5M (nicht-syndromische Taubheit), Cx30 A88V (Hidrotische ektodermale Dysplasie) und Cx26S17F (Keratitis-Ichthyosis-Taubheits-Syndrom (KID) vermittelten Erkrankungen gelegt.

1.4.1.1 Nicht-syndromische Taubheit (Cx30T5M)

Hördefekte sind zu 70% nicht-syndromischer Natur (Schrijver, 2004). Das bedeutet, dass sie nicht von weiteren Symptomen, wie beispielweise palmoplantarer Hyperkeratose begleitet werden. In mehr als 50% der Fälle wurden in den betroffenen Patienten Mutationen in den Connexingenen *GJB2* und *GJB6* gefunden. Nicht-syndromische Taubheit ist meist neurosensorisch und kann in vier Gruppen zusammengefasst werden: DFNA (autosomal-dominante Taubheit, 15-20%), DFNB (autosomal rezessive Taubheit, 80%), DFN (X-chromosomale Taubheit, 1%) und mitochondriale Taubheit (<1%). Die autosomal-dominante Form der neurosensorischen Taubheit (SNHL) tritt häufig nach Erlernen der Sprache (postlingual) auf und verläuft dann progressiv, während rezessive neurosensorische Taubheit vor dem Erlernen des Sprechens (prälingual) auftritt.

Erstmals wurde die Cx30 Mutation T5M 1999 im Zusammenhang mit nicht-syndromischer Taubheit (autosomale-dominante SNHL, DFNA3) beschrieben (Grifa et al., 1999). Sie resultiert in einem Austausch der hydrophilen Aminosäure Threonin gegen die schwefelhaltige Aminosäure Methionin an Position 5 des Cx30 Proteins (Abb. 1.11). In *Xenopus laevis* Oozyten führt die Expression der Cx30T5M Mutation, im Gegensatz zu Wildtyp-Cx30 (wtCx30) exprimierenden Oozyten, zu einem Verlust der elektrophysiologischen Kopplung. Ein dominant-negativer Effekt der Mutation auf das wtCx30-Protein wurde in Cx30T5M/wtCx30 koexprimierenden Oozyten beobachtet, in denen eine elektrophysiologische Kopplung nicht mehr nachweisbar war (Grifa et al., 1999). In Zellkulturstudien mit kopplungs-defizienten HeLa-Zellen und HEK293-Zellen (eng. „human embryonic kidney cells“), die sowohl mit der mutierten als auch mit der Wildtyp-Isoform des Connexins transfiziert wurden, wurde der Transport der Connexinproteine zur Zellmembran und die Ausbildung von Gap Junction Plaques beobachtet (Common et al., 2002; Zhang et al., 2005). Ein Verlust der elektrophysiologischen Kopplung, ähnlich dem in *Xenopus laevis* Oozyten, wurde in HEK293-Zellen, die die Mutation Cx30T5M exprimieren, nicht nachgewiesen (Zhang et al., 2005). Die Funktionalität der Gap Junction Kanäle konnte in Kopplungsanalysen mit Neurobiotin, Propidiumiodid und IP₃ jedoch nicht bestätigt werden (Common et al., 2002; Zhang et al., 2005). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Mutation zu einem Defekt in der biochemischen Kopplung führt, die elektrophysiologische Kopplung aber nicht betroffen ist.

1.4.1.2 Hidrotische ektodermale Dysplasie (Cx30A88V)

Die hidrotische ektodermale Dysplasie (HED), auch Clouston Syndrom genannt, ist eine sehr seltene autosomal-dominante Hauterkrankung, die aufgrund eines starken Gründereffekts vermehrt in der frankokanadischen Bevölkerung auftritt und durch Mutationen im Gen *GJB6* (Cx30) verursacht wird (Lamartine et al., 2000). HED ist charakterisiert durch starke Hornhautverdickungen der Handinnenflächen und Fußsohlen (palmoplantare Keratoderma), Haarausfall (Alopecia) und spärliche Behaarung (Hypotrichose) sowie Nageldystrophien. In einigen seltenen Fällen wurde die Erkrankung auch mit Hördefekten assoziiert. Die Mutationen, die mit HED in Verbindung gebracht wurden, sind Cx30A88V, Cx30G11R und Cx30V37E. Im Fokus dieser Arbeit liegt die Mutation Cx30A88V.

Die Cx30A88V Mutation ist in der zweiten Transmembrandomäne des Cx30 Proteins lokalisiert und führt zu einem Austausch der Aminosäure Alanin durch die Aminosäure Valin an Position 88 (Abb. 1.11). In histologischen Studien der Epidermis betroffener Patienten wurde eine ähnliche Lokalisation des mutierten Cx30A88V Proteins wie die des wtCx30 Proteins in der Plasmamembran gezeigt. Die Ausbildung zytoplasmatischer Aggregate wurde

in Keratinozyten nicht nachgewiesen (Essenfelder et al., 2004). In transfizierten kopplungsdefizienten HeLa-Zellen, die nur die mutierte Form des Cx30 Proteins exprimierten, wurde eine überwiegende zytoplasmatische Lokalisation beobachtet (Common et al., 2002). Wurden die Zellen jedoch mit Cx30A88V und wtCx30 kotransfiziert, konnte neben einer Lokalisation im Zytoplasma auch die in der Zellmembran gezeigt werden (Essenfelder et al., 2004). Die Cx30A88V/wtCx30 koexprimierenden Zellen wiesen einen leicht reduzierten Transfer von Neurobiotin im Vergleich zu wtCx30 exprimierenden Zellen auf (Essenfelder et al., 2004). Zudem wurde die erhöhte Freisetzung von ATP beobachtet. Untersuchungen mit *Xenopus laevis* Oozyten, die mit Cx30A88V kodierender RNS injiziert wurden, zeigten neben einer funktionellen elektrophysiologischen Kopplung auch die vermehrte Ausbildung von Halbkanälen (Essenfelder et al., 2004).

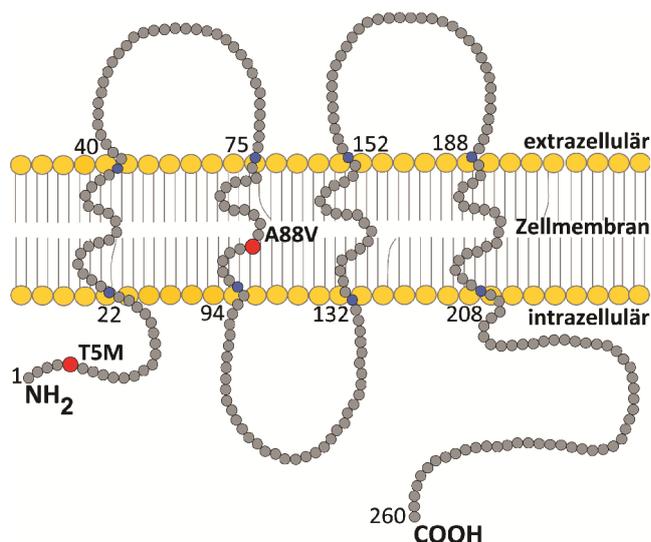


Abb. 1.11: Lokalisation der Cx30 Mutation Cx30T5M und Cx30A88V.

Die Cx30T5M Mutation ist im N-Terminus des Cx30 Proteins, die Cx30A88V Mutation in der zweiten Transmembrandomäne lokalisiert.

1.4.1.3 Keratitis-Ichthyosis-Taubheits Syndrom (Cx26S17F)

Das Keratitis-Ichthyosis-Taubheits-Syndrom (engl. „Keratitis-Ichthyosis-Deafness syndrome“, KID) gehört zu einer sehr heterogenen Gruppe von Verhornungsstörungen, die unter dem Begriff „Keratoderma“ zusammengefasst werden. KID zeichnet sich aus durch prälinguale neurosensorische Taubheit, palmoplantare Hyperkeratosen, einer Verdickung aller epidermalen Schichten (Acanthose), chronische Entzündungen der Cornea (Keratitis) sowie der Bildung von Lymph- und Blutgefäßen in der sonst gefäßfreien Cornea (Neovaskularisierung), die im schlimmsten Fall auch zur Erblindung des Patienten führen können. Begleitet wird KID zudem von Nageldystrophien, Haarausfall (Alopecia), spärlicher Behaarung (Hypotrichose) und einem erhöhten Risiko für das frühe Auftreten von Plattenepithelkarzinomen (Richard et al., 2002). Die autosomale-dominante Erkrankung KID wird von einer ganzen Reihe von Mutationen im Gen *GJB2* (Cx26) verursacht. Dazu gehört auch die N-terminal lokalisierte Mutation Cx26S17F (Abb. 1.12).

Bei dieser Mutation wird an Position 17 die hydrophile Aminosäure Serin gegen die hydrophobe Aminosäure Phenylalanin ausgetauscht. Die Mutation Cx26S17F zeigte in transfizierten HeLa-Zellen eine Lokalisation in der Plasmamembran und die Ausbildung von Gap Junction Plaques, die sich jedoch durch Farbstofftransfer-Analysen mit Carboxyfluorescein als nicht funktionell herausstellten (Richard et al., 2002). Analysen in *Xenopus laevis* Oozyten unterstützen dieses Ergebnis. Hier zeigten Cx26S17F-exprimierende Oozyten einen Verlust der elektrophysiologischen Kopplung und Halbkanalaktivität. Wohingegen Oozyten, die eine der anderen untersuchten KID assoziierten Mutationen (G12R, N14K, D50N) exprimierten, eine stark erhöhte Halbkanalaktivität aufwiesen (Lee et al., 2009).

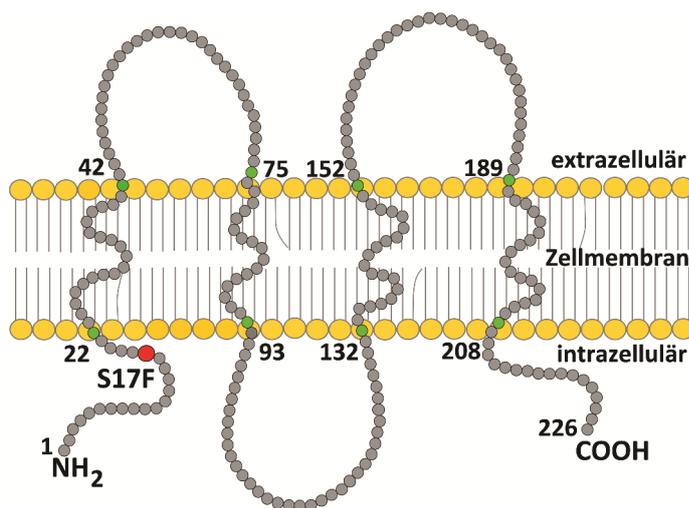


Abb. 1.12: Lokalisation der Cx26S17F Mutation im N-Terminus des Cx26 Protein.

1.5 Transgene Mäuse und Reportergene

Um die Funktion eines Gens *in vivo* zu untersuchen, eignet sich die Maus aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum Menschen bezüglich der Lage der Gene, der Anatomie, der Entwicklung und den Stoffwechselprozessen. Auch die rasche Generationsfolge und einfache Handhabung sprechen für ihre Verwendung als Modellorganismus. So kann in transgenen Mäusen die kodierende Region eines Gens entfernt oder durch ein anderes Gen ersetzt werden (Shashikant und Ruddle, 2003). Die dazu notwendigen Techniken wie die Blastozysteninjektion homolog rekombinierter embryonaler Stammzellen und die Vorkerninjektion zur Erzeugung transgener Mäuse sind gut etabliert. Die während dieser Arbeit verwendeten und erzeugten Mauslinien wurden mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen erzeugt. Aus diesem Grund folgt eine kurze Einführung in diese Technik.

1.5.1 Erzeugung genetisch veränderter Mäuse durch homologe Rekombination

Durch die Blastozysteninjektion wird die gezielte Deletion eines Gens („Knock-out“) bzw. das gezielte Einbringen von Gensequenzveränderungen („Knock-in“) in das Genom einer Maus ermöglicht. Dazu notwendig ist das Einbringen eines Austauschvektors in embryonale Stammzellen der Maus (ES-Zellen), der die veränderte Gensequenz mit flankierenden homologen Regionen und eine Selektionskassette, z. B. die für Neomycin kodierende DNA, enthält (Nagy et al., 2003). Durch die Rekombination der flankierenden Regionen mit den endogenen Homologieregionen der Zielsequenz kommt es zur Insertion der veränderten Gensequenz in das ES-Zell Genom. Die relativ niedrige Rekombinationsfrequenz ($1:10^6$ bis $1:10^7$) erfordert die Anreicherung und Selektion der transfizierten ES-Zellen durch Verwendung eines geeigneten Antibiotikums (z. B. G418 (Neomycin)). Durch spezifische PCR- und Southern Blot Analysen kann die Integration des Austauschvektors in das ES-Zellgenom überprüft werden. Die so selektionierten totipotenten ES-Zellen (Evans und Kaufman, 1981) werden nach klonaler Expansion in Blastozyten injiziert und anschließend in scheinchwangere Mäuse eingebracht. Die daraus hervorgehenden Chimären werden zum Aufbau der entsprechenden Mauslinie verwendet.

1.5.2 Das Cre-loxP/ Flp-frt System zur gezielten Gen-Deletion

Die ubiquitäre Deletion bzw. die Expression eines veränderten Gens kann in transgenen Mäusen zu embryonaler Letalität führen. Um dies zu umgehen und die Charakterisierung adulter Tiere zu gewährleisten, kann zur Erzeugung transgener Mäuse eine konditionale Strategie gewählt werden, die die zelltypspezifische und zeitlich gesteuerte (induzierbare Cre-Mauslinien) Deletion des Zielgens erlaubt. Für die gezielte Deletion eines Gens stehen zwei Systeme zur Verfügung, die auf dem gleichen Prinzip beruhen: das Cre-loxP und das Flp-frt System (Abb. 1.13). Die Zielsequenz wird von 34 bp langen Nukleotidsequenzen flankiert, die loxP- (engl. „locus of X-crossing over P1) bzw. frt-Stellen (engl. „Flp recombinase recombination target“), die als Erkennungssequenzen für die entsprechenden Rekombinasen (Cre- bzw. Flp-Rekombinase) fungieren. Die Erkennungssequenzen setzen sich aus einer 8 bp langen Kernsequenz (engl. „core sequence“) und zwei 13 bp langen invertierten Sequenzwiederholungen zusammen, welche die Kernsequenz umgeben. Diese bestimmt die Orientierung der loxP- bzw. frt-Stellen (Lewandoski, 2001). Liegen die Erkennungssequenzen in gleicher Orientierung vor, führt die Cre- bzw. Flp-vermittelte Rekombination zur Deletion der flankierten Zielsequenz. Bei entgegengerichteter Orientierung kommt es nach erfolgter Rekombination zu einer Inversion der flankierten DNS-Sequenz (Abb. 1.13) (Nagy, 2000). Die Cre-Rekombinase wurde aus dem Bakteriophagen P1 isoliert (Hoess und Abremski, 1984),

während die FIp-Rekombinase der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entstammt (McLeod et al., 1986). In den letzten Jahren wurden zahlreiche Mauslinien erzeugt, in denen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle verschiedener zelltyp-spezifischer Promotoren exprimiert wird. Eine Übersicht der Cre-exprimierenden Mauslinien kann unter http://nagy.mshri.on.ca/cre_new/index.php eingesehen werden.

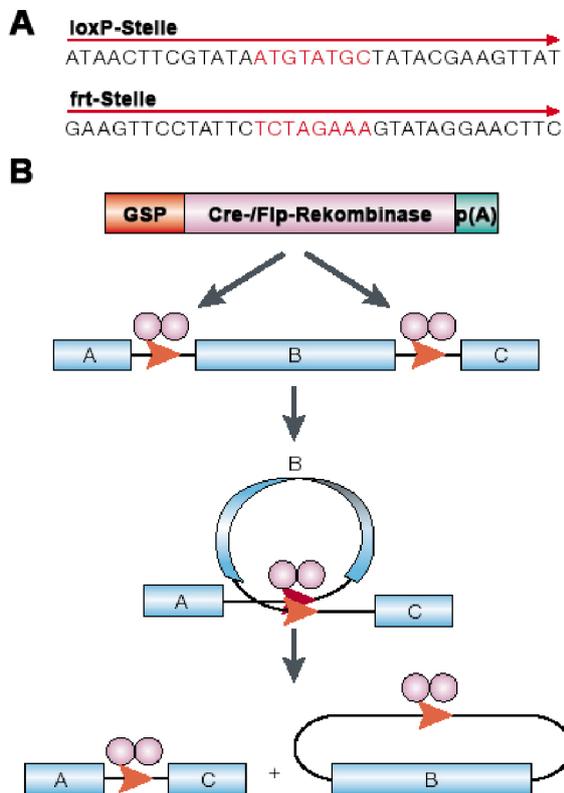


Abb. 1.13: Das Cre/loxP- bzw. FIp/frt-System (verändert nach Lewandoski, 2001).

(A) Die 34 bp langen DNS-Sequenzen der loxP- bzw. frt-Stellen tragen 13 bp lange, invertierte zueinander komplementäre Sequenzwiederholungen, die eine 8 bp lange Kernsequenz (in rot dargestellt) flankieren. (B) Durch Bindung von Dimeren der Cre- oder FIp-Rekombinase an ihre Erkennungsstellen wird die, von gleichgerichteten loxP- oder frt-Stellen flankierte, Zielgenesequenz als zirkuläre Struktur aus der genomischen DNS ausgeschnitten und von der Zelle abgebaut.

1.5.3 Reporterproteine

Reporterproteine wie das „enhanced green fluorescent protein (eGFP), das durch die Anregung von Licht der Wellenlänge 475 nm grün fluoresziert, oder das für die β -Galaktosidase kodierende *LacZ*-Gen werden verwendet, um die Expression eines Gens zu untersuchen. Bei dem indirekten Nachweis der Gen-Expression durch das Reporter-gen *LacZ* handelt es sich um eine enzymatische Reaktion, bei der die β -Galaktosidase den Umsatz des Substrats X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galaktosid) in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo katalysiert. Hierbei steht das Reporterprotein unter der Kontrolle des Promoters des zu untersuchenden Gens. Durch Anhängen der Reporter-genesequenz an die kodierende Sequenz des zu analysierenden Gens entstehen Fusionsproteine. Eine andere Möglichkeit der gleichzeitigen Expression von Zielprotein und Reporterprotein stellt die Verwendung von internen ribosomalen Eintrittsstellen (IRES) dar, welche erstmals aus Picorna-Viren isoliert wurden. Eine IRES-Sequenz bietet den Vorteil, dass eine bicistronische mRNA gebildet wird, die die unabhängige Translation des Zielgens und des Reportergens

ermöglicht. Ein Einfluss des Reporterproteins auf die Faltung oder Funktion des Zielproteins, wie sie bei einem Fusionsprotein möglich wäre, kann so umgangen werden. Durch das Einfügen eines Kernlokalisierungssignals (NLS, engl. **N**uclear **L**ocalization **S**ignal) vor das Reporterprotein erfolgt nach der Translation dessen Transport in den Zellkern.

1.6 Zielsetzung

Mutationen in den Genen *GJB2* und *GJB6* führen im Menschen zu Hördefekten, die in einigen Fällen mit Hauterkrankungen assoziiert sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die humanen Mutationen Cx30T5M, Cx30A88V und Cx26S17F in der Maus analysiert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die, während der vorangegangenen Diplomarbeit, begonnene Klonierung des nicht-konditionalen Austauschvektors „Cx30T5M“ fertiggestellt werden. Dieser sollte anschließend zur Erzeugung einer Cx30T5M-Mauslinie durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen verwendet werden. Da die Mutation im Menschen zu nicht-syndromischer Taubheit führt, sollte im Zuge dieser Arbeit der Fokus auf die Charakterisierung des Gehörs durch histologische Färbungen, Immunfluoreszenz- und quantitative Immunoblotanalysen (Cx26, Cx30) gelegt werden. Weiterführend sollte die Funktion des Gehörs der Cx30T5M-Mäuse durch Messungen der Hörschwellen sowie des endocochlearen Potentials überprüft werden. Kopplungsanalysen organotypischer Cochlea Kulturen sollten darüber hinaus Aufschluss über die biochemische Permeabilität der Cx30T5M Gap Junction Kanäle geben.

Zur *in vivo* Charakterisierung der mit dem Clouston Syndrom assoziierten Mutation Cx30A88V sollte ein konditionaler Austauschvektor kloniert werden, der die Erzeugung einer konditionalen Cx30A88V-Mauslinie durch homologe Rekombination erlaubt. Nach Etablierung der Mauslinie sollte diese zur Aufklärung des, der Erkrankung, zugrundeliegenden Mechanismus beitragen.

Die Cx26S17F-Mauslinie (Dr. T. Auth, I. Körber, Diplomarbeit 2008) wurde als Modell für das Keratitis-Ichthyosis-Taubheits-Syndrom erzeugt und sollte aufgrund dessen hinsichtlich eines möglichen Haut- und Gehörphänotyps charakterisiert werden. Der Hautphänotyp sollte durch histologische Färbungen und Immunfluoreszenzanalysen verschiedener Connexine (Cx26, Cx30, Cx43) und Markerproteine (K1, K5, Filaggrin) eingehender untersucht werden. Zudem sollten Toluidinblau-Färbungen Aussagen über die Funktionalität der epidermalen Permeabilitätsbarriere neugeborener Cx26^{+S17F}-Mäuse geben. In der Cochlea sollte der Einfluss der Cx26S17F Mutation auf wtCx26 und wtCx30 durch Immunfluoreszenzanalysen überprüft werden. Das Hörvermögen sollte durch Messungen der Hörschwellen und des endocochlearen Potentials analysiert werden.

Neben der Charakterisierung der Punktmutationen in der Maus sollte untersucht werden, ob Cx32 Cx26 im Innenohr funktionell ersetzen kann. Dazu sollte die konditionale Mauslinie Cx26floxLacZ[Cx32] mit Otog-Cre-Mäusen verpaart werden. Nach Otog-Cre Aktivität exprimieren die Mäuse das Reporterogen *LacZ* bzw. Cx32 unter dem endogenen Cx26-Promoter. Die Expression des Cx32 sollte durch LacZ-Färbungen, Immunfluoreszenzanalysen und das Hörvermögen durch Messungen der Hörschwellen charakterisiert werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

In Analysequalität wurden die aufgeführten Chemikalien – sofern nicht anders vermerkt – von den Firmen DifCo, Gibco BRL, Invitrogen, Merck, Fluka, Roth, Serva und Sigma bezogen. Enzyme und Nukleotide lieferten die Firmen New England BioLabs, Roche, MWG-Biotech und Promega. Nitrozellulosemembranen wurden bei Amersham Biosciences bestellt und Radiochemikalien wurden von den Firmen Amersham Biosciences und Hartmann Analytic unter Berücksichtigung des Kalibrierungsdatums und der Halbwertszeit des jeweiligen Isotops verwendet.

2.2 Stammlösungen, Puffer und Medien

Die verwendeten Lösungen, Puffer und Medien werden, soweit nicht anders vermerkt, in doppelt destilliertem Wasser (A. bidest) gelöst und bei RT gelagert. Die Einstellung des pH-Werts erfolgt unter Verwendung von 10 N NaOH bzw. 1 N HCl.

2.2.1 Allgemeine Lösungen

PBS	133 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2 20 min autoklavieren.
------------	---

2.2.2 Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.2.1 Lösungen zur Präparation genomischer DNS und Gesamt-RNS

DEPC-Wasser	1l A. bidest mit 0,2% (v/v) Diethylpyrocarbonat versetzen und 12-24 h rühren lassen, 1 h autoklavieren.
dNTP-Mix (40 mM)	je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP 0,6 Vol. TE-Puffer (pH 8,0) bei -20° lagern.
ES-Zell-Lysispuffer	50 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 100 mM EDTA

	0,5% (w/v) SDS 2 mM CaCl ₂ pH 8,0; vor Gebrauch sterilfiltrieren, Zugabe von 50 µl Proteinase K-Stammlsg. und 100 µl RNase 2000 pro ml.
Laird-Puffer	100 mM Tris-HCl 200 mM NaCl 5 mM EDTA 0,2% (w/v) SDS vor Gebrauch Zugabe von 10 µl/ml.
Proteinase K-Stammlösung	20 mg/ml Proteinase K bei -20°C lagern.
RNase 2000	20 mg RNase A (Roche) 20000 U RNase T1 (Roche) ad 10 ml A. bidest, 15 min bei 100°C inkubieren, nach dem Abkühlen Lagerung bei -20°C.
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0; 20 min autoklavieren.

2.2.2.2 Lösungen zur Präparation von Plasmid-DNS

Alkalilösung I	50 mM Glukose 25 mM Tris 10 mM EDTA 1 µl/ml RNase 2000 kurz vor der Verwendung hinzugeben.
Alkalilösung II	0,2 M NaOH 1% SDS-Lösung (10% ige Stammlsg.)
Alkalilösung III	3 M Kaliumacetat 5 M Eisessig

2.2.2.3 Lösungen zur Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

DNS-Ladepuffer (6 x)	0,25% (v/v) Bromphenolblau 0,25% (v/v) Xylencyanol 30% (v/v) Glyzerol
TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris

	0,5 M Essigsäure 50 mM EDTA pH 8,0; ad 1l A. bidest.
TBE-Puffer (10 x)	1 M Tris 0,83 M Borsäure 10 mM EDTA pH 8,3

2.2.2.4 Lösungen zur Southern Blot Analyse

Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Depurinierungslösung	0,25 M HCl
Glaswolle (silikonisiert)	Silikonisierer 1:60 in a. bidest verdünnen, Glaswolle darin eintauchen und 1 h autoklavieren.
Sephadex G50	30 g Sephadex G50 (Pharmacia) 300 ml TE-Puffer ün in TE-Puffer bei RT quellen lassen, überschüssigen TE-Puffer durch Frischen ersetzen, 20 min autoklavieren.
SSC (20 x)	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ Citrat pH 7,0; ad 1l A. bidest.

2.2.3 Lösungen für die Proteinanalytik

2.2.3.1 Lösungen für die Immunoblotanalyse

Ammoniumpersulfat-Stammlösung (10%)	0,1 g Ammoniumpersulfat (APS) in 1 ml A. bidest
WB-Blockierungslösung	5% Magermilchpulver (Sucofin) in Waschblotpuffer
CompleteTM-Stammlösung (25x)	1 Tablette Complete TM (Roche) in 2 ml A. bidest lösen, bei -20°C lagern.
Coomassie Brilliant BlueTM-Färbelösung	0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 10% (v/v) Essigsäure 50% Methanol Lösung durch Faltenfilter filtrieren, lichtgeschützt bei RT lagern.

Coomassie-Entfärber	10% (v/v) Essigsäure 30% (v/v) Methanol
Elektrophoresepuffer (10 x)	0,25 M Tris-Base 1,92 M Glyzin 1% (w/v) SDS pH 8,3
Ponceau-Färbelösung	0,2% (w/v) Ponceau S 1% (v/v) Essigsäure lichtgeschützt bei RT lagern.
Sammelgelpuffer (4 x)	0,5 M Tris-HCl 0,4% (w/v) SDS pH 6,8
SDS-Probenpuffer (4 x) („Laemmli-Puffer“)	250 mM Tris-HCl 12% (w/v) SDS 40% (v/v) Glycerin 0,04% (w/v) Bromphenolblau 20% (v/v) 2-Mercaptoethanol pH 6,8
Transferpuffer (5 x)	50 mM Tris-HCl 100 mM Tris-Base 800 mM Glyzin pH 8,3
Transferpuffer (1 x)	200 ml Transferpuffer (5x) 200 ml Methanol ad 1 l A. bidest.
Trenngelpuffer (4 x)	1,5 M Tris-HCl 0,4% (w/v) SDS pH 8,8; Lagerung bei 4°C.
Waschblotpuffer (1 x)	8,5 mM Tris-HCl 1,7 mM Tris-Base 50 mM NaCl 0,1% Tween20 (Stammlsg. 50%)

2.2.3.2 Lösungen für die Immunfluoreszenzanalyse

IF-Blockierungslösung I	5% (w/v) BSA 0,1% Triton X-100 in PBS ⁻ .
IF-Blockierungslösung II	4% (w/v) BSA 1% (w/v) NGS 0,1% Triton X-100 in PBS ⁻ .
IF-Blockierungslösung III	5% NGS 0,1% Triton X-100 in PBS ⁻ .

2.2.4 Lösungen und Medien für die Kultivierung von Bakterien

Die hier aufgeführten Lösungen und Medien werden 20 min bei 120°C autoklaviert. Besonderheiten werden bei den jeweiligen Lösungen und Medien gesondert vermerkt. Nach Abkühlen auf ca. 50°C werden die fehlenden hitzelablen Komponenten, wie Antibiotika, hinzugegeben. Diese müssen zuvor sterilfiltriert werden (Rotrandfilter; Schleicher & Schüll, 0,2 µm).

2.2.4.1 Lösungen und Medien zur Kultivierung und Transformation von Bakterien

Ampizillin-Stammlösung (100 mg/ml)	0,5 mg Ampizillin in 5 ml A. bidest lösen, sterilfiltrieren, bei -20°C lagern, Endkonzentration im Medium 50 µg/ml, in Agar-Platten 100 µg/ml.
LB₀-Medium	10 g Bacto Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1l A. bidest pH 7,4
LB_{Amp}-Agar	LB ₀ -Medium 1,8% (w/v) Agar 100 µg/ml Ampizillin
LB_{Amp}-Medium	LB ₀ -Medium 50 µg/ml Ampizillin

2.2.4.2 Lösungen und Medien zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien

DnD	1,53 g Dithiotreithol 9 ml DMSO 100 µl 1 M Kalziumacetat-Lsg. ad 10 ml A. bidest pH 7,5 sterilfiltrieren, in Aliquots bei -20°C lagern.
TFB (für hocheffizient transformierbare Bakterien)	100 mM K 2-[N-Morpholino]ethansulfon Säure (K-Mes) 100 mM RbCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 45 mM MnCl ₂ 3 mM Hexamin Co(III)Cl ₃ sterilfiltrieren und lichtgeschützt bei 4°C lagern.
TFB I	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl ₂ 100 mM RbCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerol sterilfiltrieren.
TFB II	10 mM Na-Morpholinopropansulfon-Säure (Na-MOPS) 10 mM RbCl ₂ 75 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerol sterilfiltrieren.
YT⁺⁺-Medium	8 g Bacto Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 970 ml A. bidest, 20 min autoklavieren und nach dem Abkühlen Zugabe von: 20 ml 1 M MgSO ₄ (vorher Lösung 1 h autoklavieren) 10 ml 1 M KCl (vorher Lösung 1 h autoklavieren) pH 7,5

2.2.5 Lösungen und Medien zur Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen

Zur Herstellung der Lösungen wird ausschließlich endotoxin-getestetes ES-Zellkulturwasser der Firma Sigma verwendet. Alle Lösungen und Medien werden unter der Sterilbank angesetzt oder vor der Verwendung autoklaviert. Die Kulturmedien und Lösungen, die in Gebrauch sind, werden sofern nicht anders vermerkt, bei 4°C gelagert. Vor der Verwendung werden die Kulturmedien im Wasserbad auf 37°C und alle weiteren Lösungen auf Raumtemperatur erwärmt.

ES-WT-Medium	500 ml GMEM 28 ml fötales Kälberserum (FCS) 28 ml Neugeborenen Kälberserum (NCS) 5,6 ml Natriumpyruvat (100 mM Stammlsg., Sigma) 5,6 ml nicht essentielle Aminosäuren (100 x Stammlsg., Sigma) 5,6 ml Glutamin (200 mM Stammlsg.) 5,6 ml Penizillin/Streptomycin Lösung (100 x Stammlsg.) 570 µl LIF (Leukämie Inhibitionsfaktor) 570 µl β-Mercaptoethanol (10 ⁻⁴ M Stammlsg., aliquotiert bei -20°C lagern)
ES-Einfriermedium (2x)	17,5 ml ES-WT-Medium 5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) 2,5 ml FCS Lagerung bei -20°C.
ES-Selektionsmedium	350 µg/ml G418-Stammlsg. in ES-WT-Medium, Lagerung bei 4°C.
ES-Trypsin	400 ml ES-PBS ⁻ 1 mM ES-EDTA-Lsg. 1% Hühnerserum 0,025% Trypsin bei -20°C lagern, in Gebrauch bei 4°C.
G418-Stammlösung	50 mg/ml aktives G416 Sulfat 10 mM PIPES bei -20°C lagern.
Gelatine-Stammlösung (1%)	5 g Gelatine ad 500 ml ES-Zellkulturwasser, 1 h autoklavieren, vermischen und erneut 1 h autoklavieren. (Gebrauchslsg. 0,1%)

HBS-Puffer	100 ml ES-PBS ⁻ 20 mM HEPES 2,5 M Glukose Lagerung bei -20°C.
KCl-Lösung (isotonisch)	0,56% (w/v) KCl in ES-Zellkulturwasser
β-Mercaptoethanol-Stammlösung	0,7% (v/v) β-Mercaptoethanol in Zellkulturwasser, sterilfiltrieren, bei -20°C lagern.

2.2.6 Lösungen zur Decalzifizierung und Kryoprotektion der Cochlea

EDTA-Lösung (zur Decalzifizierung der Cochlea)	10% EDTA in PBS ⁻
Sucrose-Lösung	30% Sucrose in A. bidest, bei Bedarf Lösung zu 10% bzw. 20% iger Sucrose-Lösung verdünnen, bei 4°C lagern.

2.2.7 Lösungen für histologische Färbungen und zur Überprüfung der Funktion der epidermalen Barriere

EGTA-Lösung	100 mM EGTA pH 8,0; mit 10 N NaOH titrieren bis die Lösung klar wird.
Eosin-Lösung	0,1% (w/v) Eosin Y filtriert mehrfach verwendbar.
Hämatoxylin-Lösung	0,1% Mayers Hämalaun-Lösung filtriert mehrfach verwendbar.
K₃[Fe(CN)₆]-Stammlösung	0,5 M K ₃ [Fe(CN) ₆] (Kaliumhexacyanoferrat (III)) lichtgeschützt, bei 4°C lagern.
K₄[Fe(CN)₆]-Stammlösung	0,5 M K ₄ [Fe(CN) ₆] (Kaliumhexacyanoferrat (II)) lichtgeschützt, bei 4°C lagern.
LacZ-Basislösung	100 mM Natriumphosphatpuffer (Na ₂ HPO ₄ und NaH ₂ PO ₄ im Verhältnis 5:1) 1,25 mM MgCl ₂ 2 mM EGTA

LacZ-Fixierungslösung	0,2% Glutaraldehyd in LacZ-Basislösung, frisch ansetzen.
LacZ-Substratlösung	5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ (0,5 M Stammlösung) 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ (0,5 M Stammlösung) 0,01% (v/v) Deoxycholat 0,2% (v/v) Nonidet P40 2,4% (v/v) X-Gal (4% X-Gal Stammlösung) vor X-Gal Zugabe sterilfiltrieren in LacZ-Basislösung, bei 4°C lichtgeschützt lagern.
Na₂HPO₄-Lösung	500 mM Na ₂ HPO ₄ pH 9,0
NaH₂PO₄-Lösung	500 mM NaH ₂ PO ₄ pH 4,7
Toluidinblau-Lösung	0,0125% Toluidinblau (Merck) in PBS ⁻
X-Gal Stammlösung	4% (w/v) X-Gal in N,N'-Dimethylformamid bei -20°C lichtgeschützt lagern.

2.3 Anästhetikum

Xylazin-Ketamin	4,25 ml isotonische NaCl-Lösung 0,5 ml Rompun, 2% 0,25 ml Ketavet, 100 mg/ml zum Narkotisieren 100 µl/g Körpergewicht
------------------------	--

2.4 Kommerzielle Lösungen und Reagenziensätze

2.4.1 Kommerzielle Lösungen

5 x PCR-Puffer	Promega
Acrylamid Stammlösung; Rotiphorese Gel 30	Roth
Chloroform	Merck
Demecolcine Solution [Colchizin]	Sigma
DMSO	Sigma
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline für ES-Zellkultur (ES-PBS ⁻)	Sigma
Eisessig	Merck
Entellan	Merck
Essigsäure	Merck
ES-Zellkulturwasser, endotoxin-getestet	Sigma
Ethanol	Serva

Ethidiumbromid, 1%	Merck
FCS	Gibco BRL
Giemsa-Färbelösung	Sigma
GMEM, Glasgow Minimum Essentiell Medium	Biochrom AG
Glutaraldehyd	Sigma
Glyzerol	Sigma
HBSS (Hank's balanced salt solution)	Sigma
Histowachs (Paraffin für die Histologie)	Leica
Immersol™ 518N (Immersionöl für die Mikroskopie)	Zeiss
Isopropanol	Merck
Isofluran-Inhalationsanästhetikum (Forene)	Abbott
Mayers Hämalaun	Merck
MgCl ₂ -Lösung für PCR-Analysen, 25 mM	Promega
Methanol	Roth
Mineral Oil als PCR-Öl	Sigma
Permafluor Mounting Medium	Immunotech
Quick-Hyb	Stratagene
RED Taq™ReadyMix™PCR Reaction Mix with MgCl ₂	Sigma
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce
Roti Histofix, 4% PFA, pH 7, phosphatgepuffert	Roth
SDS-Stammlösung (10%)	Merck
TEMED	Sigma
Tissue-Tek O.C.T.™ Compound	Sakura
Triton-X 100	Serva
TRIzol	Gibco BRL
Xylol	Merck

2.4.2 Kommerzielle Reagenziensätze

Bichinonic Acid Kit for Protein Determination	Sigma
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Quiagen
Jetstar Plasmid Midi Kit 50	JETstar
Megaprime-DNA labeling system	Amersham Biosciences
Nucleobond AX-500	Macherey-Nagel
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Perfectprep Gel Cleanup Kit	Eppendorff
Phusion High Fidelity PCR Kit	NEB
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce

2.5 Geräte

Binokular MS5	Leica
Blotting-Chamber Mighty-Small II	Bio-Rad
Elektrophoresekammer Perfect blue™	PeqLab

Elektrophoresekammer Mighty-Small II SE250/SE260 mit SE 245	Hoefler
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA
Feinwaage Navigator	Ohaus
Feinwaage Precisa 120A	Söntgen
Heizblock QBT	Grant Instruments
Hybridisierungssofen 7601	GFL
Inkubator 6000	Heraeus
Kamera AxioCam color HR	Zeiss
Kolbenhubpipette Pipetman (10, 20, 200, 1000 µl)	Gilson
Kryostat HM500OM	Microm
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus
Kühlzentrifuge Biofuge resco	Heraeus
Magnetrührer MR 2002	Heidolph
Mikroskop IM 35	Zeiss
Mikroskop LSM 510	Zeiss
Mikroskop mit Epifluoreszenz, Axiophot	Zeiss
Mikrowelle MW 800	Continent
Mikrotom für Paraffinschnitte HM360	Leica
Paraffin-Gewebeinfiltrationsautomat TP1020	Leica
Paraffin-Einbettstation EG1140 H	Leica
Paraffin-Kühlplatte EG1140 C	Leica
PCR-Maschine PTC-100	Biozym
PCR-Machine PTC-200 mit Gradientenblock	Biozym
pH-Meter Inolab	WTW
Pipettierhilfe vac-petus	Faust
Schüttler G25	Heraeus
Schüttler Vibrax VXR basic	IKA
Sonnenrad Rotator SB3	Stuart
Spannungsgerät Bio-Rad 1000/500	Bio-Rad
Spannungsgerät LKB GPS 200/400	Pharmacia
Spektralphotometer DU 640	Beckmann
Strudelmixer Vortex Genie 2	Scientific Industries
Szintillationszähler LS 1801	Beckmann
Ultraschallbad Transonic T460	Elma
Ultraschallstab Sonifier B-12	Branson
UV Stratalinker 2400	Stratagene
UV-Detektor 2138 UVICORD S	LKB Bromma
UV-Transilluminator	Herolab
Vakuumpumpe BVC21	Vacuubrand
Vibratom VT1000S	Leica
Wasserbad 012T	Lauda
Wasserbad Shake Temp SW22	Julabo

Zentrifuge 5415D

Eppendorf

2.6 Sonstige Materialien

15/ 50 ml Röhrchen

Deckgläschen

Faltenfilter

Glaswolle

Hybond-ECL Nitrozellulose Membran

Hybond-N+ Nitrozellulose-Membran

Hybridisierungsröhren

Mikroreaktionsgefäße (0,25-2,0 ml)

Objektträger (für Paraffinschnitte mit Beschichtung)

Parafilm „M“

Pipettenspitzen

Plastikküvetten (Einmal Küvetten, ½ Mikro, 1,6 ml)

Röntgenfilme X-OMAT AR, BIOMAX AR und BIOMAX MR

Röntgenfilme SuperRX

Röntgenkassette Hypercassette™ mit und ohne Screens

Sterilfilter 0,4 µm und 0,2 µm

SuperFrost Plus Objektträger

Whatman 3mm-Papier GB002

Zellkulturflaschen mit Filterdeckel (25 und 75 cm²), steril

Zellkulturplatten (48-, 24-, 12- und 6-Loch), steril

Zellkulturschalen (10, 6 und 3,5 cm), steril

Sarstedt

Menzel-Gläser

Schleicher & Schuell

Roth

Amersham Biosciences

Amersham Biosciences

Amersham Biosciences

Sarstedt

Menzel-Gläser

American National Can

Sarstedt

VWR

Kodak

Fuji

Amersham Biosciences

Schleicher & Schuell

Menzel-Gläser

Schleicher & Schuell

Falcon

Falcon

Falcon

2.7 Nukleinsäuren

2.7.1 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Startermoleküle für die PCR-Reaktionen wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen. Die Oligonukleotide wurden lyophilisiert geliefert und in dem vom Hersteller empfohlenen Volumen A. bidest aufgenommen. Gelagert wurden diese Oligonukleotide bei -20°C.

2.7.1.1 Oligonukleotide zur Erzeugung der Cx30 Mutation A88V

Bezeichnung	Basensequenz (5'→3')	Bindungsstelle
Cx30for	GTC AAT TAA TGG CAT TGT TTC ACC	im 5'Homologiebereich von mCx30
Cx30rev	CGG GAT CCA TGC ATC AGA TCA ATG TTG TCT ACA AAG AGG	im 3'Homologiebereich von mCx30
Cx30A88Vfor	GTG TCT ACC CCA GTA CTG TTG GTG GCC	in der kodierenden Region von mCx30, zweite Transmembrandomäne
Cx30A88Vrev	GGC CAC CAA CAG TAC TGG GGT AGA CAC	in der kodierenden Region von mCx30, zweite Transmembrandomäne

Tab. 2.1: Oligonuklotide zur Erzeugung der Cx30A88V Mutation mit Hilfe einer Mutagenese-PCR.

2.7.1.2 Oligonukleotide zur Überprüfung der homologen Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen

Bezeichnung	Basensequenz (5'→3')	Bindungsstelle	PCR
Cx30testkonv_for	CCA TCT TGT TCA ATG GCC GAT C	in der Neomyzin Kodierungssequenz	Cx30T5M_3'HR
Cx30testkonv_rev	CCT TGA ATT GGT GGT AGG ATC CC	im 3' Homologiebereich von mCx30, außerhalb des Austauschvektors	Cx30T5M_3'HR
InternCx30_for	GAA TAA GCC TGC ACG ATG GAC TG	in der mCx30 bzw. Cx30T5M kodierenden Region	Cx30T5M_LacZ
Intern_vor_IRES	GCC CTA GAT GCA TCA GAT CAA TG	in der mCx30 bzw. Cx30T5M kodierenden Region, vor der IRES-Sequenz	Cx30T5M_LacZ
Cx30testfor	CGC TAC CAT TAC CAG TTG GTC TG	in der <i>lacZ</i> kodierenden Sequenz	A88V_3'HR
Cx30kondrev	GGA CTC CAA GGA CTG CTT CTT TG	im 3' Homologiebereich von mCx30, außerhalb des Austauschvektors	A88V_3'HR
loxP in 5'HR	GAG TTA CCA CCATAG GGA G	im 5' Homologiebereich von mCx30, vor der ersten loxP- Stelle	Cx30A88V_intern
loxP in 3'HR	GCA AGC ACA CAC ACT GAA G	3' nach der ersten loxP- Stelle, in der für mCx30 kodierenden DNS	Cx30A88V_intern

Tab. 2.2 Oligonuklotide zur Überprüfung der homologen Rekombination mit den Austauschvektoren „Cx30T5M“ und „Cx30KiCx30A88V“ in embryonalen Stammzellen.

2.7.1.3 Oligonukleotide zur Genotypisierung der Mauslinien

Bezeichnung	Basensequenz (5'→3')	Bindungsstelle	PCR
GenNeo-for	CTT CAG CTC CAG TGT ACA C	nach dem endogenen mCx30 poly(A)	Cx30T5M ΔNeo
GenNeo	CTA TCG CCT TCT TGA CGA G	in der Neomycin Kodierungssequenz	Cx30T5M ΔNeo
GenNeo-rev	CAA CAG TAC TCA GTG GGT G	nach der Neomycin Kodierungssequenz im 3' Homologiebereich des mCx30	Cx30T5M ΔNeo
A88V-loxP-for	CAG GAT TAG GAC TGC TGA GG	im 5' Homologiebereich von mCx30, vor der ersten loxP- Stelle	Cx30A88V loxP
A88V-loxP-rev	GCA CAC ACA CTG AAG TTC C	nach der ersten loxP-Stelle, in der für mCx30 kodierenden DNS	Cx30A88V loxP
A88VdelNeo_for	GTG TGT GCT CTT AAG GTG	zwischen der mCx30 kodierenden Region und frt- Stelle	Cx30A88V ΔNeo
A88VNeo_rev	GAG TTC TTC TGA GGG GAT C	in der Neomycin Kodierungssequenz	Cx30A88V ΔNeo
A88VdelNeo_rev	CAT CGT GCA GGC TTA TTC	in der für mCx30 kodierenden Sequenz	Cx30A88V ΔNeo
loxP_for	CTA TCA GCA GCC TAG AGG AGG	im 5' Homologiebereich von mCx26, vor der ersten loxP- Stelle	Cx26S17F loxP
loxP_rev	ATG ATG CGG AAG ATG AAG AG	3' nach der ersten loxP- Stelle, in der für mCx26 kodierenden DNS	Cx26S17F loxP
eGFP-for	CAC ATG GTC CTG CTG GAG TTC G	in der eGFP Kodierungsregion	Cx26S17F eGFP
eGFP-rev	CAC ACA CGG AGA CAG GTG TTT TAG	im mCx26 3' Homologiebereich	Cx26S17F eGFP
neo-for	GGG CAA GTT GAA CCA TTA CCA C	zwischen mCx26 kodierenden Region und frt- Stelle	Cx26S17F ΔNeo
neo-revA	GTT CCT TGC GCA GCT GTG CTC	in der Neomycin Kodierungssequenz	Cx26S17F ΔNeo
neo-revB	CAT-GAT-GCG-GAA-GAT- GAA-GAG	in der für mCx26 kodierenden Sequenz	Cx26S17F ΔNeo

Up-IntCre	TTT GCC TGC ATT ACC GGT CGA TGC	in der für die Cre- Rekombinase kodierenden Sequenz	Interne Cre
IntCre-rev	TCC ATG AGT GAA CGA ACC TGG TCG	in der für die Cre- Rekombinase kodierenden Sequenz	Interne Cre
up-pgk1	GCT GTT CTC CTC TTC CTC ATC TCC	in der kodierenden Region des pgk-Promotors	pgk-Cre
USP-Flp	TAA GGT CCT GGT TCG TCA GTT TGT GG	in der für die Flp- Rekombinase kodierenden Sequenz	intFlp
DSP-Flp	GTG ATA TTA TCC CAT TCC ATG CGG GG	in der für die Flp- Rekombinase kodierenden Sequenz	intFlp

Tab. 2.3 Oligonuklotide zur Genotypisierung der verwendeten Mauslinien.

2.7.1.4 Oligonukleotide zur Herstellung von Southern Blot Sonden

Bezeichnung	Basensequenz (5'→3')	Bindungsstelle
3'Sonde_Cx26_for	CTG GTG CAT CAC CTA GTT AG	im mCx26 3' Homologiebereich
3'Sonde_Cx26_rev	CGG TAC CTA CAC TAT CAT CC	im mCx26 3' Homologiebereich, außerhalb des Austauschvektors

Tab. 2.4: Oligonukleotide zur Herstellung einer Cx26 3'externen Hybridisierungssonde.

2.7.1.5 Oligonukleotide für Reverse Transkriptase PCRs (RT-PCR)

Bezeichnung	Basensequenz (5'→3')	Bindungsstelle
GFP_RT_for	TAA ACG GCC ACA AGT TCA GC	in der eGFP Kodierungsregion
GFP_RT_rev	TGT CGG CCA TGA TAT AGA CG	in der eGFP Kodierungsregion
β-actin_USP	CGT GGG CCG CCC TAG GCA CCA G	in der β-Aktin Kodierungsregion
β-actin_DSP	TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G	in der β-Aktin Kodierungsregion

Tab. 2.5 In RT-PCRs verwendete Oligonukleotide.

2.7.2 Southern Blot Hybridisierungssonden

Bezeichnung	Beschreibung	Bindungsstelle
5'-externe Sonde (Cx30T5M, Cx30A88V)	externe Sonde, <i>MluI</i> , <i>PstI</i> Fragment (766 bp) aus dem Plasmid 10b1b/ pBS SK+_mCx30Genlokus	5' Homologieregion, außerhalb des Austauschvektors

3'-externe Sonde (Cx30T5M, Cx30A88V)	externe Sonde, <i>Bam</i> HI, <i>Cl</i> al Fragment (808 bp) aus dem Plasmid 10b1b/ pBS SK+_mCx30Genlokus	3' Homologieregion, außerhalb des Austauschvektors
3'-Sonde (Cx26S17F)	externe Sonde, PCR-Fragment (580 bp), verwendete Oligonukleotide 3'Sonde_Cx26_for und 3'Sonde_Cx26_rev	3' Homologieregion, außerhalb des Austauschvektors
LacZ-Sonde	interne Sonde, <i>M</i> luI Fragment (780 bp) aus dem Plasmid T5M_IRES_LacZ_3'HR	in der <i>lacZ</i> Kodierungssequenz
Neo-Sonde	interne Sonde, <i>P</i> stI Fragment (635 bp) aus dem Plasmid pBsk_frt_Neo_frt	in der Neomycin Kodierungssequenz

Tab. 2.6: Verwendete Southern Blot Hybridisierungs sonden zur Überprüfung der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen und zur Genotypisierung der Mauslinien.

2.7.3 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
10b1b/ pBS SK+_mCx30Genlokus	mCx30Genlokus mit pBsk Vektorrückgrat	D. Manthey, Diplomarbeit 1994
pBsk_frt_Neo_frt	Neomycin Kodierungsregion flankiert von frt-Stellen, unter der Kontrolle des pgk- Promoters	J. Degen, Doktorarbeit 2003
T5M_IRES_LacZ_3'HR	Cx30T5M kodierende Region, IRES- Sequenz und die für die β -Galaktosidase kodierende Region (<i>lacZ</i>)	M. Schütz, Diplomarbeit 2006
loxP_Cx30Wt_loxP	mCx30 kodierende Region flankiert von loxP-Stellen	M. Schütz, Diplomarbeit 2006
kondPCR-Testvektor	Cx30T5M kodierende Region, IRES- Sequenz, die für die β -Galaktosidase kodierende Region (<i>lacZ</i>) und 3' Bereich des wtCx30-Gens (länger als die Homologieregion der Austauschvektoren)	M. Schütz, Diplomarbeit 2006
konvPCR-Testvektor	wtCx30 kodierende Region, von frt-Stellen flankierte, kodierende Region des Neomycin-Resistenzgens und 3' Bereich des wtCx30-Gens (länger als die	M. Schütz, Diplomarbeit 2006

Tab. 2.7: Verwendete Plasmide zur Klonierung der Austauschvektoren bzw. zur Herstellung von Southern Blot Hybridisierungs sonden.

2.8 Bakterienstämme

E. coli Stamm	Eigenschaften	Referenz
XL-1 blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, Δ(mcr)A183, Δ(mcrCB-hsd SMR-mrr)173, supE44, relA1, lac[F' proAB lacIqΔM15, Tn10 (Tetr12,5 μg/ml)]	(Bullock et al., 1987), Stratagene
DH5α	F- Φ80 dlacZ ΔM15 ΔlacZYA-arg FI U129 deo recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phA supE44 λ-thi-1 gyrA96 rel A1	Invitrogen
MM294-Cre (Cre-E.coli)	Genotyp: F-, λ-,supE44, endA1, thi-1, hsdR17, lacZ:cl857-Cre, Cre-Rekombinase exprimierende E. coli Bakterien	(Buchholz et al., 1996)
MM294-Flp (Flp-E.coli)	Flp-Rekombinase exprimierende E. coli Bakterien	(Buchholz et al., 1996)

Tab. 2.8: Bakterienstämme zur Amplifikation der verwendeten Plasmide und zur funktionellen Analyse der *frt*- und *loxP*-Stellen.

2.9 Eukaryontische Zelllinie

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
HM1	Embryonale Stammzellen der Maus, gewonnen aus dem Mausstamm Sv129P2/OlaHsd	(Magin et al., 1992)

Tab. 2.9: Zelllinie zur Erzeugung der Cx30T5M- und der Cx30A88V-Mauslinien.

2.10 Mausstämme und Mauslinien

Bezeichnung	Kurzbeschreibung	Bezugsquelle/ Referenz
C57BL/6	Inzuchtstamm, schwarz, für Züchtungen und Rückkreuzungen; Weibchen als Blastozysten-Spendertiere für BCI.	Charles River, Sulzfeld; eigene Zucht
129Sv	Inzuchtstamm, agouti, für Züchtungen und Rückkreuzungen;	Prof. Hubert Schorle, Institut für Pathologie, Uniklinik Bonn, (Simpson et al., 1997; Threadgill et al., 1997)
NMRI	Auszuchtstamm, albino, Weibchen als Blastozysten-Empfängertiere für BCI, vasektomierte Männchen zur Erzeugung scheinchwangerer Weibchen (Foster).	Charles River, Sulzfeld; eigene Zucht

Deleter-Flp	transgene Mauslinie, welche die Flp-Rekombinase ubiquitär unter der Kontrolle des menschlichen β -Aktin Promotors exprimiert.	(Rodríguez et al., 2000)
PGK-Cre	transgene Mauslinie, die die Cre-Rekombinase ubiquitär unter der Kontrolle des PGK Promotors exprimiert.	(Lallemand et al., 1998)
Otog-Cre	transgene Mauslinie, die die Cre-Rekombinase spezifisch im Innenohr unter der Kontrolle des Otogelin-Promotors exprimiert.	(Cohen-Salmon et al., 2002)
Cx26S17F	Mauslinie, in der die Punktmutation Cx26S17F, nach Cre vermittelter Deletion der mCx26 kodierenden Region, unter der Kontrolle des endogenen mCx26 Promotors exprimiert wird.	I. Körber, Doktorarbeit 2008; (Schütz et al., 2011)
Cx26floxLacZ[Cx32]	Mauslinie, bei der nach Cre-vermittelter Deletion der mCx26 kodierenden DNS das LacZ-Gen bzw. Cx32 unter der Kontrolle des endogenen mCx26 Promotors exprimiert wird.	N. Pielensticker, Doktorarbeit 2005; N. Dicke, Diplomarbeit 2006

Tab. 2.10: Verwendete Mausstämme und -linien.

2.11 Antikörper

Die folgenden primären und sekundären Antikörper wurden für Immunfluoreszenz- bzw. Immunoblotanalysen verwendet. Die Blockierungslösungen, die auch zum Verdünnen der Antikörper genutzt wurden, richten sich nach dem jeweiligen Verwendungszweck.

2.11.1 Primäre Antikörper

Antigen	Antikörper-Typ	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
β -Aktin	monoklonal	Maus	IB 1:500	Sigma
Cx26	monoklonal	Maus	IF 1:500 IB 1:500	Zymed/ Invitrogen
Cx30	polyklonal	Kaninchen	IF 1:500 IB 1:500	Zymed/ Invitrogen
Cx32	polyklonal	Kaninchen	IF 1:500 IB 1:500	Zymed/ Invitrogen
Cx43	polyklonal	Kaninchen	IF 1:1000	C. Schliecker, Diplomarbeit 2000
eGFP	polyklonal	Kaninchen	1:500	Zymed/ Invitrogen
K1	polyklonal	Kaninchen	IF 1:500	Covance PRB (BabCo)
K14	monoklonal	Maus	IF 1:50	Santa Cruz

Ki67	monoklonal	Ratte	IF 1:100	Dako
Loricrin	polyklonal	Kaninchen	IF 1:500	Covance PRB (BabCo)
PCNA	Monoklonal	Maus	IB 1:250	Santa Cruz

Tab. 2.11: Primäre Antikörper, die für die indirekte Immunfluoreszenz- und Immunoblotanalysen eingesetzt wurden. IB: Immunoblot, IF: Immunfluoreszenz.

2.11.2 Sekundäre Antikörper

Antigen	Antikörper-Typ	Spezies	Verdünnung	Markierung	Bezugsquelle
Kaninchen IgG	polyklonal	Ziege	IF 1:1000	Alexa 488	Zymed/ Invitrogen
Kaninchen IgG	polyklonal	Ziege	IF 1:1000	Alexa 594	Zymed/ Invitrogen
Maus IgG	polyklonal	Ziege	IF 1:1000	Alexa 594	Zymed/ Invitrogen
Maus IgG	polyklonal	Ziege	IF 1:1000	Alexa 488	Zymed/ Invitrogen
Ratte IgG	polyklonal	Ziege	IF 1:1000	Alexa 546	Zymed/ Invitrogen
Kaninchen IgG	polyklonal	Ziege	IB 1: 20000	Meeretich- Peroxidase	Dianova
Maus IgG	polyklonal	Ziege	IB 1:20000	Meeretich- Peroxidase	Dianova

Tab. 2.12: Sekundäre Antikörper, die für indirekte Immunfluoreszenz- und Immunoblotanalysen genutzt wurden.

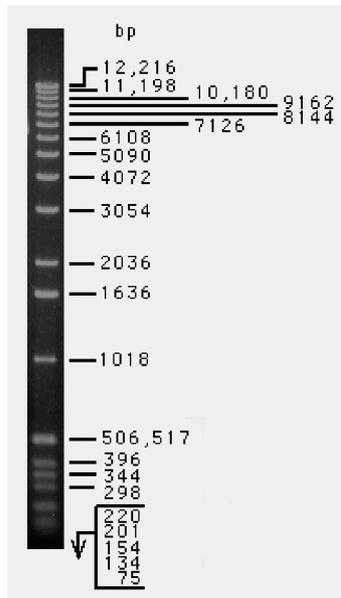
IB: Immunoblot, IF: Immunfluoreszenz.

2.11.3 Fluoreszenzfarbstoffe/-marker

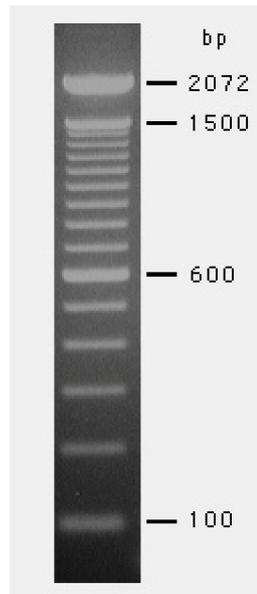
Name	Anfärbung von	Verdünnung	Bezugsquelle
Draq5™	DNS	IF 1:5000-10000	Biostatus LIMITED
Texas red-X-Phalloidin	F-Aktin	IF 1:20000	Invitrogen
SYTO® 61 red fluorescent nucleic acid stain	Nukleinsäuren	IF 1:5000-10000	Molecular Probes

Tab. 2.13: Fluoreszenzfarbstoffe und -marker, die in Immunfluoreszenzanalysen verwendet wurden.

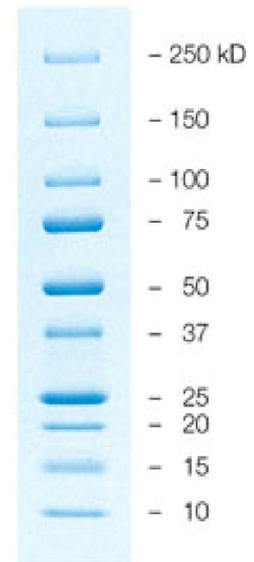
2.12 Größenstandards



1 kb-DNS Leiter (Gibco BRL)



100 bp-DNS Leiter (Gibco BRL)



Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad)

3 Methoden

In Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. Fabio Mammano, Venetian Institute of Molecular Medicine, Foundation for Advanced Biomedical Research, Universität Padua, Italien, Prof. Karen Steel, Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, England und Prof. Tobias Moser, Abteilung Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Bernstein Center for Computational Neuroscience, Universität Göttingen wurden die elektrophysiologischen Untersuchungen der Cx30T5M-, Cx26S17F- und Cx26floxLacZ[Cx32]-Mauslinien durchgeführt. Von einer Beschreibung der angewandten elektrophysiologischen Techniken wurde in dieser Arbeit abgesehen, da diese bereits zuvor eingehend beschrieben wurden: Messungen des endocochlearen Potentials und der Hörschwellen durch Ableitungen am Hirnstamm (Bosher und Warren, 1978; Steel und Barkway, 1989; Santarelli et al., 2003; Neef et al., 2009), Untersuchungen des Calcein- und Ca^{2+} -Transfers in organotypischen Cochlea-Kulturen (Anselmi et al., 2008; Ortolano et al., 2008; Majumder et al., 2010) und Patch Clamp Technik (Beltramello et al., 2005; Hernandez et al., 2007). Die spezifischen Bedingungen, die für die Analyse der Cx30T5M- und Cx26S17F-Mauslinien verwendet wurden, sind in den Publikationen Schütz et al., 2010 und Schütz et al., 2011 einzusehen.

3.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.1.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.1.1.1 Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präparation)

Diese Präparationsmethode eignet sich vor allem zur schnellen Identifikation rekombinanter Bakterienklone durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen. Dazu werden 2 ml eines antibiotikumhaltigen LB-Mediums mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien inokuliert. Die Kultur wird üN in einem Schüttelinkubator bei 250 Upm und 37°C inkubiert. 1,5 ml dieser Kultur werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 12000 Upm, 1 min lang zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes werden die sedimentierten Bakterien in 100 µl Alkalilösung I aufgenommen, 2 min bei RT inkubiert und resuspendiert. Dabei werden die Bakterienzellwände zerstört und die RNS durch enthaltene RNasen abgebaut. Durch Zugabe der Alkalilösung II und einer weiteren Inkubationszeit von 2 min, wird die DNS denaturiert. Anschließend erfolgt die Renaturierung der DNS durch Absenkung des pH-Wertes mittels Zufügen von 150 µl Alkalilösung III. Der Ansatz wird mehrmals invertiert und bei 12000 Upm 6 min zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entsteht ein unlösliches Pellet aus Zelltrümmern und daran haftender genomischer DNS. Der Überstand

wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 500 µl Ethanol (absolut) hinzugegeben. Die DNS wird gefällt und durch eine 6 minütige Zentrifugation bei 12000 Upm sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das entstandene DNS-Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wird der Überstand vorsichtig abgesaugt. Nach dem Lufttrocknen der Plasmid-DNS wird diese in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Eine 30-minütige Inkubation bei RT auf dem Schüttler fördert das Lösen der DNS.

3.1.1.2 Präparative Plasmid-Isolierung (Midi-Präparation)

Um größere Mengen hochreiner DNS (100-200 µg) zu gewinnen, werden 50 ml eines geeigneten LB-Mediums mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien üN im Schüttler bei 250 Upm und 37°C inkubiert. Die Flüssigkultur wird in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß überführt und 10 min bei 8000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Die Plasmidpräparation erfolgt anschließend durch Ionenaustausch-Chromatographie. Hierfür wird der Reagensatz Jetstar 2.0 Plasmid MIDI Kit verwendet. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben.

3.1.1.3 Endotoxin-freie Plasmid-Isolierung (Maxi-Präparation)

Bakterielle Toxine können die Transfektionseffizienz embryonaler Stammzellen herabsenken, um dies zu unterbinden, werden Plasmide durch die Verwendung endotoxinfreier Reagensätze aufgereinigt. Für die endotoxinfreie Isolierung der Austauschvektoren aus *E. coli* Bakterien werden 100 ml LB_{Amp}-Medium mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien angeimpft und üN bei 250 Upm und 37°C inkubiert. Die Präparation der Vektor-DNS erfolgt nach Herstellerangaben mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Quiagen, welches die Aufreinigung durch Ionenaustausch-Chromatographie ermöglicht. Die Vektor-DNS wird unter sterilen Bedingungen in 100 µl endotoxinfreiem TE-Puffer aufgenommen und nach Bestimmung der DNS-Konzentration zur Transfektion embryonaler Stammzellen eingesetzt.

3.1.1.4 Isolierung genomischer DNS aus embryonalen Stammzellen

3.1.1.4.1 Isolierung der DNS für PCR-Analysen

Zur schnellen Überprüfung der homologen Rekombination in ES-Zellen kann eine PCR-Analyse durchgeführt werden. Hierzu werden 1/3 der trypsinierten ES-Zellen einer konfluent bewachsenen 48-Lochplatte in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 50 µl 1x PCR-Puffer und 0,5 µl Proteinase K aufgenommen und üN bei 55°C inkubiert. 10 µl des Lysats können anschließend für die PCR verwendet werden (siehe Abschnitt 3.1.6).

3.1.1.4.2 Isolierung der DNS für Southern Blot Analysen

Für die Isolierung der genomischen DNS aus ES-Zellen wird das Medium einer konfluent gewachsenen T25 Zellkulturflasche entfernt und die ES-Zellen zweimal mit PBS⁻ gewaschen. Anschließend werden die ES-Zellen in 1,5 ml ES-Lysispuffer und 5 µl Proteinase K für 30 min bei RT schwenkend inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen durch Klopfen gegen den Boden und Rand der Zellkulturflasche gelöst und in ein phenolbeständiges 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Inkubation erfolgt üN bei 55°C. Das Zellysate wird mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (1:1:24) versetzt, durch Invertieren durchmischt und für 15 min bei 2500 Upm (4°C) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, in der die DNS gelöst ist, wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNS wird das 0,7x Volumen Isopropanol zugegeben und geschüttelt bis es zum Ausbilden einer DNS-Flocke kommt. Diese DNS-Flocke wird mit einer autoklavierten blauen Pipettenspitze in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, in das zuvor 500 µl 70% Ethanol vorgelegt wurden, überführt und sedimentiert (5 min, 13000 Upm, 4°C). Nach Abnahme des Ethanol-Überstandes wird das DNS-Pellet etwa 10 min an der Luft getrocknet. Die DNS wird nach dem Trocknen in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und zum Lösen bei 55°C üN inkubiert. Die genomische DNS kann bei 4°C gelagert werden.

3.1.1.5 Isolierung genomischer DNS aus Mausschwanzspitzen

Zur Genotypisierung transgener Mäuse durch PCR-Analysen werden Schwanzbiopsien in 400 µl Laird-Puffer und 4 µl Proteinase K (frisch dazu geben) üN bei 55°C lysiert. Durch Zentrifugation (10 min, 13000 Upm, RT) werden unlösliche Bestandteile sedimentiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNS durch Zugabe von 200 µl Isopropanol und mehrmaligem Invertieren präzipitiert. Durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C wird die DNS pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird die DNS einmal mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Je nach Größe des Pellets wird die DNS in 50-100 µl TE-Puffer aufgenommen und üN bei 55°C im Wasserbad gelöst.

3.1.1.6 Isolierung genomischer DNS aus der Leber von Mäusen

Die herausgenommenen Lebern werden nach der Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können so bei -80°C gelagert werden. Für die Isolierung der genomischen DNS werden die gefrorenen Gewebe (bis zu 1 g) in vorgekühlten Schraubzylindern mit Metallstäben und einem Hammer zu Pulver zermahlen. Das Pulver wird anschließend in ein phenolbeständiges 15 ml Reaktionsgefäß überführt, wo es mit 1,2 ml Laird-Puffer und 6 µl Proteinase K pro 100 mg Gewebe versetzt und 2-3 Tage bei 55°C im

Wasserbad inkubiert wird. Die Inkubation erfolgt so lange bis keine Gewebereste mehr zu erkennen sind und kann durch erneute Zugabe von 6 µl Proteinase K nach 24 h beschleunigt werden. Den Organlysaten wird nach der Inkubation das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (1:1:24) zugegeben und durch Invertieren gemischt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation (2500 Upm, 4°C) wird die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei Bedarf kann dieser Schritt unter erneuter Zugabe von Chloroform/Isoamylalkohol (1:24) wiederholt werden. Die DNS wird durch Zugabe des 0,7x Volumens Isopropanol ausgefällt und kann als Flocke mit einer autoklavierten blauen Pipettenspitze in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt werden, in das zuvor 5 ml 70% Ethanol vorgelegt wurden. Anschließend wird die DNS-Flocke durch Zentrifugation (10 min, 4500 Upm, 4°C) sedimentiert, der Überstand verworfen und die DNS luftgetrocknet. Das DNS-Pellet wird in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und zum vollständigen Lösen der DNS in bei 55°C inkubiert. Die so gewonnene DNS kann für Southern Blot Hybridisierungen und PCR-Analysen verwendet werden.

3.1.1.7 RNS-Isolierung aus Geweben

Gesamt-RNS wird mittels des TRIzol Reagenzes, einer homogenen Lösung aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat (Chomczynski und Sacchi, 1987), geschützt vor RNasen isoliert. Hierzu wird frisch präpariertes Gewebe gewogen und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die nachfolgenden Schritte werden unter einem Abzug durchgeführt. Zu je 100 mg Gewebe wird 1 ml TRIzol hinzugegeben, das Gewebe mit Hilfe eines Homogenisatorstabes zerkleinert und 5 min bei RT inkubiert. Zum Organlysate werden pro ml TRIzol 0,2 ml Chloroform/Isoamylalkohol (1:24) hinzugegeben und der Ansatz geschüttelt. Dann wird der Ansatz 15 min bei 4°C und 5800 Upm zentrifugiert, die obere wässrige Phase in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml TRIzol versetzt. Der gesamte Ansatz wird durch mehrmaliges Invertieren durchmischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min (5800 Upm, 4°C) wurde der Überstand verworfen und die sedimentierte RNS mit 5 ml 75% RNS-Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 5800 Upm wurde der Überstand entfernt und die RNS luftgetrocknet. Die getrocknete RNS wurde in 400 µl DEPC-Wasser gelöst und in ein 2 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt. Nach vollständiger Lösung der RNS durch 5-minütige Inkubation bei 65°C können die RNS-Proben bei -70°C gelagert werden. Zur Überprüfung der RNS-Degradation durch denaturierende Gelelektrophorese werden zuvor noch 10 µl RNS-Lösung abgenommen.

3.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren kann anhand ihrer Absorption von UV-Licht bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum der in Nukleinsäuren enthaltenen heterozyklischen Nukleotidbasen liegt bei 260 nm, das von in Proteinen enthaltenen aromatischen Aminosäuren bei 280 nm. Die Absorption von Nukleinsäurelösungen wird bei 260 nm und 280 nm gegen TE-Puffer als Referenz gemessen. Die Messung erfolgt in Quarzküvetten am Spektralphotometer. Eine Absorptionseinheit (A_{260}) entspricht bei einem Strahlengang von 1 cm Länge einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNS bzw. 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNS. Aus der Absorption bei 280 nm (A_{280}) lässt sich auf den Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung schließen. Idealerweise sollte der Quotient A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Abweichungen erlauben Rückschlüsse auf Verunreinigungen durch RNS ($A_{260}/A_{280} > 2,0$) oder Proteine ($A_{260}/A_{280} < 1,5$). Die Konzentrationsbestimmung erfolgt unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors.

3.1.3 Enzymatische Modifikation von DNS

3.1.3.1 Spaltung doppelsträngiger DNS durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II schneiden doppelsträngige DNS an spezifischen Palindromsequenzen von 4-8 Basenpaaren Länge. Infolgedessen entstehen an den Enden der DNS einzelsträngige 3'- oder 5'-Überhänge oder glatte Doppelstrangenden. Die Restriktionsendonukleasen werden unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Eine gleichzeitige Spaltung der Plasmid-DNS mit mehreren Enzymen kann nur stattfinden, wenn die Puffer kompatibel sind. Spaltungen von Plasmid-DNS werden in einem Endvolumen von 20 μl mit 0,5 μl der jeweiligen Restriktionsendonukleasen angesetzt. Für partielle Spaltungen werden die Enzymmengen und die Inkubationszeiträume variiert.

3.1.3.2 Glätten überhängender einzelsträngiger Enden (Blunten)

Viele Restriktionsendonukleasen erzeugen kohäsive DNS-Enden mit 3'- oder 5'-Überhängen, die nicht kompatibel zueinander sind. Sollen diese Einzelstrangenden miteinander verknüpft werden, können sie mit Hilfe des Klenow-Fragments, Fragment der DNS-Polymerase I aus *E. coli*, aufgefüllt werden (nur 5'-Überhänge, fehlende 5'-3'-Exonukleaseaktivität). Zu 20 μl des hitzeinaktivierten Restriktionsansatzes werden 2 μl 10x Restriktionspuffer H (Roche), 1,0 μl dNTPs [2 mM] und 0,5 μl Klenow-Enzym [2 U/ μl] zugegeben. Die Inkubation des Ansatzes erfolgt bei 37°C für 20 min, anschließend wird das Enzym für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

3.1.3.3 Dephosphorylierung freier 5'-DNS-Enden

Soll in einen durch Restriktionsendonukleasen linearisierten Vektor Passagier-DNS eingefügt werden, muss verhindert werden, dass der Vektor sich erneut zusammenlagert. Dazu werden die freien 5'-Phosphatgruppen des Vektors entfernt. Diese Dephosphorylierung wird durch die Verwendung einer alkalischen Phosphatase aus Krabben (Shrimp alkaline Phosphatase, SAP) erreicht. Zu 30 µl eines Vektor-Geleluats werden 3 µl eines 10x SAP-Puffers und 1 µl [1 U/µl] SAP gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 30 min wird nochmals 1 µl SAP hinzugefügt, da die Phosphatase hitzelabil ist. Die Inkubationszeit beträgt erneut 30 min bei 37°C, es folgt eine zwanzigminütige Hitzeinaktivierung bei 65°C. Eine Verknüpfung der DNS ist nur noch über die Aktivität einer T4-Ligase und den freien 5'-Phosphatgruppen der Passagier-DNS möglich.

3.1.3.4 Ligation von DNS-Fragmenten

Die DNS-Ligation ist ein ATP-abhängiger Prozess, bei dem freie 5'-Phosphatgruppen über Phosphodiesterbindungen mit freien 3'-Hydroxylgruppen verknüpft werden. Durchgeführt wird die Zusammenlagerung von Vektor-DNS und Passagier-DNS durch die T4-Ligase unter reduzierenden Pufferbedingungen. Im Allgemeinen werden zu 1 µl Vektorrückgrat 7 µl Passagier-DNS, 1 µl 10x Ligase-Puffer und 1 µl T4-Ligase zugefügt und üN bei 16°C oder 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Aufgrund der Dephosphorylierung des Vektorrückgrats sollte es nur dann zu einer Ligation kommen, wenn die Passagier-DNS eingebaut wird. Zur Kontrolle wird eine Reaktion des dephosphorylierten Vektorrückgrats mit Wasser anstelle der Passagier-DNS, durchgeführt.

3.1.4 Transformation in *Escherichia coli*

3.1.4.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Transformationskompetente Bakterien besitzen poröse Zellwände, die es erlauben, fremde DNS aufzunehmen. Zu diesem Zweck werden die Bakterien einer Schwermetallbehandlung unterzogen. Mit einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstammes werden 2,5 ml LB₀-Medium inokuliert und üN im Schüttelinkubator bei 250 Upm und 37°C inkubiert. Diese Vorkultur wird zu 100 ml LB₀-Medium gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45-0,55 wachsen gelassen, anschließend auf zwei 50 ml Plastikröhrchen aufgeteilt und 5 min auf Eis abgekühlt. Nach einer Zentrifugation (5000 Upm, 10 min, 4°C) werden die sedimentierten Bakterien bei 4°C in 10 ml TFBII resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Durch erneute Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen werden die Bakterien pelletiert und der Überstand dekantiert. Die Bakterien werden bei 4°C in je 2 ml TFBII-Lösung aufgenommen

und aliquotiert (100 µl Aliquots). Die Aliquots werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.1.4.2 Herstellung hocheffizienter transformationskompetenter Bakterien

Für die Amplifikation besonders großer Plasmide (≥ 10 kb) können hocheffiziente transformationskompetente Bakterien verwendet werden. Dazu werden 2 ml LB₀-Medium mit einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstammes inokuliert und üN im Schüttelinkubator (250 Upm, 37°C) inkubiert. Die Vorkultur wird zu 50 ml LB₀-Medium gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45-0,55 unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die 50 ml-Kultur wird in ein 50 ml Röhrchen überführt und 15 min auf Eis abgekühlt. Anschließend werden die Bakterien abzentrifugiert (5.000 Upm, 5 min, 4°C), der Überstand verworfen und die sedimentierten Bakterien bei 4°C in 16 ml TFB resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis werden die Bakterien erneut pelletiert. Der Überstand wird dekantiert, die Bakterien in 4 ml TFB bei 4°C resuspendiert und mit 140 µl DnD versetzt. Es folgt eine 15-minütige Inkubation auf Eis, nach der nochmals 140 µl DnD hinzu gegeben werden. Die hocheffizient transformationskompetenten Bakterien müssen für jede Verwendung frisch hergestellt werden. Pro Ligationsansatz werden 150 µl kompetente Bakterien eingesetzt. Die nachfolgende Transformation verläuft wie unter 3.1.4.3 beschrieben.

3.1.4.3 Durchführung der Transformation

Für die verschiedensten Fragestellungen ist eine Vervielfältigung manipulierter DNS notwendig. Diese Vervielfachung wird durch Transformation – Einführung von Fremd-DNS in Bakterien – erreicht. Die Bakterien müssen dazu in einem transformationskompetenten Zustand vorliegen, der die Aufnahme der DNS durch die Hitzeschock-Methode ermöglicht. 100 µl einer kompetenten Bakteriensuspension (Lagerung bei -70°C) werden auf Eis aufgetaut und mit dem gesamten Ligationsansatz vermischt. Der Ansatz wird auf Eis 30 min inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 90 sec bei 42°C und einer sich anschließenden 5-minütigen Abkühlung auf Eis wird den Bakterien 1 ml LB₀-Medium hinzugefügt. Dieser Reaktionsansatz wird für 1 h unter Schütteln (225 Upm) bei 37°C inkubiert. Innerhalb dieser Zeit wird den transformierten Bakterien ermöglicht die Plasmid-kodierte Antibiotika-Resistenz auszuprägen. Anschließend werden die Bakterien in einer Tischzentrifuge sedimentiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien in 100 µl LB₀-Medium resuspendiert. Der gesamte Ansatz wird unter sterilen Bedingungen mittels eines Drigalski-Spatels auf einer antibiotikumhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen. Nachdem der

Flüssigkeitsfilm auf der Schale getrocknet ist, wird die Schale mit der Oberseite nach unten üN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.1.4.4 Anlegen von Glycerolkulturen

Von einer üN dicht bewachsenen 50 ml Bakterienkultur werden 850 µl abgenommen und mit 150 µl Glycerol (87%) vermischt. Glycerolkulturen können 1-2 Jahre bei -70° aufbewahrt werden. Zu einer Rekultivierung der Kultur wird mit einem zuvor autoklavierten Zahnstocher etwas gefrorenes Material abgekratzt und in 50 ml antibiotikumhaltigem LB-Medium üN bei 250 Upm, 37°C inkubiert.

3.1.5 DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der erzeugten Vektoren werden als Auftragssequenzierungen bei der Firma AGOWA, Berlin durchgeführt. Dazu werden 10 µg DNS in A. bidest gelöst verschickt.

3.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. „polymerase chain reaction“) erlaubt die exponentielle Amplifikation (Mullis und Feloona, 1987) eines bestimmten DNS-Abschnitts. Ein PCR-Zyklus ist charakterisiert durch drei Phasen: Die erste Phase zeichnet sich durch die Denaturierung der DNS bei 95°C aus. In der darauf folgenden zweiten Phase wird die Reaktionstemperatur abgesenkt, um komplementären Oligonukleotiden die Hybridisierung an die DNS-Matrize zu ermöglichen. Diese dienen in der dritten Phase einer thermostabilen DNS-Polymerase als Startermoleküle. Bei 72°C beginnt die Polymerase mit der Synthese des komplementären Doppelstrangs. Durch eine wiederholte Temperaturerhöhung lassen sich neue PCR-Zyklen einleiten.

3.1.6.1 Reaktionsansätze und PCR-Programme zur Überprüfung der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen

Für die Überprüfung der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen mittels PCR-Analysen werden sogenannte „Hotstart“-PCRs durchgeführt, die sich durch einen zusätzlichen 95°C Zyklus auszeichnen. Dieser 95°C Zyklus ermöglicht die Denaturierung der Proteinase K, die im ES-Zelllysat enthalten ist, und ohne diesen Schritt die Aktivität der Taq-Polymerase stören würde. Die Taq-Polymerase wird erst nachträglich während eines 10-minütigen 80°C Schrittes hinzugegeben.

3.1.6.1.1 Cx30T5M

a) Cx30T5M_3'HR-PCR

Reaktionsansatz	
ES-Zelllysat	10 µl
5 x PCR-Puffer	5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	1,5 µl
dNTPs [je 10 mM]	0,25 µl
Cx30testkon_for [100 pmol/ µl]	0,2 µl
Cx30testkonv_rev [100 pmol/ µl]	0,2 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,25 µl
A.bidest	7,6 µl

PCR-Programm		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
95°C	10	1
80°C	10	1
95°C	5	1
95°C	1	40
62°C	1	
72°C	2,5	
72°C	5	1

Die Cx30T5M_3'HR-PCR erlaubt den Nachweis der homologen Rekombination der Austauschvektor-DNS mit dem Genom der embryonalen Stammzellen. War die Rekombination über den 3'homologen Bereich erfolgreich, wird ein etwa 1900 bp großes Fragment synthetisiert.

3.1.6.1.2 Cx30A88V

a) Cx30A88V_3'HR-PCR

Reaktionsansatz	
ES-Zelllysat	10 µl
5 x PCR-Puffer	5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	1 µl
dNTPs [je 10 mM]	0,25 µl
Cx30testfor [100 pmol/ µl]	0,2 µl
Cx30kondrev [100 pmol/ µl]	0,2 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,25 µl
A.bidest	8,1 µl

PCR-Programm		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
95°C	5	1
80°C	10	1
95°C	5	1
95°C	1	40
60°C	1	
72°C	1,5	
72°C	5	1

Nach erfolgreicher Rekombination der Austauschvektor-DNS mit dem ES-Zellgenom über die 3'-Homologieregion wird ein ca. 2300 bp großes Fragment (rekombiniertes Allel) amplifiziert. Für das wtCx30-Allel wird kein Amplikon synthetisiert.

b) Cx30A88V_interne PCR

Reaktionsansatz	
ES-Zelllysat	10 µl
5 x PCR-Puffer	5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	2 µl
dNTPs [je 10 mM]	0,25 µl
loxP in 5'HR [100 pmol/ µl]	0,2 µl
loxP in 3'HR [100 pmol/ µl]	0,4 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,2 µl
A.bidest	6,95 µl

PCR-Programm		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
95°C	5	1
80°C	10	1
95°C	5	1
95°C	1	40
60°C	1	
72°C	1,5	
72°C	5	
72°C	5	1

Durch den Nachweis der loxP-Stelle kann nach erfolgter Rekombination in embryonalen Stammzellen ein rekombiniertes Allel (761 bp) von einem wtCx30-Allel (635 bp) unterschieden werden.

3.1.6.2 Reaktionsansätze und PCR-Programme zur Genotypisierung der Mauslinien

3.1.6.2.1 Cx30T5M-Mauslinie

a) Cx30T5M Δ Neo-PCR

Reaktionsansatz	
DNS	1 µl
5 x PCR-Puffer	5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	2 µl
dNTPs [je 10 mM]	0,2 µl
GenNeofor [100 pmol/ µl]	0,2 µl
GenNeo [100 pmol/ µl]	0,2 µl
GenNeorev [100 pmol/ µl]	0,2 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,2 µl
A.bidest	16 µl

PCR-Programm		
Temperatur	Dauer	Zyklen
94°C	5 min	1
94°C	30 sec	35
60°C	45 sec	
72°C	2	
72°C	10	1

Diese PCR erlaubt die Unterscheidung aller Allele, die in der Cx30T5M-Mauslinie entstehen können. Dabei liefert die PCR bei Vorhandensein der Neomycin-Resistenzkassette im heterozygoten Zustand (Cx30^{+/T5MNeo}) ein wtCx30-Amplikon bei 630 bp und ein Cx30T5MNeo-Amplikon bei 825 bp. Wurde die Neomycinresistenzkassette durch Aktivität der FIp-Rekombinase deletiert, wird anstelle des Cx30T5MNeo-Amplikons ein Cx30T5M-Fragment bei 784 bp amplifiziert.

3.1.6.2.2 Cx30KiCx30A88V-Mauslinie

a) Cx30A88V loxP-PCR

Reaktionsansatz	
DNS	1 µl
5 x PCR-Puffer	5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	2 µl
dNTPs [je 10 mM]	0,25 µl
A88V-loxP-for [100 pmol/ µl]	0,3 µl
A88V-loxP-rev [100 pmol/ µl]	0,3 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,25 µl
A.bidest	15,9 µl

PCR-Programm		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
94°C	5	1
94°C	1	35
60°C	1	
72°C	2,5	
72°C	10	1

Mit dieser PCR ist die Unterscheidung zwischen einem wtCx30-Allel (496 bp) und einem rekombinierten Allel (Cx30A88Vflox, Cx30A88Vflox ΔNeo, Cx30A88V, alle 554 bp) möglich.

b) Cx30A88V ΔNeo-PCR

Reaktionsansatz	
DNS	1 µl
5 x PCR-Puffer	5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	2 µl
dNTPs [je 10 mM]	0,25 µl
A88VdelNeo_for [100 pmol/ µl]	0,2 µl
A88VNeo_rev [100 pmol/ µl]	0,2 µl
A88VdelNeo_rev [100 pmol/ µl]	0,2 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,25 µl
A.bidest	15,9 µl

PCR-Programm		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
94°C	5	1
94°C	1	35
60°C	1	
72°C	2	
72°C	10	1

Diese PCR erlaubt den Nachweis der für Neomycin kodierenden Region. Für das wtCx30- und das Cx30A88V-Allel werden keine PCR-Fragmente amplifiziert. Bei Vorhandensein der Neomycin-Resistenzkassette führt die Cx30A88V ΔNeo-PCR zu einem 706 bp Amplikon und bei Deletion der Neomycin Kodierungsregion zu einem 1127 bp Amplikon.

3.1.6.2.3 Cx26S17F-Mauslinie

a) Cx26S17F loxP-PCR

Reaktionsansatz	
DNS	1 µl
Red Taq™ReadyMix™	12,5 µl
lox-for [100 pmol/ µl]	0,2 µl
lox-rev [100 pmol/ µl]	0,2 µl
A.bidest	11,5 µl

PCR-Programm		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
94°C	5	1
94°C	1	40
57°C	1	
72°C	1	
72°C	10	1

Mit Hilfe der loxP-PCR kann zwischen dem Wildtyp-Allel und den rekombinierten Allelen Cx26S17FfloX und Cx26S17F unterschieden werden. Diese PCR liefert für das wtCx26-Allel ein 250 bp Amplikon, für das Cx26S17FfloX-Allel ein 330 bp Amplikon und für das Cx26S17F-Allel ein 380 bp Amplikon.

b) Cx26S17F ΔNeo-PCR

Reaktionsansatz	
DNS	1 µl
5 x PCR-Puffer	5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	3 µl
dNTPs [je 10 mM]	0,3 µl
3'HR-rev [100 pmol/ µl]	0,25 µl
eGFP-for[100 pmol/ µl]	0,25 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,25 µl
A.bidest	14,95 µl

PCR-Programm		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
94°C	2	1
94°C	1	40
65°C	1	
72°C	2,5	
72°C	5	1

Diese PCR erlaubt den Nachweis der für Neomycin kodierenden Region. Für das wtCx26- und das Cx30S17F-Allel werden keine PCR-Fragmente amplifiziert. Bei Vorhandensein der Neomycin-Resistenzkassette führt die ΔNeo-PCR zu einem 1264 bp Amplikon (Cx26S17FfloX-Allel) und bei Deletion der Neomycin Kodierungsregion zu einem 565 bp Amplikon (Cx26S17FfloX ΔNeo-Allel).

3.1.6.2.4 PCR zum Nachweis der Cre-Rekombinase in transgenen Mäuse

Reaktionsansatz		PCR-Programm		
DNS	1 µl	Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
5 x PCR-Puffer	5 µl	94°C	5	1
MgCl ₂ [25 mM]	2 µl	94°C	1	40
dNTPs [je 10 mM]	0,2 µl	60°C	1	
up-* [100 pmol/ µl]	0,2 µl	72°C	2	
IntCre-rev [100 pmol/ µl]	0,2 µl	72°C	10	1
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,2 µl			
A.bidest	16,6 µl			

Ein vorhandenes Amplikon zeigt die Anwesenheit der kodierenden Region der (spezifischen) Cre-Rekombinase im Genom der untersuchten Mäuse an. *Bei der Genotypisierung der Mäuse mittels der IntCre-PCR wird ein 420 bp Fragment amplifiziert. Das Amplifizieren eines 500 bp Fragements mittels der pgk-Cre-PCR weist spezifisch die Anwesenheit der pgk-Cre Rekombinase nach.

3.1.6.2.5 PCR zum Nachweis der Flp-Rekombinase in transgenen Mäusen

Reaktionsansatz		PCR-Programm		
DNS	1 µl	Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
5 x PCR-Puffer	5 µl	95°C	5	1
MgCl ₂ [25 mM]	2 µl	95°C	0,5	35
dNTPs [je 10 mM]	0,2 µl	68°C	1	
USP-Flp [100 pmol/ µl]	0,2 µl	72°C	1,5	
DSP-Flp [100 pmol/ µl]	0,2 µl	72°C	10	1
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,2 µl			
A.bidest	16,6 µl			

Ein Amplikon von etwa 1,2 kb zeigt die Anwesenheit der kodierenden Region der Flp-Rekombinase im Genom der untersuchten Mäuse an.

3.1.6.3 PCR zur Erzeugung der Cx26 3'-externen Hybridisierungssonde

Reaktionsansatz		PCR-Programm		
DNS	1 μ l	Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
5 x PCR-Puffer	5 μ l	95°C	5	1
MgCl ₂ [25 mM]	1 μ l	95°C	1	30
dNTPs [je 10 mM]	0,2 μ l	60°C	1	
3'Sonde_Cx26for [100 pmol/ μ l]	0,2 μ l	72°C	1	
3'Sonde_Cx26rev [100 pmol/ μ l]	0,2 μ l	72°C	10	1
Taq-Polymerase [5 U/ μ l]	0,2 μ l			
A.bidest	17,7 μ l			

Die PCR liefert ein 580 bp Amplikon, das als 3'-externe Hybridisierungssonde in einer Southern Blot Analyse zum Nachweis der verschiedenen Genotypen der Cx26S17F-Mauslinie eingesetzt wurde. Die Aufreinigung dieses PCR-Fragments erfolgte über ein 1,5%iges Agarosegel und anschließender Gelelution mittels des Reagenziensatzes „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen.

3.1.6.4 Mutagenese-PCR zur Herstellung gezielter Punktmutationen

Eine Mutagenese-PCR erlaubt das Einbringen gezielter Punktmutationen in ein Gen. Diese Methode beinhaltet drei PCR-Reaktionsansätze: Während der ersten beiden PCR-Reaktionen werden Teilstücke der DNS-Sequenz amplifiziert, welche die Mutation enthalten soll. Benötigt werden dazu vier Startermoleküle. Zwei dieser Moleküle hybridisieren außerhalb der kodierenden Region, jeweils 3'- bzw. 5'-wärts der zu amplifizierenden DNS-Sequenz. Die beiden anderen enthalten die ausgetauschte Base und flankierende zueinander komplementäre Sequenzen innerhalb der kodierenden Region. Jeweils ein Startermolekül, das außerhalb der kodierenden Region hybridisiert, wird zusammen mit einem Startermolekül verwendet, das innerhalb der kodierenden Region bindet. Durch eine dritte PCR, der so genannten Fusions-PCR, wird die gesamte kodierende Region amplifiziert, die nun die gewünschte Punktmutation enthält. Dazu werden die Startermoleküle, die die kodierende Region flankieren, und die in den PCRs I und II amplifizierten Teilsequenzen eingesetzt. Wenn möglich wird der Basenaustausch so gewählt, dass eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease des Typ II entsteht. Dies ist hilfreich, um im Verlauf weiterer Arbeitsschritte die Mutation durch Restriktionsspaltung nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde für die PCR-Reaktionen I und II die Taq-DNS-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* eingesetzt. Für die Fusions-PCR wurde das Phusion High Fidelity PCR Kit genutzt. Diese DNS-Polymerase enthält eine

Korrekturlese-Funktion, die den Prozentsatz falsch eingebauter Basen und damit einhergehender ungewollter Mutationen herabsetzt.

Reaktionsansätze			
	PCR I	PCR II	PCR III (Fusions-PCR)
DNS-Matrize (10b1b_pBS Sk_mCx30Genlokus)	1 µl [300ng/µl]	1 µl [300ng/µl]	je 2 µl des geluerten Fragments aus PCR I und II
10x PCR-Puffer	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
dNTPs [je 2,5 mM]	0,5 µl	0,5 µl	1 µl
MgCl ₂ [25 mM]	8 µl	8 µl	–
Cx30for	1 µl	–	1 µl
Cx30A88Vrev	1 µl	–	–
Cx30rev	–	1 µl	1 µl
Cx30A88Vfor	–	1 µl	–
Polymerase [5 U/µl]	0,5 µl Taq-Polymerase	0,5 µl Taq-Polymerase	0,5 µl Phusion-Polymerase
A. bidest	8,5 µl	8,5 µl	14 µl

PCR-Programm		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
94°C	5	1
94°C	1	20
61°C	1	
72°C	1	
72°C	10	1

Die Mutagenese-PCR setzt sich aus drei PCR-Reaktionen zusammen, die jeweils ein PCR-Fragment erzeugen. Die PCR I liefert ein 635 bp Fragment, die PCR II ein 889 bp Fragment und die PCR III amplifiziert ein 1581 bp Fragment, das sich aus den Produkten der ersten beiden PCRs zusammensetzt.

3.1.6.4.1 Nachträgliches Anhängen von Adenosin-Nukleotiden durch die Taq-Polymerase

Mit dem Vektor pGem T-easy ist eine Klonierung ohne vorherige Spaltung durch Restriktionendonukleasen des Typ II über 3'-Thymidin-Überhänge möglich. Dazu benötigt ein PCR-Produkt 5'-Adenosin-Überhänge wie sie beispielsweise durch die Verwendung der Taq-Polymerase entstehen. Diese weist eine matrizenunabhängige Polymeraseaktivität auf, die an den neusynthetisierten Strang eine zusätzliche Base, meist ein Adenosin, anhängt. Wird

ein PCR-Fragment durch eine andere Polymerase amplifiziert, fehlen die zur Klonierung notwendigen Adenosin-Überhänge. Diese können nachträglich an den synthetisierten Strang anhängt werden. Dazu wird das amplifizierte PCR-Produkt über ein Agarosegel aufgereinigt und vollständig für die Synthese der Adenosin-Überhänge verwendet. Der Reaktionsansatz entspricht einem gängigen PCR-Ansatz, doch werden statt gemischter dNTPs 1,5 µl dATPs und 0,5 µl Taq-Polymerase hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird 45 min bei 72°C inkubiert.

3.1.6.5 Reverse Transkriptase PCR Analysen (RT-PCR)

Die RT-PCR dient dem Nachweis kleiner Transkriptmengen. Dafür wird mRNA durch das Enzym MMLV Reverse Transkriptase (isoliert aus Moloney Murine Leukemia Virus) in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wird als Matrize für eine spezifische PCR eingesetzt.

3.1.6.5.1 Herstellung der cDNA

Für die Reverse Transkription werden 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Hinzugefügt wird 1 µl Oligo-dT15 [0,5 µg/µl] und der gesamte Reaktionsansatz wird mit DEPC-Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Die RNA wird für 10 min bei 70°C denaturiert und zur Anlagerung der Startermoleküle 2 min auf Eis abgekühlt. Vor dem Start der reversen Transkription werden die folgenden Komponenten hinzu gegeben: 1 µl dNTPs [je 10 mM], 4 µl 5x Puffer, 2 µl DTT [0,1 M], 1 µl RNasin [40 U/µl] und 1 µl Superskript™ II Reverse Transkriptase [200 U/µl]. Der Ansatz wird bei 42°C für 50 min inkubiert und 15 min bei 70°C denaturiert. Die cDNA kann bei -70°C gelagert werden.

3.1.6.5.2 Amplifikation der cDNA durch PCR

Bei den nachfolgenden PCRs handelt es sich um Temperatur-Erniedrigungs-PCRs. Durch ein stetiges Erniedrigen der Hybridisierungstemperatur der Startermoleküle während der ersten 10 Zyklen um ein Grad werden unspezifische Bindungen der Startermoleküle verringert. Eine Vervielfachung genomischer DNA wird durch intronüberspannende Startermoleküle ausgeschlossen. Nach der PCR-Reaktion werden die amplifizierten DNA-Sequenzen für weitere Analysen auf ein Agarosegel aufgetragen. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der PCR-Reaktion auf das Reporterprotein eGFP (402 bp) und β-Aktin (243 bp, Ausschluß genomischer DNA) getestet. Sollte der PCR-Ansatz durch genomische DNA verunreinigt sein, entsteht für β-Aktin anstelle des 243 bp Fragments, durch die Amplifikation genomischer DNA, ein 87 bp längeres Fragment (330 bp).

Reaktionsansatz	
cDNS	1 µl
5 x PCR-Puffer	10 µl
MgCl ₂ [25 mM]	3 µl
dNTPs [je 2,5 mM]	2 µl
USP Startermolekül [10 µM]	2 µl
DSP Startermolekül [10 µM]	2 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	1 µl
A.bidest	29 µl

PCR-Programm		
Temperatur	Dauer [min]	Zyklen
94°C	3	1
94°C	1	10
65°-55°C	1	
72°C	2	
94°C	1	25
55°C	1	
72°C	2	
72°C	7	
72°C	7	1

3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren dient der qualitativen sowie der quantitativen Analyse von Nukleinsäuren. Dieser Methode liegt die Eigenschaft der negativen Gesamtladung von Nukleinsäuren zu Grunde, die auf die zwischen den Zuckerresten des Nukleinsäurerückgrats liegenden Phosphatgruppen zurückzuführen ist. Aufgrund dessen wandern Nukleinsäuren im elektrischen Feld zur Anode. Die Größen der aufgetrennten Fragmente lassen sich durch Vergleich mit Molekülen bekannter Länge (Größenstandard) bestimmen.

3.1.7.1 Native Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNS im Bereich zwischen 100 bp und 20 kb wird Agarose als Matrix unter nativen Bedingungen verwendet. Je nach Größe der zu analysierenden DNS-Fragmente werden Gelkonzentrationen von 0,7 – 2,0% hergestellt. Dazu wird Agarose in 0,75x TBE-Puffer in der Mikrowelle zum Schmelzen gebracht. Vor dem Abkühlen wird die Agaroselösung mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt und in vorbereitete Gelträger mit Probenauftragekämmen, die später Geltaschen bilden, gegossen. Den aufzutragenden DNS-Proben und dem Größenstandard wird so viel DNS-Ladepuffer hinzugegeben, bis die Lösungen in 1x Ladepuffer vorliegend in die Geltaschen pipettiert werden können. Nach der Elektrophorese lassen sich die aufgetrennten Banden durch das in die DNS interkalierte Ethidiumbromid, an einem UV-Transilluminator dokumentieren.

3.1.7.2 Denaturierende Gelelektrophorese von RNS

Ribonukleinsäuren liegen meist einzelsträngig vor und nehmen bevorzugt energetisch günstige Zustände ein. Diese Sekundärstrukturen, in denen die RNS mit bestimmten Sequenzabschnitten hybridisiert, beeinflussen das Auftrennungsverhalten während der Gelelektrophorese. Deswegen werden für die Auftrennung der RNS denaturierende Agarosegele verwendet. Dabei

handelt es sich um 1% Agarosegele, die mit 0,9% Formaldehyd versetzt sind. Zu 20 µg der RNS-Proben werden 2 µl Formaldehyd (37%), 5 µl Formamid deionisiert, 1 µl 10x Mops-Puffer und 1 µl Ethidiumbromid (400 µg/µl) zugefügt. Es folgt eine 15-minütige Denaturierung der RNS bei 65°C. Die Proben werden auf Eis abgekühlt, bevor ihnen 2 µl 10x RNS-Ladepuffer zugegeben werden und sie auf das Gel aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgt in 1x MOPS-Puffer bei 4°C unter ständiger Pufferumwälzung. Die Laufstrecken der ribosomalen RNS (28S = 4,7 kb und 18S = 1,9 kb, 5,8S = 150 bp) und des RNS-Standards werden mit dem UV-Transilluminator dokumentiert.

3.1.8 Gelelution mit kommerziellen Reagenziensätzen

Die gewünschten DNS-Fragmente werden unter UV-Licht (365 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNS erfolgte nach Herstellerangaben. Verwendet wurden die Reaktionssätze Perfect Gel Cleanup Kit, (Eppendorf) und QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen).

3.1.9 Southern Blot Hybridisierungen

Bei einer Southern Blot Analyse (Southern, 1975) wird die DNS nach Restriktionsspaltung durch die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, denaturiert und auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Durch eine geeignete Wahl der Restriktionsendonukleasen und Sonden kann ein DNS-Fragment auf der Membran spezifisch nachgewiesen werden.

3.1.9.1 Restriktionsspaltung, Agarose-Gelelektrophorese und Transfer von DNS auf eine Nylonmembran (Southern Blot)

20 µg genomische DNS werden unter Gebrauch von 2 µl konzentriertem Restriktionsenzym (40 U/µl) üN bei 37°C gespalten, über ein 0,8%iges Agarosegel (Agarose gelöst in TBE-Puffer) üN bei 30 V aufgetrennt und danach mit einem fluoreszierendem Lineal unter dem Transilluminator dokumentiert. Anschließend wird die DNS im Agarosegel für 10 min bei RT depuriniert (Depurinierungslösung), kurz mit A. bidest gewaschen und daraufhin in Denaturierungslösung 30 min bei RT inkubiert. Die DNS wird über einen Kapillarblot (Southern Blot) auf eine positivgeladene Nylonmembran (Hybond N+ Membran) transferiert. Dazu wird eine Melaminschale mit Denaturierungslösung gefüllt und eine Glasplatte quer darübergerlegt. Als Brücke wird ein in Denaturierungslösung getränktes Whatmanpapier so auf die Glasplatte gelegt, das beide Enden in die Denaturierungslösung eintauchen. Auf das Whatmanpapier wird nun das Agarosegel gelegt und die ebenfalls in Denaturierungslösung getränkte Membran luftblasenfrei aufgebracht. Die Membran wird mit zwei durchtränkten Whatmanpapieren in Gelgröße abgedeckt. Mit Frischhaltefolie werden die Glasplatte und

die Brücke abgedichtet, so dass der Kapillarsog nur durch das Gel erfolgen kann. Um den Kapillarsog zu ermöglichen, wird ein ca. 15 cm hoher Stapel Papiertücher (Tork) auf den Aufbau gelegt und mit einer Glasplatte und einem Gewicht von ca. 1 kg beschwert. Der Transfer auf die Nylonmembran erfolgt üN. Danach werden die Positionen der Geltaschen auf der Membran markiert, die Membran in 2x SSC kurz gewaschen, luftgetrocknet und die DNS anschließend durch UV-Licht (12 s) auf der Membran quervernetzt.

3.1.9.2 Erzeugung radioaktiv markierter Sonden

Für die Herstellung radioaktiv markierter DNS wird der Reagenziensatz Megaprime DNS Labelling System von Amersham verwendet. Die Markierung der Sonde erfolgt dabei durch ein Gemisch hexamerer Startermoleküle mit zufälliger Sequenz in Anwesenheit von [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTPs (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) in einer Klenow-Reaktion. Dazu wird eine durch Restriktionsspaltung eines Plasmids oder eine PCR-Reaktion gewonnene Sonde über ein Agarosegel aufgereinigt, aus dem Gel eluiert und die DNS-Konzentration des Eluats bestimmt. Zu 50 ng der Sonden-DNS werden 5 μl hexamere Startermoleküle hinzugegeben und mit A. bidest auf 35 μl aufgefüllt. Der gesamte Ansatz wird dann für 5 min bei 100°C erhitzt, weitere 5 min auf Eis gekühlt und mit 10 μl Markierungspuffer – enthält nicht radioaktives dATP, dGTP und dTTP – versetzt. Außerdem werden dem Reaktionsansatz 2 μl [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTPs (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) und 2 μl Klenow-Polymerase (1 U/ μl) hinzugefügt und der Ansatz 45 min bei 37°C in einem Heizblock inkubiert. Nach der Inkubation wird die Sonde mit 150 μl TE-Puffer verdünnt und über eine Sephadex G50 Säule aufgereinigt, dabei werden freie, radioaktive Nukleotide entfernt. Die Säule wird aus einer 1 ml Spritze hergestellt, die mit silikonisierter Glaswolle abgedichtet und mit Sephadex G50 überschichtet wird. Anschließend wird die Säule in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen gestellt und das Säulenmaterial durch Zentrifugation (5 min, 1000 Upm, RT) verdichtet. Der Durchfluss wird in einem 1,5 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäß, das sich im Zentrifugationsröhrchen befindet, aufgefangen und verworfen. Der gesamte Sondenansatz wird auf die Säule gegeben und für 5 min bei 1000 Upm und RT zentrifugiert. Die radioaktiv markierte Sonde wird in einem neuen 1,5 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäß aufgefangen. 1 μl der Sonde wird in einem Szintillationszähler vermessen. Der verbleibende Sondenansatz wird vor der Hybridisierung der Membran 5 min bei 100°C denaturiert und kurz auf Eis abgekühlt.

3.1.9.3 Nukleinsäure-Hybridisierung und Nachweis der gebundenen Sonden über Autoradiographie

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wird die Membran vor Zugabe der radioaktiv markierten Sonde drehend für 1 h bei 68°C in Hybridisierungspuffer (QuickHyb®,

Stratagene) inkubiert. Die angefeuchtete Membran wird hierzu luftblasenfrei in eine Hybridisierungsröhre gelegt und 12 ml vorgewärmte Hybridisierungslösung werden beigefügt. Die eigentliche Hybridisierung erfolgt nach Zugabe der denaturierten radioaktiv markierten Sonde bei 68°C für 2-3 h im Rollinkubator.

Nach der Hybridisierung werden unspezifisch haftende Sondenmoleküle durch mehrmaliges Waschen bei 55°C mit SSC-Waschlösung und abnehmender Salzkonzentration (2x SSC/ 0,1% SDS, 1x SSC/ 0,1% SDS, 0,5x SSC/ 0,1% SDS, 0,1x SSC/ 0,1% SDS) entfernt. Die Abnahme der Radioaktivität auf der Membran wird nach jedem Waschschrift mit einem Handmessgerät kontrolliert. Nach dem letzten Waschschrift wird die Membran in Folie eingeschweißt, in eine Röntgenfilmkassette gelegt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionszeit des Films variiert zwischen zwei Tagen und zwei Wochen bei -70°C abhängig von der Signalstärke. Der Film wird in einer Entwicklermaschine (Curix 60, AGFA) entwickelt.

Nach der Entwicklung des Films kann die Membran für eine erneute Hybridierung mit einer anderen Sonde verwendet werden. Zum Entfernen der ersten Sonde wird die Membran 20 min in 2x SSC gekocht und anschließend die Abnahme der Radioaktivität mit einem Handmessgerät kontrolliert. Die Blockierung, Hybridisierung und Entwicklung der Membran erfolgt wie unter 3.1.9.3 beschrieben.

3.2 Kultivierung embryonaler Stammzellen der Maus

3.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Linie HM1 wurden aus agoutifarbenen, männlichen Blastozysten des Mausstammes Sv129P2/OlaHsd (Magin et al., 1992) isoliert. Diese ES-Zellen wachsen in Gegenwart des Leukämie-inhibierenden Faktors (LIF), der einer Differenzierung der ES-Zellen entgegenwirkt, auf gelatinisierten Kulturgefäßen. Alle Arbeiten zur Kultivierung der ES-Zellen werden unter Sterilbänken mit Laminar-Luftstrom nach den üblichen Methoden der Zellkultur durchgeführt. Die Kultivierung der ES-Zellen erfolgt in Inkubatoren in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. HM1-ES-Zellen werden in ES-WT-Medium kultiviert, welches täglich gewechselt wird. Bei einer Konfluenz von ca. 90-95% werden die ES-Zellen passagiert und mit einer geeigneten Verdünnung auf gelatinisierte Kulturgefäße ausgesät. Angaben über Kultur, Transfektion und Analyseverfahren von ES-Zellen wurden von Theis et al. (2000) detailliert beschrieben.

3.2.2 Passagieren von ES-Zellen der Maus

Das ES-WT-Kulturmedium wird abgenommen und der Zellrasen zweimal mit PBS⁻ gewaschen, um alle Mediumrückstände und tote ES-Zellen zu entfernen. Anschließend folgt ein Waschschrift mit 1/6 des Kulturvolumens ES-Trypsin, um PBS⁻-Rückstände zu beseitigen. Das Ablösen der adhärennten Zellen vom Kulturgefäßboden erfolgt durch Zugabe von 1/6 Kulturvolumen ES-Trypsin und einer Inkubation für 5 min bei 37°C. Durch Klopfen an die Gefäßwand werden die Zellen vereinzelt. Die Reaktion wird durch Zugabe des zweifachen Volumens Kulturmedium abgestoppt und die Zellen anschließend durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 800 Upm und RT pelletiert. Das Zellpellet wird nach Verwerfen des Überstandes in einem geeigneten Volumen frischen WT-Kulturmediums aufgenommen und in der gewünschten Konzentration auf gelatinisierte Kulturgefäße ausgesät.

3.2.3 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen der Maus

ES-Zellen eines konfluent bewachsenen Kulturgefäßes (90-100%) werden wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, trypsiniert und die Reaktion mit ES-WT-Medium abgestoppt. Nach der Zentrifugation (5 min, 800 Upm, RT) werden die pelletierten Zellen in ES-WT-Kulturmedium resuspendiert. Das gleiche Volumen ES-Einfriermedium wird hinzugegeben und der Ansatz gründlich durchmischt. Je 1 ml der Zellsuspension wird in eine Einfrierampulle gegeben und mindestens einen Tag in einem mit eiskaltem Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter bei -70°C inkubiert, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, in das zuvor 9 ml ES-WT-Kulturmedium vorgelegt wurden. Um das DMSO zu entfernen, das im ES-Einfriermedium enthalten ist, werden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 800 Upm, RT) sedimentiert. Die pelletierten Zellen werden nach Verwerfen des Überstandes in einem geeigneten Volumen ES-WT-Medium aufgenommen und auf gelatinisierten Kulturschalen ausgesät.

3.2.4 Elektroporation der ES-Zellen

Die stabile Transfektion von HM1-ES-Zellen erfolgt durch Elektroporation mit linearisierter DNS. Hierzu werden 200-350 µg des aufgereinigten Austauschvektors (EndoFree Plasmid Maxi Kit, Quiagen) durch eine Restriktionsspaltung linearisiert, gefällt und in 100 µl Endotoxin-freiem TE-Puffer aufgenommen. Die ES-Zellen möglichst niedriger Passagenzahl (Passage 15) einer konfluent bewachsenen T75 Zellkulturflasche werden wie unter Abschnitt 3.2.2 beschrieben, trypsiniert und anschließend in 7 ml ES-WT-Medium gut resuspendiert. Die Zellen sollten vereinzelt vorliegen. Die Konzentration der Zellsuspension wird mit Hilfe

einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Danach werden die Zellen sedimentiert (5 min, 800 Upm, RT) und nach der Zentrifugation durch Zugabe von 1x HBS-Puffer auf eine Konzentration von 30 Millionen Zellen pro 800 µl gebracht. Die linearisierte Vektor-DNS wird mit 800 µl der Zellsuspension vermischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgt durch einen Stromimpuls von 0,8 kV mit einer Kapazität von 3 µF (Gene Pulser, Biorad). Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT werden die Zellen in 20 ml ES-WT-Kulturmedium resuspendiert und in unterschiedlichen Verdünnungen (4 x 0,5 ml, 12 x 1 ml, 4 x 1,5 ml) auf gelatinisierten 10 cm Schalen (Endvolumen 10 ml) ausgesät. Zur Überprüfung der Wirksamkeit des Selektionsmediums werden als Kontrolle nicht-transfizierte Zellen mit Selektionsmedium kultiviert. Das Wachstum der ES-Zellen nach der Transfektion wird durch die Kultivierung transfizierter ES-Zellen mit Wildtyp-Nährmedium überprüft.

3.2.5 Selektion auf stabile Integration und homologe Rekombination

24 h nach der Elektroporation werden die ES-Zellen auf die Expression des im Austauschvektor enthaltenden Neomycin-Resistenzgens selektioniert. Das ES-WT-Medium wird durch G418-haltiges ES-Zellmedium ersetzt und alle 2-3 Tage gewechselt. Nach etwa 5 Tagen sind die meisten ES-Zellen, bei denen keine Aufnahme des Resistenzgens stattgefunden hat, abgestorben und die ersten Klone werden unter dem Lichtmikroskop sichtbar. Nach etwa 10 Tage erreichen die ES-Zellklone eine Größe, die die Isolation unter dem Mikroskop ermöglicht. Dazu werden einzelne Klone mit Hilfe einer 200 µl Kolbenhubpipette vom Schalenboden abgekratzt und zusammen mit 100 µl Medium in eine gelatinisierte 48-Lochplatte überführt, vereinzelt und bis zum Erreichen der Konfluenz mit ES-WT-Kulturmedium in einem Brutschrank inkubiert. Beim ersten Passagieren der Zellen auf eine 24-Lochplatte wird 1/3 der Zellsuspension abgenommen und zur Gewinnung genomischer DNS (vgl. Abschnitt 3.1.1.4.1) eingesetzt. Die Isolierung der genomischen DNS ermöglicht eine schnelle Charakterisierung der Zellen durch PCR-Analysen hinsichtlich einer erfolgten homologen Rekombination. PCR-positive Zellen werden schrittweise bis zu drei konfluent bewachsene T25-Kulturflaschen expandiert. Die Zellen der einen T25-Zellkulturflasche werden wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben eingefroren, während die Zellen der zweiten T25-Zellkulturflasche zur Isolierung genomischer DNS für die Southern Blot Analyse (vgl. Abschnitt 3.1.1.4.2) und die der dritten T25-Zellkulturflasche zur Karyotypanalyse eingesetzt werden.

3.2.6 Karyotypanalyse

Für die Karyotyp-Analyse werden Zellen einer konfluent bewachsenen T25-Zellkulturflasche durch eine 50-minütige Inkubation mit Colchizin bei 37°C und 5% CO₂ in der Metaphase der Mitose arretiert. Anschließend werden die ES-Zellen zweimal mit PBS⁻ gewaschen, trypsinisiert und in einem 50 ml Reaktionsgefäß pelletiert (5 min, 800 Upm, RT). Das Zellpellet wird dann in 1 ml isotonischer KCl-Lösung resuspendiert, die zum osmotischen Anschwellen der Zellen führt. Nach erneuter Sedimentation der Zellen werden diese in einem frisch angesetzten, eisgekühlten Gemisch aus Methanol und Eisessig (3:1) 5 min bei RT fixiert und erneut pelletiert. Die zweimalige Wiederholung dieses Vorgangs verstärkt die Fixierung der Zellen. Nach einer letzten Sedimentation werden die ES-Zellen in 1-2 ml Methanol/ Eisessig-Gemisch resuspendiert und mit einer Pasteurpipette aus einer Höhe von 10-20 cm auf gereinigte Objektträger aufgetropft. Die nach dem Auftropfen freiliegenden Chromosomen können durch eine Giemsa-Lösung (1 min, RT) angefärbt werden. Die Differenzierung erfolgt durch mehrmaliges Waschen mit Leitungswasser. Nach dem Trocknen der Objektträger werden diese mit Entellan eingedeckelt und die Chromosomen unter einem Mikroskop (Axiophot, Zeiss) ausgezählt.

3.3 Zucht und Haltung von Mäusen

Die Mäuse werden in offenen Tierställen bei einem konstanten Hell/Dunkel Rhythmus von 12/12 Stunden mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Für Verpaarungen wird ein Männchen gemeinsam mit 1-2 Weibchen in einem Käfig gehalten. Der Erfolg einer Verpaarung kann zu Beginn der nächsten Hellphase anhand eines Vaginalpfropfes in der Vagina des Weibchens, der durch koagulierte Proteine der männlichen Samenflüssigkeit gebildet wird, erkannt werden.

3.3.1 Blastozysteninjektion und Uterustransfer

3.3.1.1 Superovulation von Blastozysten-Spendertieren

Für die Superovulation werden den C57BL/6 Weibchen vor Einsetzen des natürlichen Zyklus im Alter von 4 Wochen jeweils 100 µl FSH-Lösung (50 U/ml) intraperitoneal injiziert. Nach zwei Tagen wird der Eisprung durch eine intraperitoneale Injektion von 100 µl hCG-Lösung (humanes Chorion-Gonatotropin, 50 U/ml) synchron ausgelöst. Daraufhin werden die superovulierten Weibchen für eine Verpaarung eingesetzt und der Erfolg der Verpaarung am nächsten Morgen bestimmt (Tag 0,5). Bei Weibchen, die einen Vaginalpropf aufweisen, werden die Blastozysten nach drei Tagen isoliert (Tag 3.5).

3.3.1.2 Blastozysteninjektion und Uterustransfer

Die Erzeugung chimärer Mäuse wurde detailliert von Nagy et al. (2003) beschrieben. Die Injektion der embryonalen Stammzellen mit den Genotypen $Cx30^{+/T5MN^{Neo}}$ bzw. $Cx30^{+/floxA88V}$ in Blastozysten sowie der Transfer der manipulierten Blastozysten in die Uteri scheinschwangerer NMRI Weibchen wurden von Christine Siegmund, AG Prof. Willecke, Institut für Genetik, Universität Bonn durchgeführt.

Bei genetisch veränderten Mäusen, die aus homolog rekombinierten ES-Zellen entstanden sind, kann die Fellfarbe als genetischer Marker zur Identifikation nach der Blastozysteninjektion genutzt werden (Nagy et al., 2003). Die HM1 Wildtyp-ES-Zellen (Magin et al., 1992), die in dieser Arbeit zur Erzeugung der Mauslinien verwendet wurden, stammen aus dem Mausstamm 129P2/OlaHsd. Mäuse dieses Stammes prägen die Fellfarbe agouti aufgrund einer Inhibition der Melaninproduktion in den Haarfollikeln dominant aus. Die manipulierten Blastozysten stammen von C57BL/6 Weibchen – Fellfarbe schwarz. Der Fellfarbenschimärismus (agouti zu schwarz) gibt Auskunft über den Anteil der transferierten ES-Zellen an der Entwicklung der Nachkommen. Die Keimbahngängigkeit der veränderten ES-Zellen wird durch Verpaarung der Chimären mit C57BL/6 Mäusen überprüft. So weist das Auftreten agoutifarbener Nachkommen die Keimbahntransmission nach. Diese werden nach einer Genotypisierung mittels PCR und Verpaarung mit C57BL/6 Mäusen zur Etablierung der neuen Mauslinien eingesetzt.

3.4 Immunoblotanalysen

3.4.1 Herstellung von Gewebelysaten

Den durch zervikale Dislokation getöteten Mäusen werden die zu untersuchenden Organe (z. B. Gehirn, Leber, Niere) entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebe können bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert werden. Die gefrorenen Gewebe werden in einem geeigneten Volumen 2x Complete (Proteinaseinhibitor in A. bidest) aufgenommen und mittels eines Ultraschallstabs in 3 Zyklen je 15 Sekunden homogenisiert. Zwischen den einzelnen Zyklen sollten die Proben immer wieder auf Eis gehalten werden. Anschließend werden unlösliche Geweberückstände 5 min bei 13000 Upm und 4°C sedimentiert und der Überstand in ein 1,5 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung können die Proteinlysate bei -70°C gelagert werden.

3.4.2 Herstellung von Cochlea-Proteinlysaten

Aufgrund der geringen Proteinmenge, die aus einer Maus-Cochlea isoliert werden kann, sollten mindestens 6-10 Cochleaen je Genotyp präpariert werden. Die Cochleaen werden in einem 2 ml Rundboden-Mikroreaktionsgefäß auf Trockeneis gesammelt und nach Zugabe der letzten Cochlea in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Cochleaen können nun bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert werden. Zur Erzeugung der Cochlea-Proteinlysate werden 50-100 µl 2x Complete gelöst in A. bidest zu den Cochleaen gegeben und die Cochleaen mittels des Ultraschallstabes (3-4 Zyklen je 15 Sekunden) homogenisiert. Die Cochlealysate sollten zwischen den einzelnen Zyklen stets auf Eis gehalten werden. Unlösliche Knochenrückstände werden sedimentiert (15 min, 13000 Upm, 4°C) und der Überstand in ein 1,5 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Analyse können die Cochlea-Proteinlysate bei -70°C gelagert werden. Zu beachten ist, dass die so gewonnene Proteinkonzentration nur für 1-2 Immunoblotanalysen ausreicht.

3.4.3 Herstellung von Haut-Proteinlysaten

Einer durch zervikaler Dislokation getöteten Maus wird der Schwanz abgenommen und dieser mit einem Skalpell von der Schwanzwurzel bis zur Schwanzspitze eingeschnitten. Mit dem Skalpell wird die Haut vorsichtig abgelöst und sofort auf Trockeneis eingefroren. Anschließend wird die Haut unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff zermörsert. Das Gewebepulver wird in ein 2 ml Rundboden-Mikroreaktionsgefäß überführt, mit 300 µl 2x Complete versetzt und mit dem Ultraschallstab in 3 Zyklen je 15 Sekunden gelöst. Haare und andere unlösliche Rückstände werden pelletiert (5 min, 13000 Upm, 4°C). Der Überstand wird in ein frisches Mikroreaktionsgefäß überführt und kann bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert werden.

3.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten wird der Reaktionsatz „Bichinonic Acid Kit for Protein Determination“ der Firma Sigma verwendet. Proteine besitzen die Eigenschaft, Kupfersulfat zu reduzieren, welches dann mit BCA einen violetten Komplex bildet. Das Absorptionsmaximum des Komplexes liegt bei 562 nm. Die photometrisch gemessene Absorption bei 562 nm ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. Die Messung wird gegen eine Eichkurve bekannter Proteinkonzentration (BSA-Lösung 0, 20, 40, 60, 80, 100 mg/ml) als Referenz durchgeführt.

3.4.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche, denaturierende SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) erlaubt eine Auftrennung von Proteinen in Relation zu ihrem Molekulargewicht. Sie beruht auf der Wanderung geladener Moleküle im elektrischen Feld. Den Proben wird eine entsprechende Menge 4x SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer) hinzugefügt. Dieser enthält den Farbstoff Bromphenolblau zur Markierung der Lauffront und das Detergenz SDS. Dieses lagert sich aufgrund seiner lipophilen Reste an die Proteine an und maskiert mit seinen negativen hydrophilen Resten die Nettoladung des Proteins, so dass durch eine negative Gesamtladung die Wanderung zur Anode erfolgt. Das im Laemmli-Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol, reduziert intra- und intermolekulare Disulfidbrücken.

Durch eine diskontinuierliche Gelelektrophorese wird eine bessere Auflösung der Proteinbanden erreicht. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Polyacrylamid-Gelen (Trenngel und Sammelgel), die sich in pH-Wert und Vernetzung des Polyacrylamids (Porengröße des Gels) unterscheiden, wird erreicht, dass das Proteingemisch auf eine Bande fokussiert wird (Sammelgel). Im Trenngel findet anschließend die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht statt.

Zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele werden Gel-Gießvorrichtungen der Firma BioRad verwendet. Zunächst wird das Trenngel (Zusammensetzung siehe Tab. 3.4) zwischen zwei durch Plastikschienen getrennte Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation wird die SDS-Lösung entfernt und ein Kamm eingesetzt, der die Taschen für die Proteinproben formt. Das Sammelgel wird möglichst luftblasenfrei eingefüllt. Nach Aushärten des Polyacrylamids wird das Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt, die mit Elektrophoresepuffer befüllt wird. Vor dem Auftragen der Proben wird der Kamm entfernt. Zusätzlich zu den Proteinproben (100-120 μ g Protein) wird ein Größenstandard als Referenz aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel. Die Elektrophorese verläuft unter ständiger Wasserkühlung. Erreicht die Lauffront die Grenze des Trenngels, wird die Stromstärke auf 25 mA erhöht.

Zusammensetzung	Trenngel (12%)	Sammelgel (4%)
Acrylamid	6,0 ml	1,3 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml	–
Sammelgelpuffer	–	2,5 ml
A. bidest	5,25 ml	6,2 ml
APS (10%)	90 µl	60 µl
TEMED	9 µl	6 µl

Tab. 3.1: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese

3.4.6 Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran

Ein Western Blot ermöglicht den Transfer der durch diskontinuierliche Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Sambrook et al. 1989). Diese Membran bindet die Proteine und erlaubt bei der Durchführung eines Immunoblots (siehe 3.7.1.7) einen Nachweis der gebundenen Proteine durch spezifische Antikörper. Nach der Gelelektrophorese wird der Blot nach dem so genannten „Sandwich-Verfahren“ aufgebaut: Schaumstoff, Whatman-Papier, Polyacrylamidgel, Hybond-ECL-Nitrozellulosemembran, Whatman-Papier, Schaumstoff. Dieser Aufbau wird durch zwei Plastikplatten zusammengehalten und in eine mit 1x Transferpuffer gefüllte Transferkammer gestellt. Dabei zeigt die Membran zur Anode. Der Transfer erfolgt bei 4°C und 100 V für 2 h und kontinuierlicher Pufferumwälzung.

3.4.7 Immunoblotanalyse mittels Chemilumineszenz (ECL)

Proteine werden durch Bindung eines spezifischen Primärantikörpers nachgewiesen, dessen spezienspezifische Immunglobulin-Reste von einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper erkannt werden. Dieses Enzym spaltet ein Substrat unter Freisetzung von Lichtquanten, die einen Röntgenfilm schwärzen. Die Nitrozellulosemembran wird 1 h bei RT mit WB-Blockierungslösung inkubiert. Dann wird die Membran zusammen mit dem in WB-Blockierungslösung verdünnten Primärantikörper in eine Plastikfolie eingeschweißt und üN auf einem Sonnenrad bei 4°C oder 3 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die Membran aus der Plastikfolie entnommen, zweimal 5 min und zweimal 10 min mit Waschblotpuffer gewaschen. Nach diesem Waschvorgang folgt eine 45-minütige Inkubation der Membran in WB-Blockierungslösung, die mit sekundären Antikörpern versetzt ist. Überschüssige Antikörper werden nach zweimaligem Waschen für 5 min und zweimaligem Waschen für 10 min mit Waschblotpuffer entfernt. Die Membran wird anschließend 5 min im Dunkeln in 4 ml frisch angesetzter Chemilumineszenzlösung inkubiert und zwischen zwei Plastikfolien in eine Röntgenkassette gelegt. Fotofilme werden in Abhängigkeit der

Signalstärke zwischen 5 sec und 1 h der Chemilumineszenz ausgesetzt und anschließend entwickelt (Entwicklermaschine Curix 60, AGFA).

3.4.8 Entfernung gebundener Antikörper von Nitrozellulosemembranen

Nitrozellulosemembranen stehen nach Entfernung der bereits gebundenen Antikörper für weitere Analysen zur Verfügung. Hierzu wird nach Herstellerangaben das „Restore® Western Blot Stripping Kit“ der Firma Pierce eingesetzt.

3.4.9 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Brilliant-Blue™

Nach einer Gelelektrophorese oder nach einem Immunoblot-Transfer können die Proteine bis zu einer Nachweisgrenze von 50 ng auf dem Gel angefärbt werden. Dazu legt man das Proteingel in eine Schale mit Coomassie Brilliant Blue™-Färbelösung und inkubiert es 15 min auf einer Wippe bei RT. ÜN wird das Gel in Coomassie-Entfärberlösung gelegt (RT, Wippe). Die Entfärberlösung muss mehrmals gewechselt werden, bis die Proteinbanden sichtbar werden.

3.4.10 Ponceau-Färbung

Ein Transfer von Proteinen auf eine Membran lässt sich durch die reversible Ponceau-Färbung auf seine Effizienz überprüfen. Die Membran wird dazu 2 min in Ponceau-Färbelösung inkubiert und anschließend mit Leitungswasser entfärbt. Proteinbanden sind auf der Membran rot angefärbt.

3.5 Herstellung von Gewebeschnitten

3.5.1 Ganzkörperperfusion von Mäusen

Vor der Entnahme der Organe zur Herstellung von Paraffin-, Kryo- oder Vibratomschnitten werden die Mäuse durch Ganzkörperperfusion fixiert. Dazu wird den Mäusen zunächst mittels intraperitonealer Injektion eine lethale Dosis Anästhetikum (Xylazin/ Ketamin) verabreicht. Sobald die Tiere bewusstlos sind, wird der Brustkorb geöffnet und eine Schmetterlingskanüle in die linke Herzkammer gestochen. Um das Ausfließen des Blutes zu ermöglichen, wird das rechte Atrium geöffnet. Daraufhin wird über die Schmetterlingskanüle das Gefäßsystem mit 50 ml PBS⁻ durchspült und nachfolgend das Gewebe von innen heraus fixiert. Die Fixierungslösungen, die durch das Gefäßsystem gespült werden, können je nach Art der späteren Anwendung variieren. Für eine β -Galaktosidase-Nachweisreaktion eignet sich besonders gut 0,2%ige Glutaraldehyd-Lösung, während für indirekte Immunfluoreszenzanalysen ein Gemisch aus 2% PFA und 0,2% Glutaraldehyd in PBS⁻ zu

bevorzugen ist. Nach der Entnahme der Organe werden diese in der jeweiligen Fixierungslösung üN bei 4°C nachfixiert.

3.5.2 Herstellung von Gefrierschnitten

3.5.2.1 Allgemeine Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Herstellung von Gefrierschnitten für indirekte Immunfluoreszenzanalysen oder histologische Färbungen werden frische, auf Trockeneis eingefrorene oder bei -70°C gelagerte Organe verwendet. Optional kann vor dem Einbetten frischer Organe eine Kryoprotektion mittels einer aufsteigenden Sucrosereihe (10%, 20%, 30%, Inkubation jeweils üN) durchgeführt werden. Die Organe werden auf einer Kälteplatte mittels eines speziellen zuckerhaltigen Einfriermediums (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura) eingebettet und auf eine Trägerplatte aufgeklebt. Mit einem Gefriermikrotom werden 10-30 µm dicke Schnitte gefertigt. Um eine optimale Schnittqualität zu erreichen, sollte für jedes Präparat individuell die Kammer- und Objekttemperatur eingestellt werden. Im Normalfall liegt diese zwischen -20 und -25°C. Die Gefrierschnitte werden auf beschichtete Objektträger (Super Frost, Menzel-Gläser) aufgezogen, ca. 1 h bei RT getrocknet und bei -70°C gelagert.

3.5.2.2 Herstellung von Haut-Gefrierschnitten

Die Schwanzhaut wird mit einem Skalpell zügig abpräpariert, in etwa 0,5-1 cm lange Abschnitte zerteilt und in einem Tropfen Einfriermedium (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura) luftblasenfrei auf Trockeneis eingefroren. Dabei sollte die Wuchsrichtung der Haare markiert werden. Die Präparate können über einen längeren Zeitraum bei -70°C gelagert werden. Für die Fertigung der Haut-Gefrierschnitte sollten die Präparate mit Einfriermedium so auf der Trägerplatte aufgeklebt werden, dass die Haut in Haarwuchsrichtung geschnitten wird. Dies verhindert das Abbrechen der Haare und das Einreißen des Stratum corneums. Mit einem Gefriermikrotom werden 14-20 µm dicke Schnitte gefertigt und auf Super Frost-Objektträgern (Menzel-Gläser) aufgenommen. Nach Lufttrocknung der Schnitte erfolgt die Lagerung bei -70°C.

3.5.2.3 Herstellung von Cochlea-Gefrierschnitten

Nach einer Ganzkörperperfusion werden die Cochleae entnommen, das Felsenbein entfernt und mit einer sehr dünnen Kanüle das runde Fenster und das ovale Fenster geöffnet. Dies ermöglicht das Eindringen der Fixierungslösung (vgl. abschnitt 3.5.1) während der Nachfixierung der Cochleae üN bei 4°C. Die Inkubation erfolgt in 1,5 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäßen auf einem sich sehr langsam drehenden Sonnenrad. Anschließend werden

die Cochleaen zweimal für 1 h mit PBS⁻ gewaschen und in 10% EDTA (in PBS⁻, pH 7,4) dekalzifiziert. Die Dauer der Dekalzifikation variiert je nach Alter der Tiere. Bei P6-P14 alten Tieren reicht eine Inkubation von 24 h aus, bis P21 verlängert sich die Inkubationszeit auf 36 h und Cochleaen adulter Tiere sollten zweimal 48 h dekalzifiziert werden. Nach der Dekalzifizierung werden die Cochleaen erneut mit PBS⁻ gewaschen und anschließend für je 2 h in 10% und 20% Sucrose inkubiert. Nach einer Inkubation in 30% Sucrose üN können die Cochleaen wie in Abschnitt 3.5.2.1 beschrieben, eingebettet werden.

3.5.3 Herstellung von Paraffinschnitten der Cochlea

Die Cochleaen werden, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, nach der Ganzkörperperfusion entnommen, nachfixiert, dekalzifiziert und über eine aufsteigende Ethanolreihe entwässert (2 h 60%, 3 h 5%, 3 h 90%, 4 h 100%). Anschließend erfolgt eine Inkubation für jeweils 12 h bei 63°C in einem Xylol-Paraffin-Gemisch (1:1) und in reinem Paraffin. Danach werden mit flüssigem Paraffin gefüllte Formen vorbereitet, in die die Cochleaen in der gewünschten Orientierung hineingelegt werden. Nachdem Aushärten des Paraffins auf einer Kühlplatte bei 4°C, werden die Paraffinblöcke aus den Formen herausgenommen. Mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica) werden 8 µm dicke Schnitte gefertigt und in einem 42°C warmen Wasserbad aufgefangen. Die so gestreckten Schnitte werden auf beschichtete Objektträger (Menzel-Gläser) aufgezogen und luftgetrocknet. Bis zur weiteren Verarbeitung können sie in einer geschlossenen Kassette bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Vor einer Weiterverwendung der Präparate für histologische Färbungen müssen diese entparaffiniert werden, da sie noch in Paraffin eingeschlossen vorliegen. Dies wird durch eine Xylolbehandlung (2x 5min) mit anschließender absteigender Ethanolreihe (100%, 96%, 75%, 50%, jeweils 2min) erreicht. Die Schnitte liegen nun rehydriert vor und können histologisch untersucht werden.

3.5.4 Herstellung von Vibratomschnitten der Cochlea

Die Cochleaen perfundierter Tiere werden nachfixiert, dekalzifiziert (vgl. Abschnitt 3.5.2.3) und auf der Trägerplatte des Vibratoms in der gewünschten Orientierung aufgeklebt. Nach dem Antrocknen des Präparats auf der Trägerplatte wird diese in eine mit PBS⁻ gefüllte Schale des Vibratoms überführt. Eine Rasierklinge wird in den Klingenthaler gelegt und mit einer Schraube fixiert. Der Klingenthaler wird daraufhin am Vibratom montiert. Um eine optimale Schnittqualität zu erreichen, wird eine Schnittgeschwindigkeit der Stufe „3“ und eine Vibrationsfrequenz der Stufe „6“ eingestellt. Die 100 µm dicken Schnitte werden in mit PBS⁻ gefüllte 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt und können so bis zu einer Woche bei

4°C gelagert werden. Für eine längerfristige Lagerung (ein paar Wochen) sollte PBS⁻ durch 2% PFA ersetzt werden.

3.6 Indirekte Immunfluoreszenzanalysen

3.6.1 Immunfluoreszenzanalysen an Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte werden in gefrorenem Zustand in 2% PFA (in PBS⁻) 5 min bei RT auf einer Wippe nachfixiert und anschließend zweimal kurz in PBS⁻ gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen der Antikörper werden die Schnitte je nach Anzahl der Objektträger entweder in einer Küvette im Dunkeln oder einzeln, abgedeckt mit Parafilm in einer dunklen, feuchten Kammer 1 h bei RT in Blockierungslösung inkubiert. Die Blockierungslösung richtet sich nach den verwendeten Primärantikörpern. Die besten Ergebnisse für die Behandlung mit Connexinantikörpern wurden durch eine Blockierung in 5% BSA und 0,1% Triton X-100 in PBS⁻ (IF-Blockierungslösung I, Abschnitt 2.2.3.2) erzielt. Für Nicht-Connexinantikörper eignen sich besonders Blockierungen mit einem Gemisch aus BSA, NGS und Triton X-100 in PBS⁻ (vgl. IF-Blockierungslösungen II und III, Abschnitt 2.2.3.2). Die Primärantikörperinkubation erfolgt üN bei 4°C in einer dunklen, feuchten Kammer. Dazu werden die Antikörper in der entsprechenden Blockierungslösung verdünnt und 200 µl der Antikörperlösung auf die Objektträger aufgetropft. Um ein Austrocknen der Schnitte und eine gleichmäßige Verteilung der Antikörperlösung zu erreichen, werden diese mit Parafilm vorsichtig abgedeckt. Unspezifisch gebundene Antikörper werden durch Waschen in PBS⁻ (1x kurz, 3x 5-10 min) entfernt. Die Schnitte werden für 45 min mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Je nach Anwendung können auch Marker zur Anfärbung der Nuklei (Syto 61, Draq5) oder der F-Aktinfilamente (Phalloidin) hinzugegeben werden. Nach dem viermaligen Waschen der Schnitte in PBS⁻, folgt ein kurzer Waschschrift in demineralisiertem Wasser zur Beseitigung möglicher Salzurückstände und das Versiegeln der Präparate mit Permafluor Mounting Medium (Immunotech) und einem Deckglas. Bis zur Betrachtung können die Präparate im Dunkeln bei 4°C gelagert werden. An einem konfokalen Mikroskop (LSM500, Zeiss) werden die Immunfluoreszenzanalysen ausgewertet.

3.6.2 Immunfluoreszenzanalysen an Vibratomschnitten der Cochlea

Soweit nicht anders erwähnt, werden alle Inkubationsschritte in Mikroreaktionsgefäßen bei RT auf einem sich langsam drehenden Sonnenrad und die Waschschrte in einer 12-Lochplatte auf einem Rotationsschüttler durchgeführt. Freischwimmende Cochlea-Vibratomschnitte werden zweimal 15 min bei RT mit PBS⁻ gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen werden die Vibratomschnitte anschließend 1 h bei RT in IF-Blockierungslösung (Zusammensetzung abhängig von den verwendeten Antikörpern, vgl. Abschnitte 2.2.3.2 und

3.6.1) inkubiert. Für die Primärantikörperinkubation wird die IF-Blockierungslösung vorsichtig entfernt, die Primärantikörper werden verdünnt in IF-Blockierungslösung hinzugegeben und je nach Antikörper ∞ oder für mindestens 24 h inkubiert. Nicht-gebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen der Cochleaschnitte für jeweils 30 min in PBS⁻ entfernt. Nach dem Waschen werden die Sekundärantikörper ebenfalls in Blockierungslösung verdünnt zu den Cochleaschnitten gegeben und 2-4 h lichtgeschützt inkubiert. Zusätzlich können je nach Fragestellung Marker zur Anfärbung der Nuklei (Syto 61, Draq5) oder der F-Aktinfilamente (Phalloidin) hinzugegeben werden. Die Schnitte werden lichtgeschützt dreimal 30 min in PBS⁻ und einmal 2-5 min in A. bidest gewaschen. Anschließend werden die Cochleaschnitte auf Objektträger aufgezogen und auf einer Wärmeplatte bei 42°C getrocknet. Nach dem Trocknen können die Schnitte mit Permafluor Mounting Medium (Immunotech) und einem Deckglas versiegelt werden. Die Präparate werden bis zur Betrachtung am LSM lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

3.7 Histologische Färbetechniken

3.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Durch die Hämatoxylin-Eosinfärbung können Zellkerne (Hämatoxylin) und Zytoplasmata (Eosin) in Gewebeschnitten (Paraffin- oder Gefrierschnitte) angefärbt werden. Hierzu werden die Gewebeschnitte je nach Art des Gewebes und der Schnittdicke zwischen 30 und 60 sec in Hämatoxylin-Lösung inkubiert und anschließend unter fließendem Leitungswasser differenziert. Nachfolgend werden die Gewebeschnitte 5-10 min in 0,1%iger Eosin-Lösung gefärbt. Ein Überschuß an Farbe kann mit Leitungswasser entfernt werden. Die Präparate werden abschließend an der Luft getrocknet und mit Entellan und einem Deckglas versiegelt.

3.7.2 LacZ-Färbung

Die β -Galaktosidase Nachweisreaktion beruht auf der Fähigkeit der β -Galaktosidase das Substrat X-Gal zu einem sichtbaren blauen Farbstoff (5-Brom-4-Chlor-Indigo) umzusetzen. Zum Nachweis der β -Galaktosidase in Gewebeschnitten werden diese 5 min in LacZ-Fixierlösung inkubiert. Nach drei Waschsritten je 10 min in LacZ-Waschlösung werden die Objektträger einige Stunden oder ∞ bei 37°C im Dunkeln in LacZ-Substratlösung inkubiert. Anschließend werden überschüssige Salze durch einen 10 min Waschschrift in LacZ-Waschlösung entfernt und die Gewebeschnitte luftgetrocknet bevor sie mit Entellan unter einem Deckglas versiegelt werden.

3.7.3 Toluidinblau-Färbung zur Untersuchung der epidermalen Wasserpermeabilitätsbarriere

Die Funktion der epidermalen Permeabilitätsbarriere neugeborener Mäuse (P1-P4) wird mittels der Toluidinblau-Färbung nach einem leicht modifizierten Protokoll von Hardman et al. (1998) überprüft. Neugeborene Mäuse werden durch Inhalation von Isofluran betäubt und anschließend jeweils 1 min in einer aufsteigenden Konzentration von Methanol (25, 50, 75 und 100% in PBS⁻) inkubiert. Es folgt eine 1-minütige Äquilibration in PBS⁻ und die anschließende Färbung für 15 min in 0,2%iger Toluidinblau-Lösung. Abschließend werden die Tiere dreimal für jeweils 1 min in 90% Ethanol und einmal in A. bidest gewaschen. Die Permeabilität der epidermalen Barriere wird als blaugefärbte Regionen unter einem Binokular (Leica) dokumentiert.

4 Ergebnisse

Punktmutationen in den Genen *GJB2* (Cx26) und *GJB6* (Cx30) gehören zu den häufigsten Ursachen für erbliche nicht-syndromische Taubheit oder Taubheits-assoziierte Hauterkrankungen, wie dem **Keratitis-Ichthyosis-Deafness-Syndrom** (KID) oder dem Clouston Syndrom (**Hidrotic Ectodermal Dysplasia**, HED). In der vorliegenden Arbeit werden die experimentellen Untersuchungen des Innenohrs und der Haut zur Charakterisierung der Cx30 Mutationen Cx30T5M (nicht-syndromische Taubheit, Grifa et al., 1999) und Cx30A88V (Clouston Syndrom, Smith et al., 2002), sowie der Cx26S17F Mutation (KID, Richard et al., 2002) in der Maus beschrieben. Zudem wird untersucht, ob es möglich ist, Cx26 durch Cx32 im Innenohr funktionell zu ersetzen.

4.1 Analyse der Mutation Cx30T5M in der Maus

Im Menschen führt die Cx30T5M Mutation zu nicht-syndromischer Taubheit. Welche Mechanismen ursächlich für diese Erkrankung sind, ist bis heute weitgehend ungeklärt. Aus diesem Grunde sollte in dieser Arbeit durch homologe Rekombination eine Cx30T5M-Mauslinie erzeugt werden, die die Mutation unter der Kontrolle des endogenen Cx30 Promotors exprimiert und der Einfluss der Mutation auf das Hören charakterisiert werden.

4.1.1 Der Cx30T5M Austauschvektor

Der Austauschvektor Cx30T5M wurde für eine nicht-konditionale Strategie erzeugt, bei der nach erfolgter homologer Rekombination in ES-Zellen die Mutation Cx30T5M unter der Kontrolle des endogenen Cx30-Promotors exprimiert wird. Zwischen der 5'-Homologieregion (4,3 kb) und der 3'-Homologieregion (1,3 kb) liegt die für Cx30T5M kodierende Region. Die Mutation wurde mittels Mutagenese-PCR erzeugt (M. Schütz, Diplomarbeit 2006), wobei auf die Cx30T5M Mutation durch die Wahl eines geeigneten Triplets eine zusätzliche Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *SphI* gelegt wurde. Diese Schnittstelle ist im wtCx30 Gen nicht vorhanden und erlaubt so einen Nachweis der Mutation durch Restriktionsspaltung mit *SphI*. Stromabwärts der Cx30T5M Mutation liegen eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und das Reportergen *LacZ*, das für die β -Galaktosidase kodiert. Die IRES-Kassette erlaubt die Bildung einer bicistronischen mRNS, wodurch Cx30T5M und die β -Galaktosidase unabhängig voneinander translatiert werden. Das Kernlokalisierungssignal NLS, das dem *LacZ*-Gen vorangestellt ist, vermittelt den Transport der β -Galaktosidase in den Zellkern. Die stromaufwärts des *LacZ*-Gens liegende Neomycin-Resistenzkassette unter der Kontrolle eines pgk-Promotors (Phosphoglyceratkinase-Promoter) dient der Selektion erfolgreich homolog rekombinierter embryonaler

Stammzellen (ES-Zellen). Sie liegt entgegengesetzt der Leserichtung der Cx30T5M Kodierungsregion und wird von frt-Stellen flankiert, die das Entfernen des Neomycin Gens durch die Flp-Rekombinase in der Maus erlauben. Dadurch wird ein möglicher Einfluss der Regulationselemente des Neomycin Gens auf die Expression von Cx30 vermieden. Um die Selektion während der Vervielfältigung des Austauschvektors in Bakterien zu gewährleisten, beinhaltet dieser außerdem eine Ampizillin-Resistenzkassette, die jedoch bei homologer Rekombination nicht in das ES-Zellgenom aufgenommen wird. Durch das Restriktionsenzym *NotI* wird der Austauschvektor vor dem Einbringen in ES-Zellen linearisiert.

4.1.1.1 Erzeugung des Austauschvektors Cx30T5M

Während der vorangegangenen Diplomarbeit wurde der Austauschvektor „Cx30KiCx30T5M“ nahezu fertiggestellt. Lediglich der letzte Schritt, das Einbringen der Neomycin-Resistenzkassette für die Selektion in embryonalen Stammzellen fehlte. Dazu wurde zu Beginn dieser Arbeit die Neomycin-Resistenzkassette aus dem Vektor „pBsk_frt-Neo-frt“ (J. Degen, Doktorarbeit 2003) über die Restriktionsendonuklease *Sall* ausgeschnitten und nach Glätten der Enden mit der Klenow-Polymerase in den mit *NheI* linearisierten und geglätteten Vektor „5'HR_T5M-IRES-LacZ_3'HR“ einkloniert (Abb. 4.1).

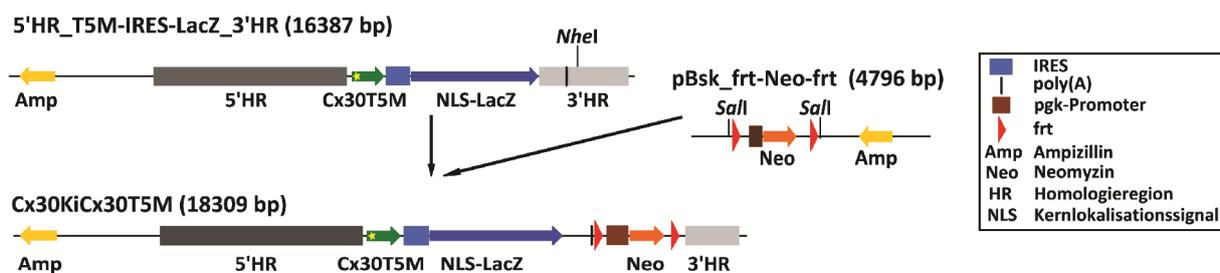


Abb. 4.1: Erzeugung des Cx30T5M Austauschvektors.

Die Restriktionsenzyme *NheI* und *Sall*, die zur Erzeugung des Cx30T5M Austauschvektors verwendet wurden, sind eingezeichnet.

Die Analyse des fertigen Austauschvektors „Cx30KiCx30T5M“ durch Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen (Abb. 4.2) und durch Sequenzierung der eingebrachten Sequenzen (AGOWA, Berlin) bestätigte die korrekte Erzeugung des Vektors. Die Funktionalität der frt-Stellen wurde durch die Transformation des Austauschvektors in Flp-*Escherichia coli* Bakterien (Buchholz et al., 1996) und anschließender Restriktionsspaltung überprüft (Daten nicht gezeigt).

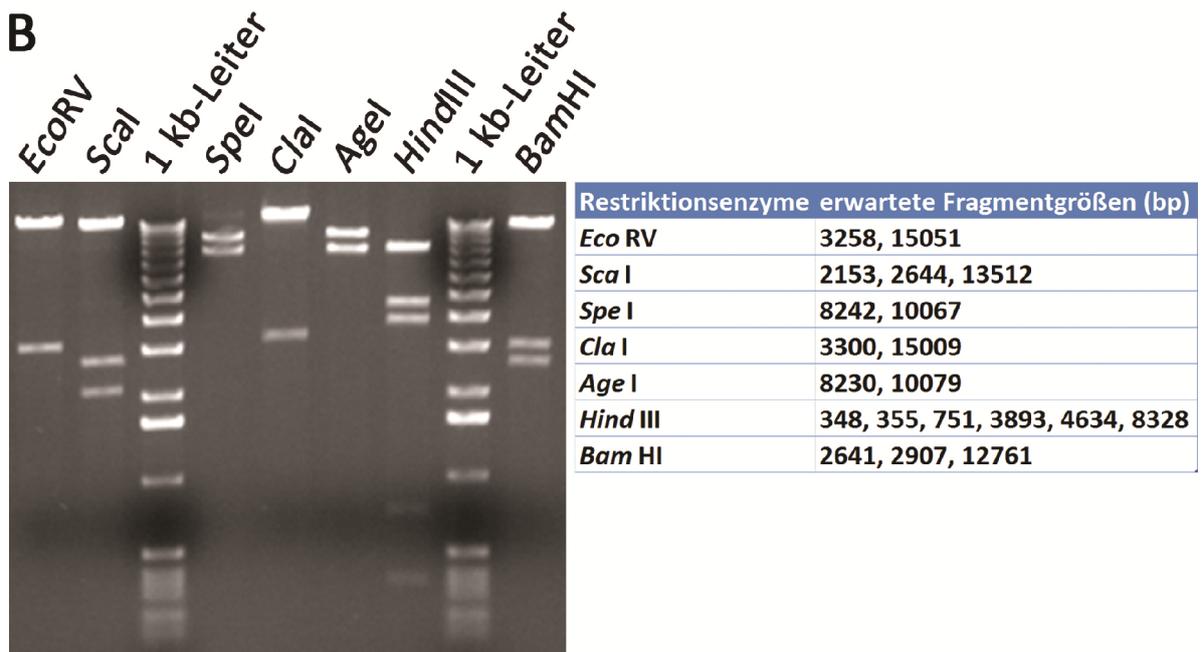
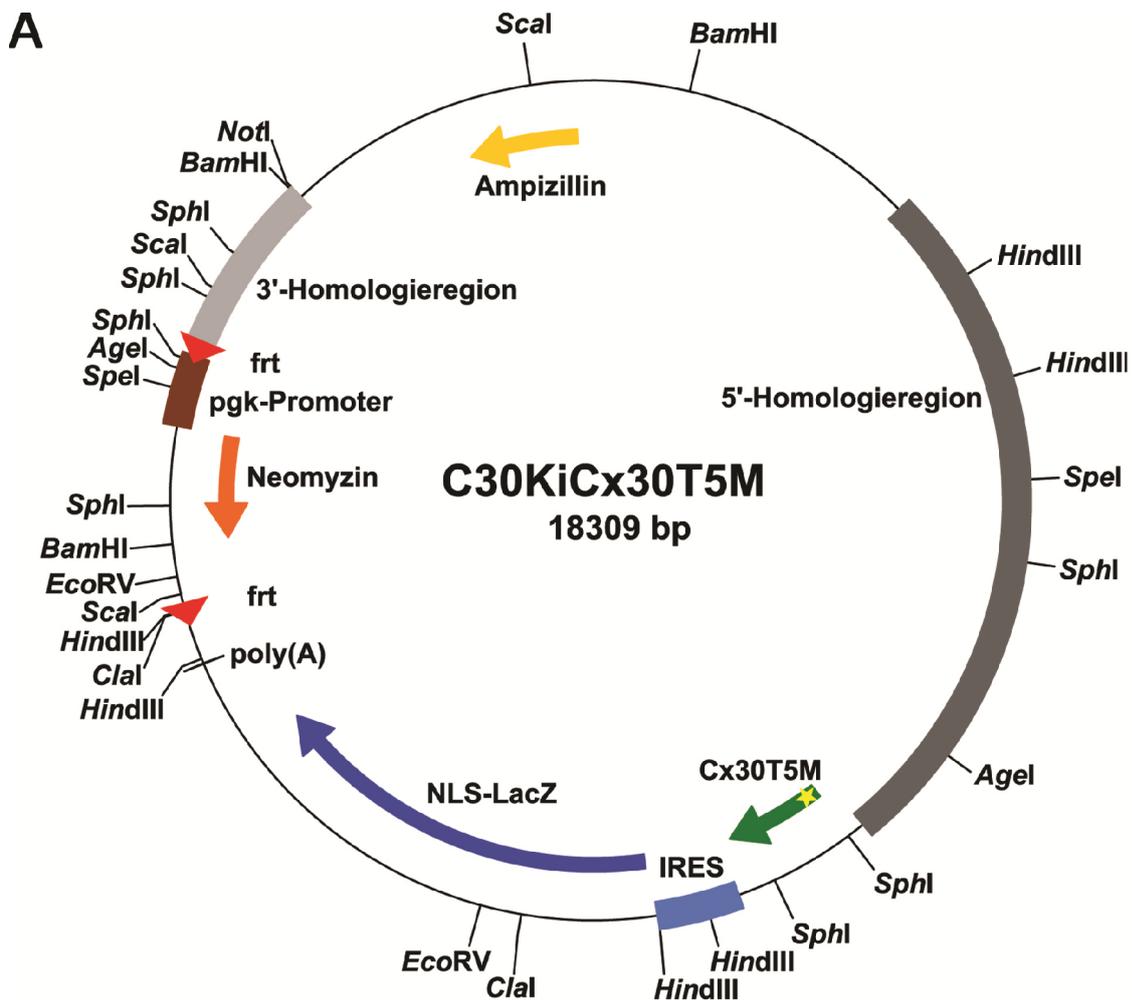


Abb. 4.2: Restriktionsspaltung des Cx30T5M Austauschvektors.

(A) Darstellung des Austauschvektors Cx30T5M mit den für die Überprüfung genutzten Restriktionsschnittstellen. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung des gespaltenen Vektors. Die Tabelle gibt Auskunft über die erwarteten Fragmentgrößen.

4.1.2 Erzeugung und Isolierung homolog rekombinierter ES-Zellen

Zur Erzeugung einer Cx30T5M-Mauslinie wurde der Austauschvektor Cx30T5M durch Elektroporation in Sv129P2/OlaHsd HM1 embryonale Stammzellen (Magin et al., 1992) eingebracht. Um die Effizienz der Transfektion zu erhöhen und willkürliche Strangbrüche zu vermeiden, wurde der Austauschvektor vor der Transfektion mit dem Restriktionsenzym *NotI* linearisiert. Nach der Transfektion wurden die ES-Zellen 24 h in Wildtyp-ES-Zellmedium unter optimalen Kulturbedingungen (37°C, 5% CO₂-Gehalt) kultiviert (vgl. Kapitel 3.2). Erst nach Anwachsen der transfizierten ES-Zellen wurden die Zellen durch Zugabe von G418-haltigem Nährmedium (Selektionsmedium) kultiviert. Die ersten ES-Zellklone wurden nach acht Tagen beobachtet. Nach etwa zehn Tagen wurden insgesamt 419 ES-Zellklone isoliert und die homologe Rekombination mittels PCR-Reaktionen analysiert.

4.1.2.1 PCR-Analysen zur Charakterisierung der isolierten Cx30T5M-ES-Zellklone

Mit der „Cx30T5M 3'HR-PCR“ wurden die Klone hinsichtlich ihrer homologen Rekombination im 3'-Bereich überprüft. Dazu wurde die notwendige PCR mittels eines PCR-Testvektors (M. Schütz, Diplomarbeit 2006), der zu Beginn dieser Arbeit bereits vorlag, etabliert. Der verwendete PCR-Testvektor („konvPCR-Testvektor“) enthält einen im Vergleich zum Austauschvektor um 847 bp längeren 3'-Bereich (M. Schütz, Diplomarbeit 2006). Zudem beinhaltet der PCR-Testvektor eine durch *frt*-Stellen flankierte Neomycin-Resistenzkassette. Stromaufwärts der Resistenzkassette liegt die Cx30T5M Kodierungsregion gefolgt von einer IRES-LacZ-Kassette. Bei dieser PCR wurden die Startermoleküle so gewählt, dass das vorwärtsgerichtete Startermolekül in der Neomycin-Resistenzkassette und das rückwärtsgerichtete Startermolekül im 3'-Bereich außerhalb der gewählten 3'-Homologieregion bindet. Nach erfolgreicher homologer Rekombination zwischen dem Austauschvektor und den genomischen Sequenzen ergibt die Amplifikation mit diesen Startermolekülen ein 1,9 kb großes Fragment. Außerdem wurde die Sensitivität der PCR durch abfallende DNS-Konzentration in 10er Potenzen im Bereich von 10 pg bis 1 fg analysiert. In Abbildung 4.3 sind der PCR-Testvektor und die durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten PCR-Produkte gezeigt. Trotz einiger Hintergrund-Banden, die auf die Zugabe von HM1-DNS zurückzuführen sind, kann deutlich eine Bande bei 1,9 kb bis zu einer Vektor-DNS-Konzentration von 100 fg nachgewiesen werden.

Durch die beschriebene PCR-Reaktion entsteht nur ein Amplikon für das rekombinierten Cx30T5M-Allel, da eines der Startermoleküle nicht in der wtCx30 Sequenz bindet.

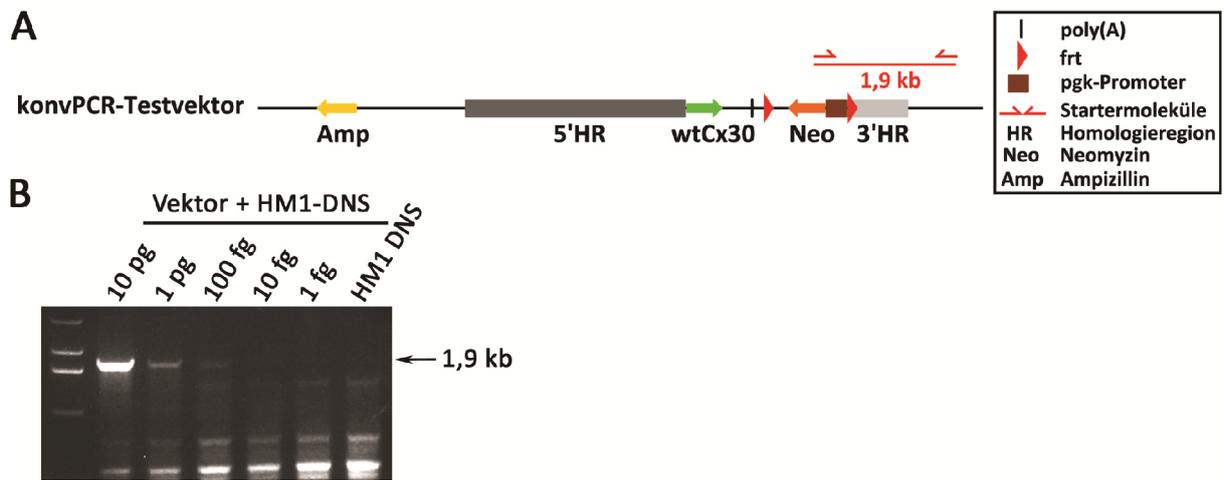


Abb. 4.3: Etablierung der Cx30T5M Test-PCR.

(A) Schematische Darstellung des verwendeten Vektors „konvPCR-Testvektor“. Durch Pfeile sind die genutzten Startermoleküle (rot) abgebildet. (B) Etablierung der „Cx30T5M 3'HR-PCR“.

Bei der Untersuchung der isolierten Cx30T5M-ES-Zellklone wurde mittels der „Cx30T5M 3'HR-PCR“ in 38 der 419 Klone das erwartete 1,9 kb große Fragment nachgewiesen (Abb. 4.4 B). Die aus der PCR-Reaktion positiv hervorgegangenen ES-Zellklone wurden weiterführend mittels Southern Blot Hybridisierungen charakterisiert.

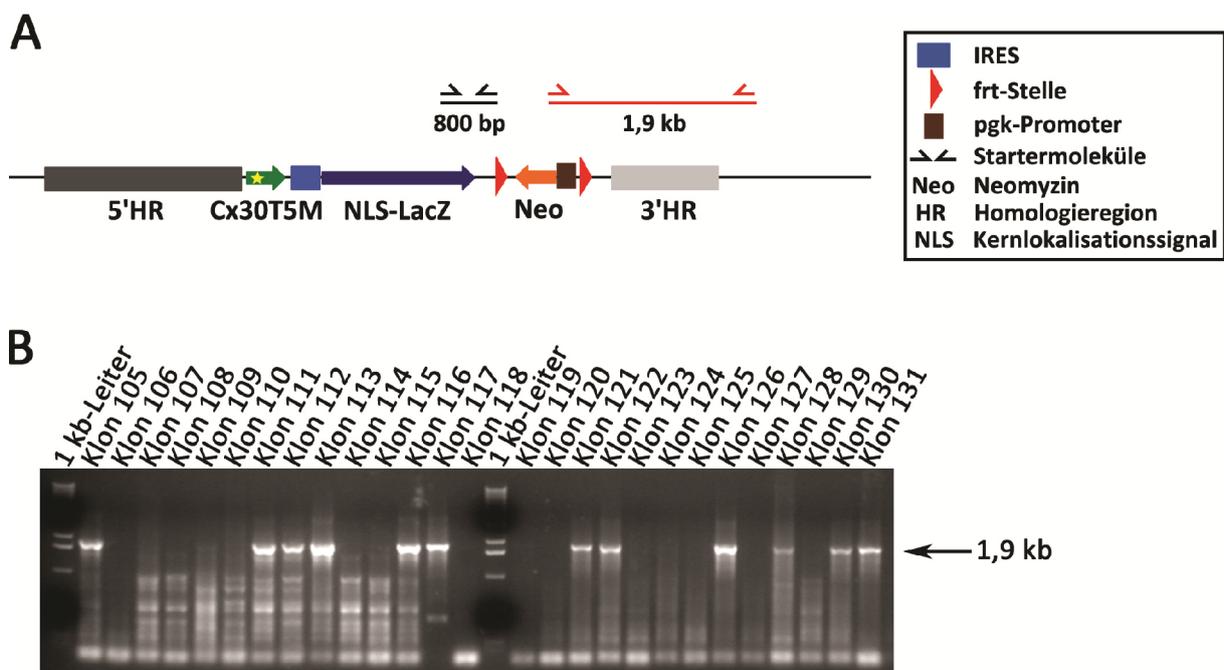


Abb. 4.4: PCR-Analyse isolierter Cx30T5M-ES-Zellklone.

(A) Dargestellt ist das rekombinierte Cx30T5M Allel in embryonalen Stammzellen. Die Startermoleküle der „Cx30T5M 3'HR-PCR“ sind in rot dargestellt. (B) PCR über den 3'Bereich. Es entsteht ein 1,9 kb großes PCR-Fragment.

4.1.2.2 Southern Blot Hybridisierungen zum Nachweis der homologen Rekombination

Southern Blot Hybridisierungen erlauben, anders als die durchgeführte PCR-Analyse, den Nachweis größerer DNS-Fragmente und lassen dadurch eine genauere Aussage über die Integration des Austauschvektors in das ES-Zellgenom zu. Externe Sonden, die außerhalb der genutzten 5'- und 3'-Homologieregionen liegen, erlauben die Überprüfung der homologen Rekombination zwischen den Sequenzen des Austauschvektors und denen des ES-Zellgenoms. Durch die Verwendung einer internen Sonde werden ES-Zellklone ausgeschlossen, in denen der Austauschvektor mehrfach integriert wurde. Für die Southern Blot Hybridisierungen wurde genomische DNS aus den PCR-positiven ES-Zellklonen isoliert, mit verschiedenen Restriktionsenzymen (5'-externe Sonde: *Bam*HI, 3'-externe und interne Sonde: *Eco*RI/*Hpa*I) gespalten und nach Auftrennung der gespaltenen DNS über ein Agarosegel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die vollständige Southern Blot Strategie ist in Abbildung 4.5 A dargestellt. Als Kontrolle wurde in allen Southern Blot Hybridisierungen Wildtyp-HM1-DNS verwendet.

Zur Überprüfung der homologen Rekombination im 5'-Bereich wurde die genomische DNS der Cx30T5M-ES-Zellklone mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI gespalten und mit einer 5'-externen Sonde (*Mlu*I/*Pst*I-Fragment aus dem Vektor 10b1b/pBS SK+_mCx30Genloкус, 766 bp) hybridisiert, die unmittelbar außerhalb der verwendeten Homologieregion bindet. Die 5'-externe Sonde markiert ein 14,9 kb großes Fragment für das rekombinierte Allel und ein 11,8 kb großes Fragment für das Wildtyp-Allel (Abb. 4.5 B). Das Fragment des rekombinierten Allels umfasst dabei den Bereich zwischen der 5'-Homologieregion und der Neomycin-Resistenzkassette und damit einen Großteil der eingebrachten Sequenzen. Die homologe Rekombination konnte im 5'-Bereich bei zwei ES-Zellklonen bestätigt werden. Die homologe Rekombination im 3'-Bereich wurde durch Hybridisierung der *Eco*RI/*Hpa*I gespaltenen genomischen DNS mit einer 3'-externen Sonde (*Bam*HI/*Cl*aI-Fragment aus dem Vektor 10b1b/pBS SK+_mCx30Genloкус, 808 bp) nachgewiesen, die unmittelbar stromabwärts der 3'-Homologieregion bindet. Die Rekombination wurde in diesem Bereich durch ein 6,3 kb (rekombiniertes Allel) und ein 5,7 kb großes Fragment (Wildtyp-Allel) gezeigt (Abb. 4.5 C). Nach Entfernen der 3'-externen Sonde durch Aufkochen der Nitrozellulosemembran (Kapitel 3.1.9.3) stand die Membran für eine Hybridisierung mit einer internen LacZ-Sonde (*Mlu*I-Fragment aus dem Vektor T5M_IRES_LacZ_3'HR) zum Ausschluss von Mehrfachintegrationen zur Verfügung. Es wurde ein 6,3 kb großes Fragment detektiert (Abb. 4.5 D).

Von den insgesamt 419 analysierten Klonen, von denen 37 Klone in der PCR positiv waren, konnte der Erfolg der homologen Rekombination nach allen Untersuchungen in zwei Klonen (0,5%) – Klon 92 und Klon 111 – bestätigt werden.

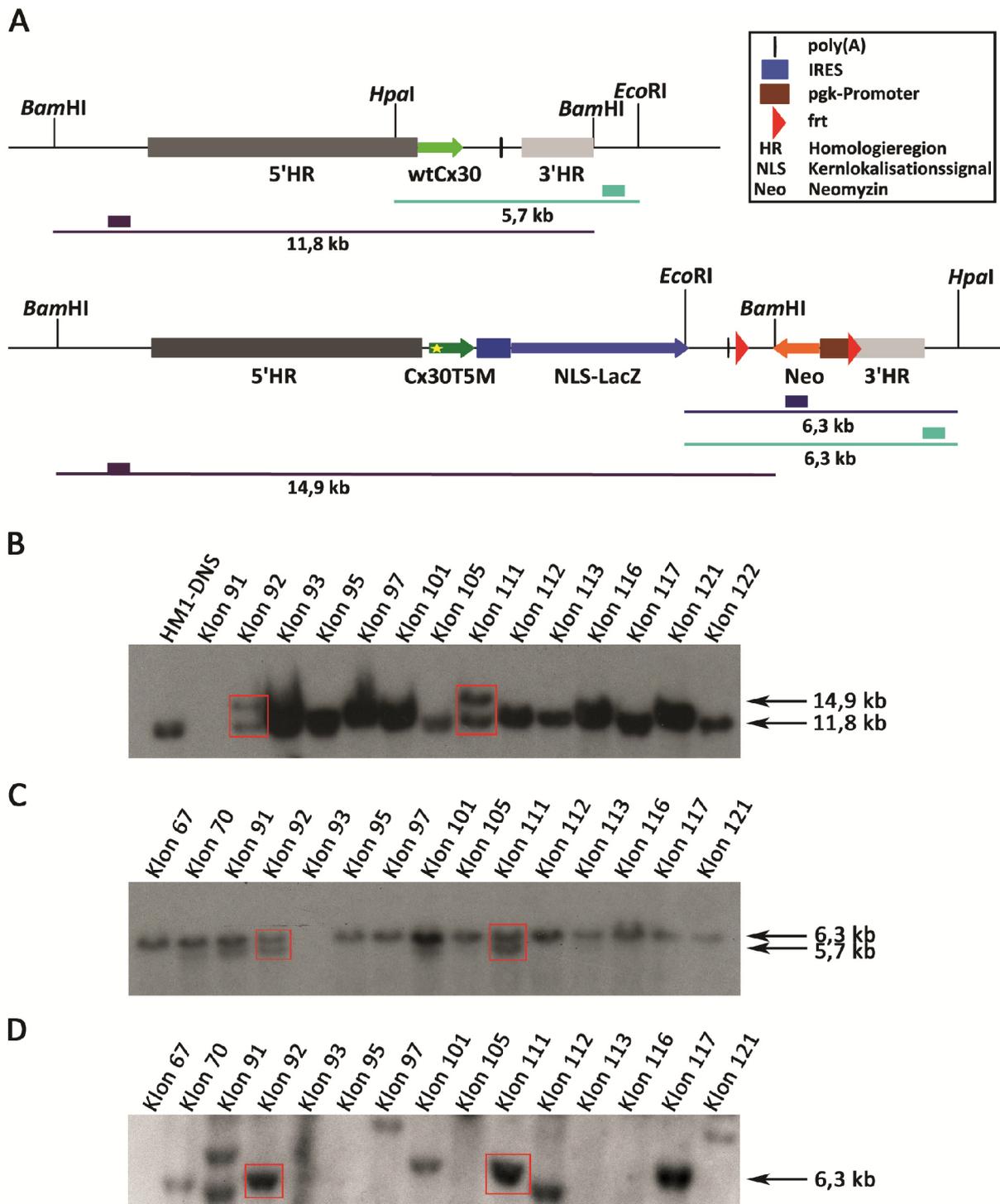


Abb. 4.5: Überprüfung der homologen Rekombination durch Southern Blot Hybridisierungen.

(A) Abbildung der gewählten Southern Blot-Strategie. Die Lage der Sonden sowie die genutzten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. (B) Hybridisierung der 5'-externen Sonde zum Nachweis einer erfolgten Rekombination im 5'-Bereich. Mit *EcoRI/HpaI* gespaltene genomische DNS wurde mit einer 3'-externen Sonde (C) und mit einer internen LacZ-Sonde (D) markiert.

4.1.3 Erzeugung chimärer Mäuse durch Blastozysten-Injektion

Um mögliche chromosomale Veränderungen wie z. B. Trisomien der ES-Zellklone aufzudecken, wurde eine Karyotyp-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die kultivierten ES-Zellen in der Metaphase arretiert (Kap. 3.2.6) und auf Objektträger aufgetropft. Die nach dem Auftropfen freiliegenden Chromosomen wurden durch eine Giemsa-Lösung angefärbt und unter dem Mikroskop (Axiophot, Zeiss) ausgezählt. Die normale Chromosomenanzahl in der Maus beträgt 40 Chromosomen. Die durchschnittliche Anzahl von 40 Chromosomen bestätigte sich für beide Klone nach dem Auszählen von jeweils 20 Zellen (Abb. 4.6 A, B). Daher wurden beide ES-Zellklone für die Blastozysteninjektion eingesetzt.

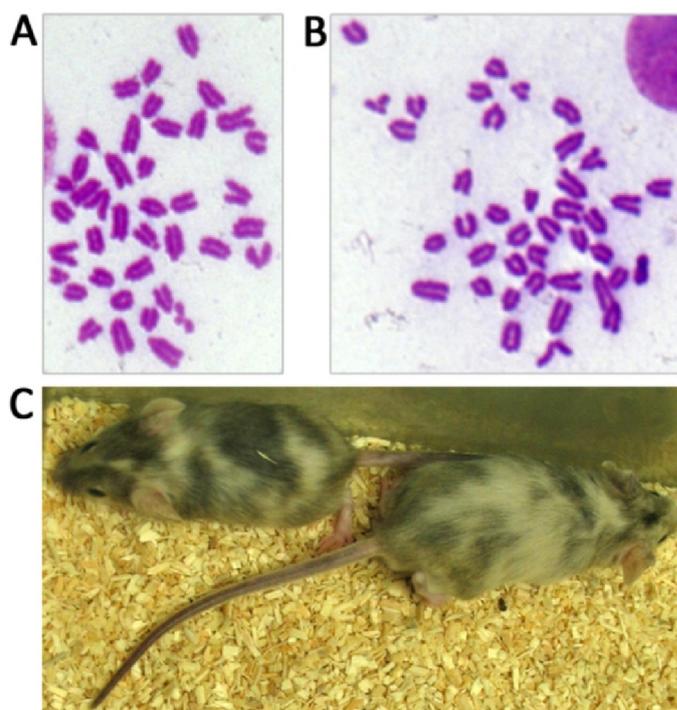


Abb. 4.6: Karyotypbestimmung und aus der Blastozysteninjektion hervorgegangene chimäre Mäuse.

(A) Giemsa-gefärbte Metaphase-Chromosomen des Klons 92. (B) Chromosomensatz des Klons 111. (C) Die Fellfärbung dieser beiden Chimären verweist auf einen hochgradigen Chimarismus (80-100%).

Die ES-Zellklone wurden abwechselnd innerhalb von drei Wochen an drei aufeinanderfolgenden Tagen von Christine Siegmund in Blastozysten des Mausstamms C57BL/6 injiziert und in scheinchwangere Mäuse eingebracht. Nach der Injektion sollten diese Blastozysten sowohl die injizierten transgenen ES-Zellen als auch die C57BL/6 Wildtyp-Zellen besitzen. Aus diesen Injektionen entstanden fünf hoch- und zwei niedriger chimäre Mäuse (Abb. 4.7 C). Zur Erzeugung der $Cx30^{+/T5MNeo}$ -Tiere wurden die Chimären mit C57BL/6 Tieren verpaart. Tritt ein agouti-farbenes Fell bei den Nachkommen auf, so ist die Chimäre keimbahngängig. Da die Chimäre sowohl das Wildtyp-Allel als auch das rekombinierte Allel $Cx30T5MNeo$ vererben kann, wurden alle braunen Nachkommen mittels PCR-Analyse genotypisiert. Das rekombinierte Allel wurde an 50% der Nachkommen weitergegeben. Die aus diesen Verpaarungen hervorgegangenen $Cx30^{+/T5MNeo}$ -Tiere wurden mit deleter-Flp-Mäusen (Rodriguez et al., 2000) gekreuzt (Abb. 4.8 A). Diese Mäuse exprimieren das für die

Flp-Rekombinase kodierende Gen und führen bei der Vererbung dieses Gens zu einer ubiquitären Deletion der mit *frt*-Stellen flankierten Neomycin-Resistenzkassette. Aus dieser Verpaarung entstanden $Cx30^{+/T5M\Delta Neo}$:Flp-Mäuse, die, um den C57BL/6 Gehalt zu erhöhen und homozygote Nachkommen zu erhalten, sowohl mit C57BL/6 Mäusen als auch untereinander verpaart wurden.

4.1.4 Untersuchung der Cx30T5M-Mauslinie mittels PCR-Analysen und Southern Blot Hybridisierung

4.1.4.1 PCR-Analyse zur Genotypisierung der Cx30T5M-Mauslinie

Für die Genotypisierung der Cx30T5M-Mauslinie wurde DNS aus Mausschwanzspitzen isoliert und für die PCR-Analysen eingesetzt. Durch die Verwendung zweier vorwärtsgerichteter und eines rückwärtsgerichteten Startermoleküls (Abb. 4.7 A) lassen sich in dieser PCR die Allele „+“ und „T5M Δ Neo“ voneinander unterscheiden. Das vorwärtsgerichtete Startermolekül („GenNeo_for“) bindet vor der stromaufwärts des LacZ Gens liegenden *frt*-Stelle im 3'-Bereich des mCx30 Gens. Das erste rückwärtsgerichtete Startermoleküle („GenNeo“) bindet in der Neomycin-Resistenzkassette und das zweite rückwärtsgerichtete Startermolekül („GenNeo_rev“) liegt im 3'-Homologiebereich des mCx30 Gens. Bei Anwesenheit eines „+“-Allels wird ein 630 bp großes Fragment amplifiziert, das „T5MNeo“-Allel wird durch ein 825 bp (nicht gezeigt) und das „T5M Δ Neo“-Allel durch ein 784 bp großes PCR-Produkt nachgewiesen. Eine solche Genotypisierungs-PCR ist exemplarisch für die Genotypen $Cx30^{+/+}$, $Cx30^{+/T5M}$ und $Cx30^{T5M/T5M}$ in Abbildung 4.7 B gezeigt. In den nachfolgenden Beschreibungen werden die, aus diesen Verpaarungen hervorgegangen heterozygoten ($Cx30^{+/T5M\Delta Neo}$) und homozygoten ($Cx30^{T5M\Delta Neo/T5M\Delta Neo}$) Mäuse, als $Cx30^{+/T5M}$ und $Cx30^{T5M/T5M}$ Mäuse abgekürzt.

4.1.4.2 Nachweis der Mutation durch eine PCR und anschließender Restriktionsspaltung mit dem Enzym *SphI*

Bei der Erzeugung der Cx30T5M Mutation durch eine Mutagenese-PCR (M. Schütz, Diplomarbeit 2006) wurde gezielt eine Restriktionsschnittstelle eingebracht, um den indirekten Nachweis der Mutation in der Maus zu gewährleisten. Der Nachweis der Punktmutation in der Maus erforderte zunächst die Durchführung einer PCR-Reaktion, bei der sowohl das wtCx30 als auch das Cx30T5M Gen amplifiziert wurden. Die Startermoleküle „Cx30for“ und „Cx30rev“, die auch zur Erzeugung der Cx30A88V Mutation verwendet wurden (vgl. Abschnitt 4.2.1.1), amplifizierten ein 1436 bp großes Fragment, das die Cx30T5M kodierende Region beinhaltet. Nach der Aufreinigung über ein Agarosegel wurde das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym *SphI* gespalten. Dadurch entstehen für das

„T5M“-Allel drei Fragmente (594 bp, 590 bp und 252 bp) und für das Wildtyp-Allel zwei Fragmente (1184 bp und 252 bp). In Abbildung 4.7 C ist die Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte vor und nach Spaltung durch das Restriktionsenzym *SphI* zu sehen. Aufgrund der geringen Größenunterschiede sind die Fragmente des „T5M“-Allels (594 bp und 590 bp) nicht voneinander zu trennen. Bei Tieren des Genotyps $Cx30^{+/T5M}$ ist zusätzlich zu den Banden des „T5M“-Allels auch das 1184 bp große Fragment des „+“-Allels zu sehen.

4.1.4.3 Southern Blot Hybridisierung

Die verschiedenen Genotypen der $Cx30^{T5M}$ -Mauslinie wurden durch eine Southern Blot Hybridisierung verifiziert. Dazu wurde genomische DNS aus der Leber der Maus gewonnen und mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI gespalten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der genomischen DNS und Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein 14,9 kb großes Fragment für das „T5M“-Allel und ein 11,8 kb großes Fragment für das „+“-Allel nachgewiesen (Abb. 4.7 D).

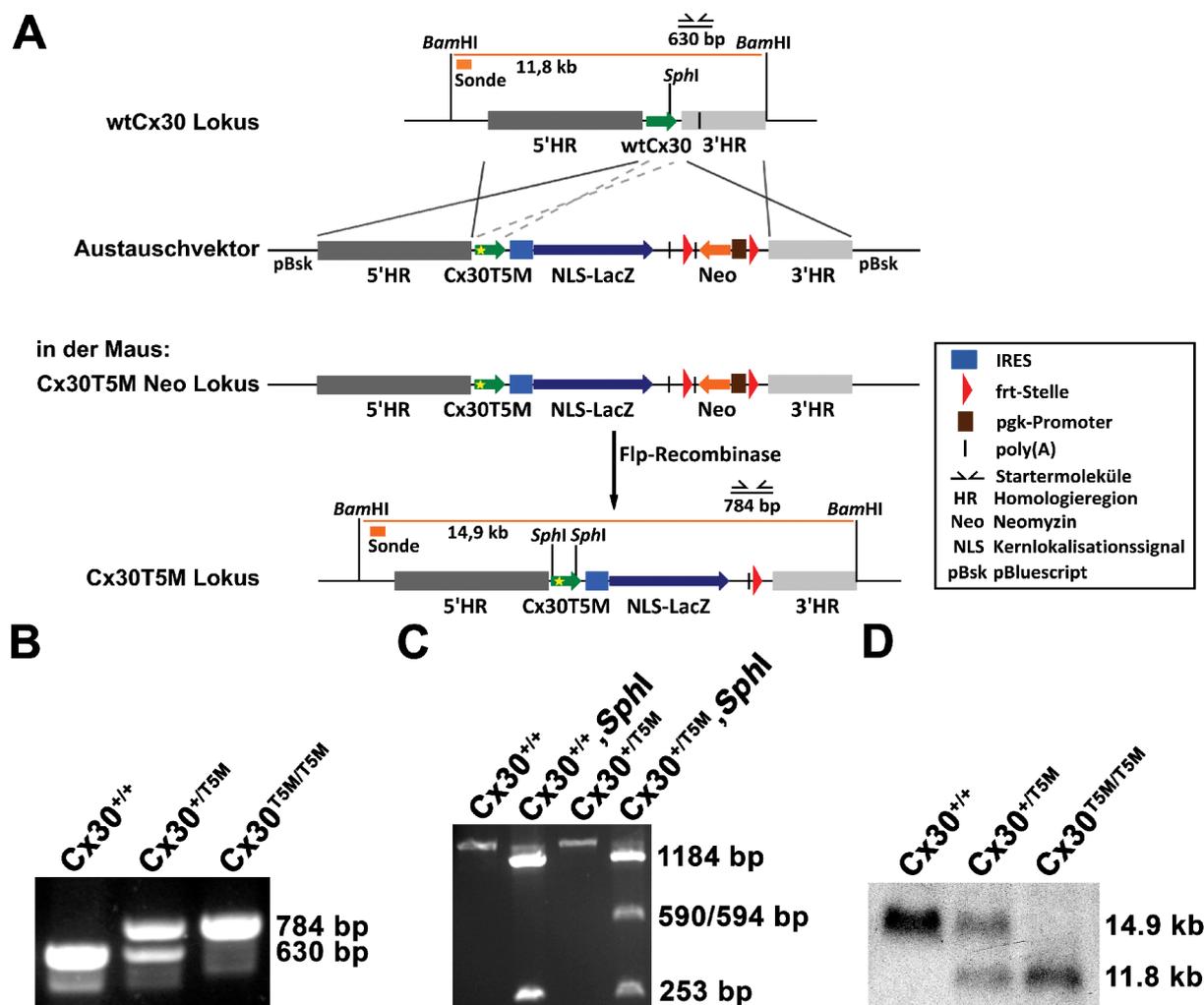


Abb. 4.7: Charakterisierung transgener Tiere der Cx30T5M Mauslinie.

(A) Schematische Darstellung der homologen Rekombination in ES-Zellen der Maus. Die gekreuzten Linien verdeutlichen die Rekombination zwischen der Vektor-DNS und den dazu homologen Sequenzen des wtCx30 Gens. Gestrichelte Linien verweisen auf eine mögliche interne homologe Rekombination. Nach der homologen Rekombination liegt in den heterozygoten ES-Zellen das „T5MNeo“- und das „+“-Allel vor. In der Maus kann durch Verpaarung mit Mäusen, die die Flp-Rekombinase exprimieren, die Neomycin-Resistenzkassette entfernt werden. In das Schema ist die Lage der für die Southern Blot Hybridisierung genutzten Schnittstellen und Sonden, sowie der für die PCR-Reaktionen verwendeten Startermoleküle eingezeichnet. (B) PCR-Analyse der Cx30T5M-Mauslinie. (C) Nachweis der Cx30T5M Mutation durch PCR und anschließender Restriktionsspaltung mit *SphI*. (D) Nachweis der verschiedenen Genotypen durch Southern Blot Hybridisierung *BamHI* gespaltener DNS mit einer 5'-externen Sonde.

4.1.5 Expressionsanalysen der Cx30T5M Mutation in der Maus

Cx30 wird hauptsächlich in der Cochlea (Lautermann et al., 1999; Ahmad et al., 2003), in der Haut (Kretz et al., 2004) und im Gehirn (Dahl et al., 1996) exprimiert, zeigt aber auch eine geringe Expression in der Lunge und der Niere (Dahl et al., 1996). Aufgrund dessen wurde die Cx30T5M Expression in diesen Organen indirekt mittels LacZ-Expressionsanalysen an Cx30^{+/T5M}- und Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen untersucht. In Abbildung 4.8 ist die LacZ-Expression in verschiedenen Organen exemplarisch für die Cx30^{T5M/T5M}-Mäuse gezeigt.

In der Cochlea (Abb. 4.8 A) konnte die LacZ-Färbung in den Stützzellen des Corti Organs, den Intermediär- und Basalzellen der Stria vascularis, sowie in den Fibrozyten des Spiral limb und Spiral ligaments beobachtet werden.

Die Aktivität der β -Galaktosidase in der Haut (Abb. 4.8 B) zeigte sich im Stratum granulosum, im Stratum spinosum sowie im Stratum corneum, wo die Blaufärbung möglicherweise auf eine lange Halbwertszeit der β -Galaktosidase zurückzuführen ist.

In Sagittalschnitten des Gehirns konnte eine punktierte LacZ-Expression im Cortex, dem Corpus callosum, dem Thalamus, Hirnstamm und im Kleinhirn beobachtet werden.

Die Expression der Cx30T5M Mutation konnte in der Lunge (Abb. 4.8 D) indirekt durch eine Blaufärbung der Endothelzellen größerer Bronchiolen nachgewiesen werden. In der Niere wurde hingegen keine LacZ-Expression gefunden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt lässt sich aus diesen Analysen schließen, dass die Expression der Cx30T5M Mutation vergleichbar zu der des wtCx30-Proteins (Teubner et al., 2003) ist.

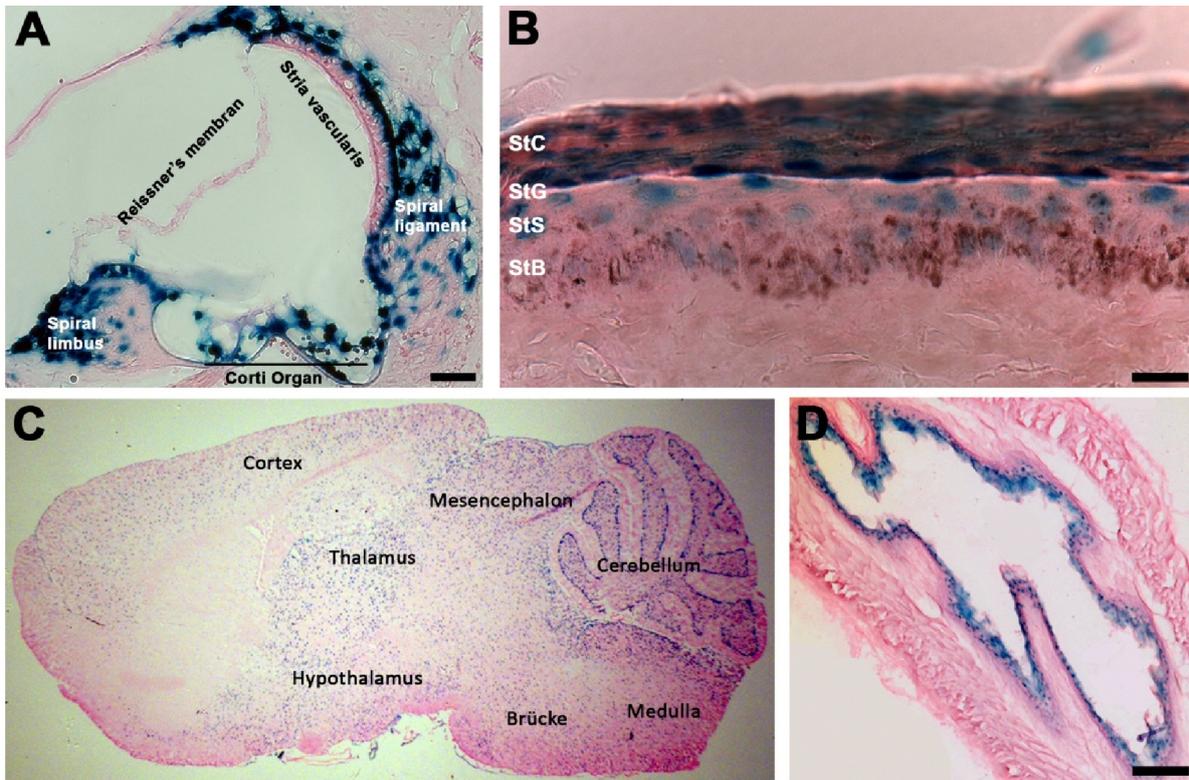


Abb. 4.8: Analyse der Cx30T5M Expression durch LacZ-Färbung in Cx30^{T5M/T5M} Tieren.

(A) LacZ-Expression in der Cochlea. Maßstabsbalken 20 μ m. (B) Indirekter Nachweis der Cx30T5M Expression im Stratum granulosum der Haut. StC: Stratum corneum, StG: Stratum granulosum, StS: Stratum spinosum, StB: Stratum basale. Maßstabsbalken 100 μ m. (C) LacZ-Expression im Gehirn. (D) LacZ-Expression im Endothel einer Bronchiole. Maßstabsbalken 100 μ m.

Mutationen im menschlichen *GJB6* Gen, das für Cx30 kodiert, sind nicht nur mit Taubheit, sondern auch mit Hauterkrankungen wie z. B. dem Clouston-Syndrom (siehe Kapitel 1.4.1.2 Cx30A88V) assoziiert, daher wurde bei der Charakterisierung der Cx30T5M-Mauslinie auch die Haut untersucht. In den Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen zeigten sich jedoch weder makroskopisch noch in näherer Betrachtung durch HE- und LacZ-Färbungen sowie Immunfluoreszenzanalysen mit verschiedenen Markerproteinen (Keratin1, Loricrin und Ki67) Unterschiede zu den Cx30^{+/+}- bzw. Cx30^{+T5M}-Mäusen (Daten nicht gezeigt). Da diese Ergebnisse mit der Beschreibung der Cx30T5M Mutation im Menschen übereinstimmen, wurde von weiteren Untersuchungen abgesehen. Aus diesen Gründen beschränken sich die nachfolgenden Analysen auf das Innenohr der Cx30T5M-Mäuse.

4.1.6 Hämalaun/ Eosin-Färbung der Cochlea

In Cx30 defizienten (Cx30^{-/-}) Mäusen wird die Taubheit und der Verlust des endocochlearen Potentials von einer Apoptose der äußeren und inneren Haarsinneszellen ab dem postnatalen Tag 17 (P17) begleitet (Teubner et al., 2003). Um zu untersuchen, ob auch die Cx30T5M Mutation einen solchen Einfluss auf die Morphologie der Cochlea hat, wurden

Paraffinschnitte von Cochleae adulter Tiere (P30) gefertigt und diese mit Hämalaun/ Eosin gefärbt. Wie den Bildern in Abbildung 4.9 zu entnehmen ist, sind die inneren und äußeren Haarsinneszellen sowie die sie umgebenden Stützzellen des Corti Organs der $Cx30^{+/T5M}$ - und $Cx30^{T5M/T5M}$ - Mäuse intakt. Auch die anderen cochlearen Strukturen sind unbeschädigt und zeigen keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu dem $Cx30^{+/+}$ -Kontrolltier. Das Einreißen der Reissner's Membran, das auf den Bildern zu sehen ist, ist zurückzuführen auf die Einbettung der Cochlea in Paraffin und dem nachfolgenden Schneiden am Mikrotom.

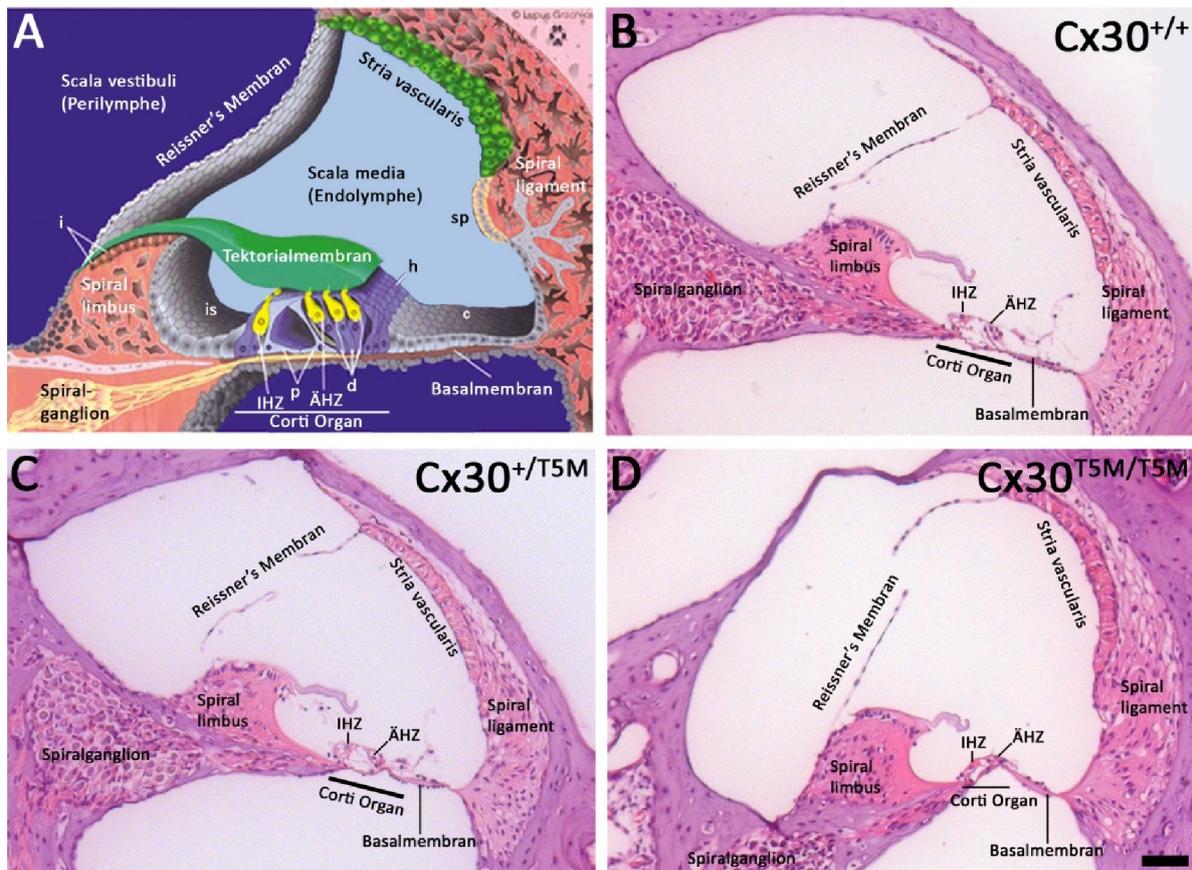


Abb. 4.9: HE-Färbung der Cochlea von $Cx30^{T5M}$ -Mäusen.

(A) Schematische Darstellung eines Querschnitts durch die Cochlea (nach einer Zeichnung von P. Küssel-Andermann). (B-D) Verglichen wurde die Morphologie der $Cx30^{+/+}$ -Cochlea mit der der $Cx30^{+/T5M}$ - und $Cx30^{T5M/T5M}$ -Cochleae. Zwischen den Cochleae der unterschiedlichen Genotypen wurden keine Unterschiede beobachtet. c: Claudiuszellen, d: Deiterzellen, h: Hensenzellen, I: Interdental Zellen, IHZ: innere Haarsinneszellen, IS: innere Sulcuszellen, ÄHZ: äußere Haarsinneszellen, p: Pillarzellen, sp: Spiralsprung. Maßstabsbalken: 20 μm .

4.1.7 Expressionsanalysen im Innenohr

4.1.7.1 Immunfluoreszenzanalysen in P5 und P30 Cochleae

Zur Charakterisierung der Connexin Expression im Innenohr der $Cx30^{T5M}$ -Mäuse wurden Immunfluoreszenzanalysen mit spezifischen Antikörpern gegen Cx26 und Cx30 zu

verschiedenen Zeitpunkten der cochlearen Entwicklung (P5 und P30) durchgeführt. Unterschiede in der Expression oder Lokalisation der Connexine wurden zu keinem Zeitpunkt der untersuchten Altersstufen zwischen den Genotypen $Cx30^{+/+}$, $Cx30^{+/T5M}$ und $Cx30^{T5M/T5M}$ beobachtet. Aus diesem Grund werden nachfolgend nur die Genotypen $Cx30^{+/+}$ und $Cx30^{T5M/T5M}$ gezeigt (Abb. 4.10-4.12). Um einen besseren Überblick über die Lage der cochlearen Strukturen zu gewährleisten, ist den vergrößerten Einzeldarstellungen immer ein Querschnitt der Cochlea vorangestellt.

An Tag P5 ist das Corti Organ noch sehr kompakt und mit dem Spiral limbus direkt über eine epitheliale Erhöhung (Köllicker Organ, „greater epithelial ridge“) verbunden (Jagger und Forge, 2006). Die verschiedenen Zelltypen sind kaum voneinander zu unterscheiden. Eine $Cx30$ Immunreaktivität konnte in allen Genotypen an den Zell-Zell-Kontakten zwischen den sich entwickelnden Stützzellen des Corti Organs, den Fibrozyten des Spiral limbus und Spiral ligament sowie in den Intermediär- und Basalzellen der Stria vascularis detektiert werden (Abb. 4.10).

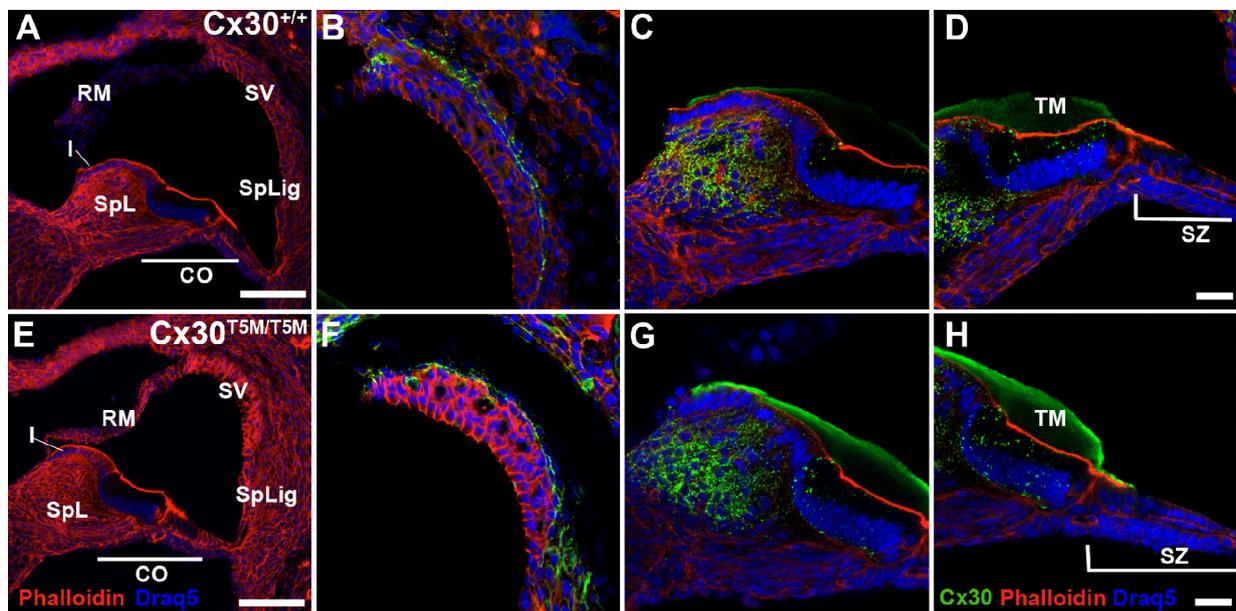


Abb. 4.10: Cx30 Expressionsanalyse an Cochleae fünf Tage alter Tiere.

Durch spezifische Antikörper wurde $Cx30$ (grün) zwischen den Zell-Zell-Kontakten benachbarter Zellen nachgewiesen. Um einzelne Strukturen besser erkennen zu können, wurden **Actin-Filamente** mit Phalloidin (rot) und **Zellkerne** mit Draq5 (blau) angefärbt. Die obere Reihe (A-D) zeigt die Cochlea eines $Cx30^{+/+}$ -Tiers und darunter (E-H) ist die Cochlea einer $Cx30^{T5M/T5M}$ -Maus abgebildet. (A) Querschnitt durch die Cochlea einer $Cx30^{+/+}$ -Maus. Die Bilder B-D zeigen Vergrößerungen einzelner Strukturen: (B) Stria vascularis. (C) Spiral limbus. (D) Corti Organ. (E) Querschnitt durch eine $Cx30^{T5M/T5M}$ -Cochlea. (F-H) Vergrößerungen der Stria vascularis (F), des Spiral limbus (G) und des Corti Organs (H). CO: Corti Organ. I: Interdentalzellen. RM: Reissner's Membran. TM: Tektorialmembran. SpL: Spiral limbus. SpLig: Spiral ligament. SV: Stria vascularis. SZ: Stützzellen des Corti Organs. Maßstabsbalken der Abbildungen A und E entspricht 50 μm . Maßstabsbalken der Abbildungen B-D und F-H: 20 μm .

Abbildung 4.11 zeigt Vibratomschnitte der Cochleae adulter (P30) $Cx30^{+/+}$ - und $Cx30^{T5M/T5M}$ -Mäuse. Vor allem die Intermediär- und Basalzellen der Stria vascularis sowie die, sie umgebenden, Fibrozyten des Spiral ligaments zeigen eine deutliche Cx30 Expression (Abb. 4.11 B, F). Die Expression von Cx30 wurde auch in den Interdentalzellen und Fibrozyten des Spiral limbus nachgewiesen (Abb. 4.11 C, G). Aus dem nach der Geburt noch sehr kompakt erscheinenden Corti Organ entwickelt sich bis zum Beginn des Hörens an Tag P12 das adulte Corti Organ. Ab diesem Zeitpunkt lassen sich die sensorischen inneren und äußeren Haarsinneszellen klar von den nicht-sensorischen Stützzellen des Corti Organs unterscheiden. Die Haarsinneszellen weisen keine Cx30 Expression auf, wohingegen die umliegenden Stützzellen (Pillar und Deiter Zellen) eine starke Cx30 Immunreaktion zeigen. Auch in den inneren (Epithelzellen zwischen dem Spiral limbus und den inneren Haarsinneszellen) und äußeren Sulcuszellen (Epithelzellen zwischen den äußeren Haarsinneszellen und dem Spiral ligament) konnte Cx30 nachgewiesen werden (Abb. 4.11 D, H). Die Lokalisation des Cx30 Proteins unterscheidet sich nicht zwischen den untersuchten Genotypen $Cx30^{+/+}$, $Cx30^{+/T5M}$ und $Cx30^{T5M/T5M}$.

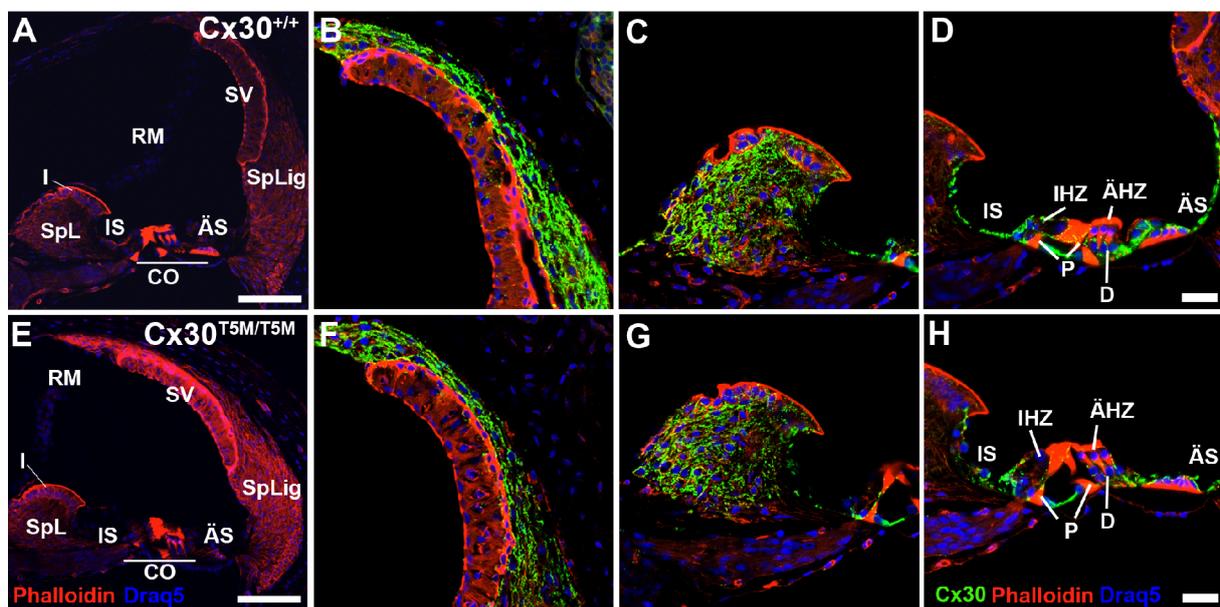


Abb. 4.11: Immunfluoreszenzanalyse adulter $Cx30^{T5M}$ -Mäuse.

Obere Reihe: $Cx30^{+/+}$ -Maus. Untere Reihe $Cx30^{T5M/T5M}$ -Maus. (A) Querschnitt durch eine $Cx30^{+/+}$ -Cochlea. Cx30 (grün) Expression in der Stria vascularis (B), dem Spiral limbus (C) und dem Corti Organ (D). (E) Querschnitt durch die Cochlea einer $Cx30^{T5M/T5M}$ -Maus. Cx30 wird in den Intermediär- und Basalzellen der Stria vascularis, in den Fibrozyten des Spiral limbus (G), in den inneren und äußeren Sulcus Zellen, sowie den Stützzellen der Corti Organs (H) exprimiert. Hervorgehoben wurden durch Phalloidin (rot) Aktinfilamente und durch Draq5 (blau) die Zellkerne. ÄHZ: äußere Haarsinneszellen, ÄS: äußere Sulcuszellen, CO: Corti Organ. I: Interdentalzellen, IHZ: innere Haarsinneszellen, IS: innere Sulcuszellen, RM: Reissner's Membran, TM: Tektorialmembran, SpL: Spiral limbus, SpLig: Spiral ligament, SV: Stria vascularis, SZ: Stützzellen des Corti Organs. Maßstabsbalken der Abbildungen A und E: 50 μ m. Maßstabsbalken der Abbildungen B-D und F-H: 20 μ m.

Im Innenohr treten die Connexine Cx26 und Cx30 häufig im selben Gap Junction Kanal auf und formen heteromere Kanäle (Zhang et al., 2005). Durch die Expression der Cx30T5M Mutation anstelle des wtCx30 könnte die beschriebene Bildung heteromerer Kanäle oder auch die Expression des wtCx26 beeinflusst werden. Deswegen wurden die Cx30^{+/+}-, Cx30^{+T5M}- und Cx30^{T5M/T5M}-Mäuse hinsichtlich ihrer wtCx26 Expression und einer Kolokalisation mit wtCx30 bzw. Cx30T5M untersucht. In allen Genotypen wurde wtCx26 in den Stützzellen des Corti Organs, den Intermediär- und Basalzellen der Stria vascularis sowie den Fibrozyten des Spiral ligaments und Spiral limbus exprimiert (Abb. 4.12). Eine Kolokalisation von Cx26 mit Cx30 (Abbildung 4.12 gelb) wurde sowohl in Cx30^{+T5M}-Tieren als auch in Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in den Immunfluoreszenzanalysen die Mutation Cx30T5M weder einen Einfluss auf die Lokalisation des wtCx30 noch des wtCx26 zeigt.

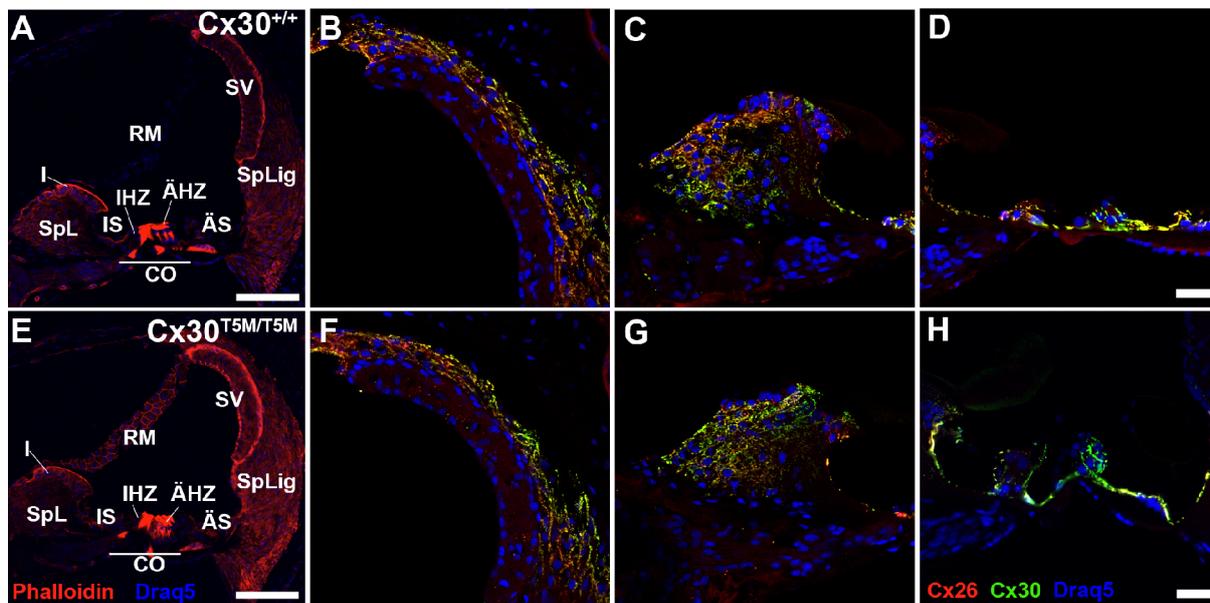


Abb. 4.12: Expressionsanalyse der Connexine Cx26 und Cx30 in der Cochlea transgener Cx30T5M Mäuse.

Obere Reihe: Cx30^{+/+}-Cochlea. Untere Reihe: Cx30^{T5M/T5M}-Cochlea. (A, E) Querschnitt durch eine Cx30^{+/+}- bzw. Cx30^{T5M/T5M}-Cochlea. Die Aktinfilamente sind in rot (Phalloidin) und die Zellkerne in blau (Draq5) gefärbt. In den nachfolgenden Bildern wurde auf die Markierung der Aktinfilamente durch Phalloidin verzichtet, um eine Cx26/Cx30 Koimmunfluoreszenz zu ermöglichen. Die Cx26 (grün) bzw. Cx30 (rot) Expression unterscheidet sich nicht in den verschiedenen Genotypen. (B, F) Stria vascularis. (C, G) Spiral limbus. (D, H) Corti Organ. ÄHZ: äußere Haarsinneszellen, ÄS: äußere Sulcuszellen, CO: Corti Organ, I: Interdentalzellen, IHZ: innere Haarsinneszellen, IS: innere Sulcuszellen, RM: Reissner's Membran, TM: Tektorialmembran, SpL: Spiral limbus, SpLig: Spiral ligament, SV: Stria vascularis, SZ: Stützzellen des Corti Organs. Maßstabsbalken der Abbildungen A und E: 50 µm. Maßstabsbalken der Abbildungen B-D und F-H: 20 µm.

4.1.7.2 Quantitative Immunoblotanalysen

Die Cx26 und Cx30 Expression im Innenohr wurde quantitativ durch Immunoblotanalysen untersucht (Abb. 4.13). Das wtCx26 Expressionsniveau in adulten Cx30^{+/^{T5M}}- und Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen, das gegen das entsprechende Expressionsniveau (100%) in Cx30^{+/⁺}-Mäusen normalisiert wurde, war in Mäusen beider Genotypen signifikant reduziert ($P < 0.05$). Durchschnittlich zeigten Cx30^{+/^{T5M}}-Mäuse eine Reduktion auf 53±14% (n=5) und Cx30^{T5M/T5M}-Mäuse eine Reduktion auf 34±14% (n=3) der wtCx26 Expression (4.13 A). In Mäusen des Genotyps Cx30^{T5M/T5M} war zudem auch die Cx30 Expression gegenüber Cx30^{+/⁺}-Tieren signifikant ($P < 0.05$) auf 31±25% (n=3) der Cx30 Expression reduziert. Das Cx30 Expressionsniveau in Cx30^{+/^{T5M}}-Mäusen war auf 63±23% (n=5) verringert (4.13 B). Wie den relativ großen Fehlerindikatoren zu entnehmen ist, zeigten die Immunoblotanalysen eine hohe Variabilität hinsichtlich der erlangten Ergebnisse.

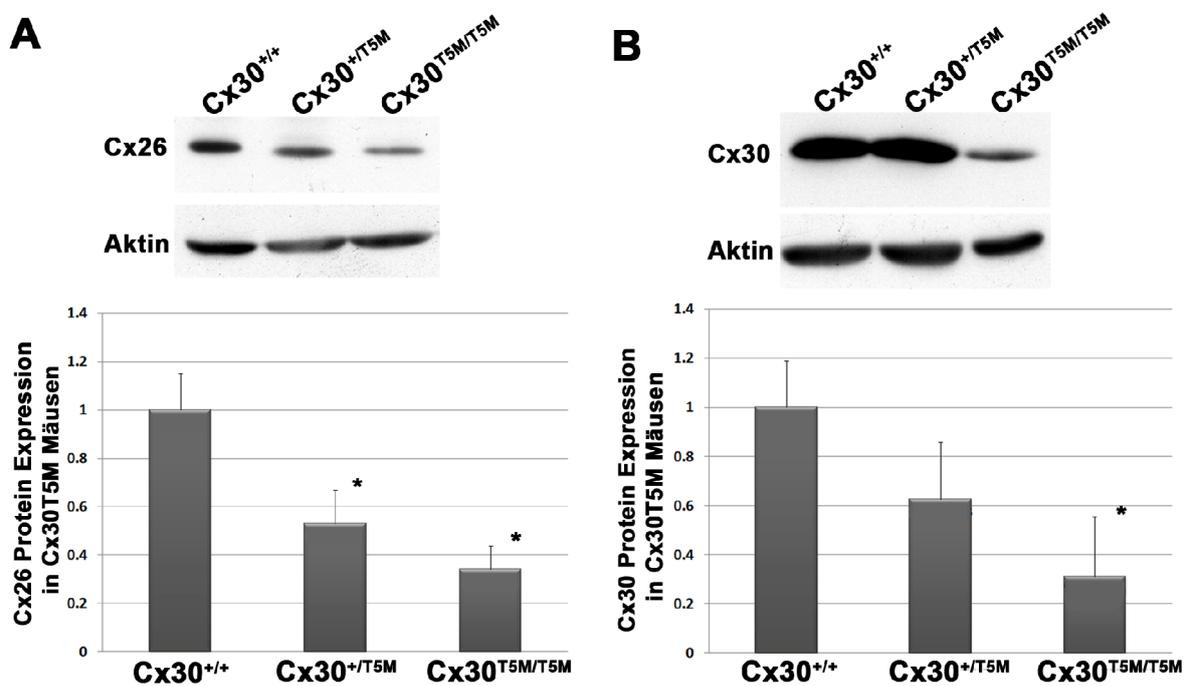


Abb. 4.13: Quantitative Immunoblotanalyse gegen Cx26 und Cx30 in Cochleae adulter Cx30^{+/⁺}-, Cx30^{+/^{T5M}}- und Cx30^{T5M/T5M}-Mäuse.

Zur Überprüfung und dem Abgleich der aufgetragenen Proteinmenge wurde eine Immunoblotanalyse gegen Aktin durchgeführt. Die Sternchen (*) verweisen auf die signifikante Herunterregulation der Cx26 bzw. Cx30 Expression in den Cx30^{+/^{T5M}}- und Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen im Vergleich zu den Cx30^{+/⁺}-Tieren.

4.1.8 Ableitung der Hörschwellen am Hirnstamm und Analyse des endocochlearen Potentials

Die in den nachfolgenden Abschnitten beschriebenen elektrophysiologischen Untersuchungen der Cx30T5M-Mäuse sind in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von

Prof. Fabio Mammano, Venetian Institute of Molecular Medicine, Foundation for Advanced Biomedical Research, Universität Padua, Italien und Prof. Karen Steel, Wellcome Trust Institute, University of Cambridge, Großbritannien durchgeführt worden.

Im Menschen führt die Ausprägung der Cx30T5M Mutation zu einer mittleren Schwerhörigkeit oder sogar zu einer schweren Taubheit (Grifa et al., 1999). Die Fähigkeit des Hörens wurde in Cx30T5M-Mäusen durch Ableitungen elektrischer Signale am Hirnstamm (ABR, **A**uditory **B**rainstem **R**esponse) untersucht, die durch „Click“-Geräusche und Töne zwischen 8-32 kHz (8-14-20-26-32 kHz) stimuliert wurden. Charakterisiert wurden Mäuse im Alter von P17-P90 (Cx30^{+/+} n=15, Cx30^{+/T5M} n=23, Cx30^{T5M/T5M} n=16). Um eine mögliche Verschlechterung des Hörens mit zunehmendem Alter zu untersuchen, wurden einige der Tiere (n = 3 pro Genotyp und Altersstufe) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung (P17, P35, P90) vermessen, zeigten jedoch keine Veränderungen der Hörschwellen über die Zeit. Anders als im Menschen (Grifa et al., 1999) waren die Hörschwellen in Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen in allen Frequenzen nur leicht um 15 dB erhöht. Im Vergleich zu den vermessenen Cx30^{+/+}-Tieren war diese Erhöhung jedoch signifikant ($P < 0.005$) (Abb. 4.14 A, rot). Unterschiede zwischen Cx30^{+/+}- (Abb. 4.14, blau) und Cx30^{+/T5M}-Mäusen (Abb. 4.14, grün) wurden nicht gefunden. Als Kontrolle für Taubheit in Mäusen wurden Cx30^{-/-}-Mäuse vermessen, die wie schon in den vorhergegangenen Studien (Teubner et al., 2003), eine starke Erhöhung der Hörschwellen um 60-80 dB zeigten (Abb. 4.14 A, schwarz).

Bei der Charakterisierung der Cx30^{-/-}-Mäuse wurde begleitend zu der auftretenden Taubheit das Fehlen des endocochlearen Potential festgestellt (Teubner et al., 2003). Daher wurde auch die Cx30T5M-Mauslinie hinsichtlich des endocochlearen Potentials (+80 mV, vgl. Kap. 1.2.3.2) untersucht. In Übereinstimmung mit der nur mild ausgeprägten Schwerhörigkeit in Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen ergaben die Messungen des endocochlearen Potentials keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen (Abb. 4.14 B).

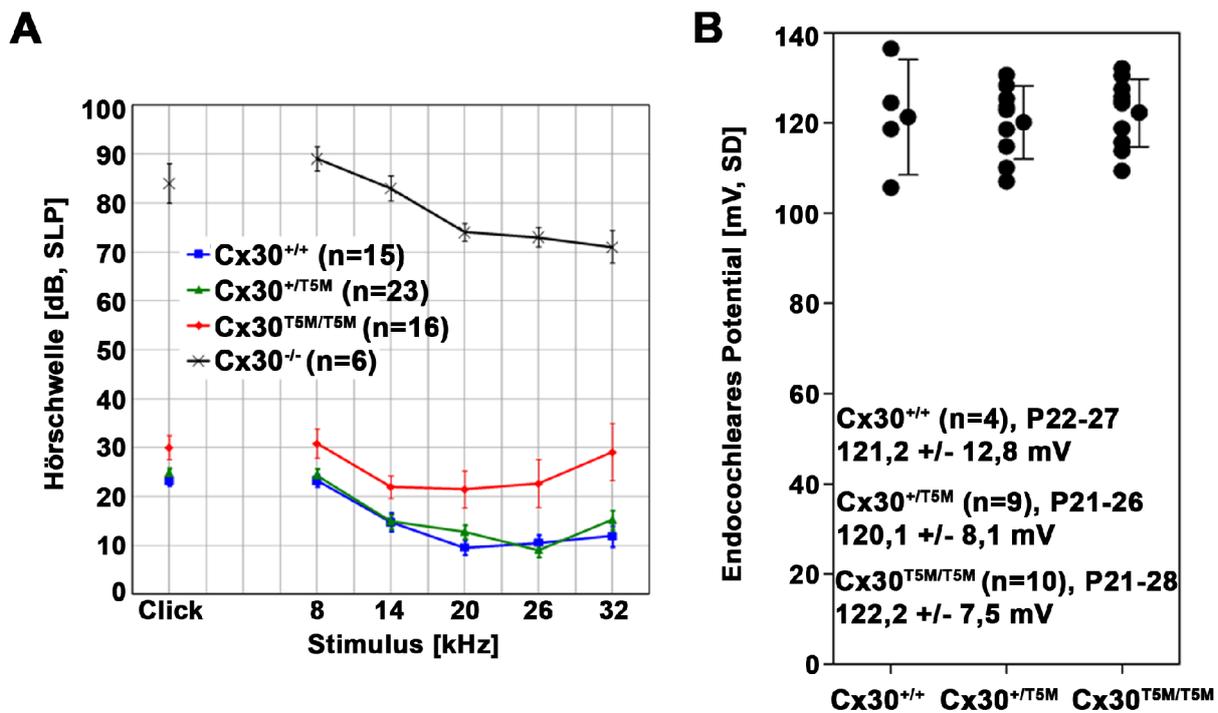


Abb. 4.14: Messungen der Hörschwellen und des endocochlearen Potentials in Cx30T5M-Mäusen.

(A) Gezeigt werden die Hörschwellen für „Clicks“ und verschiedene Tonfrequenzen im Bereich zwischen 8 und 32 kHz. Die Fehlerindikatoren geben den jeweiligen Standardfehler an. (B) Messungen des endocochlearen Potentials in Mäusen im Alter von P21-P28. Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung.

4.1.9 Gap-FRAP Analyse zur Überprüfung der Permeabilität von Cx30T5M Gap Junction Kanälen

Verschiedene Studien weisen daraufhin, dass eine verminderte biochemische Permeabilität der Gap Junction Kanäle für größere Moleküle, wie z. B. IP₃, die Ursache für durch Connexin Mutationen verursachte Taubheit ist (Harris, 2007). Wie aus Untersuchungen Cx26 und Cx30 defizienter Mäuse (Cohen-Salmon et al., 2002; Teubner et al., 2003) hervorgeht, spielen die Connexine Cx26 und Cx30 in der Cochlea eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und dem Erhalt des Corti Organs. Um zu überprüfen, ob der milde Hörverlust in den Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen auf eine verringerte Zell-Zell-Kopplung während der postnatalen Entwicklung zurückzuführen ist, wurden Gap-FRAP Analysen (Wade et al., 1986; Anselmi et al., 2008; Ortolano et al., 2008) in P5 organotypischen Cochlea-Kulturen durchgeführt. Diese wurden zuvor mit dem fluoreszierenden Farbstoff Calcein behandelt. Untersucht wurde die Region der inneren und äußeren Sulcus Zellen. Zu diesem Zeitpunkt der cochlearen Entwicklung ist der Spiral limbus durch das Köllicker Organ mit dem Corti Organ verbunden. Die späteren inneren Sulcuszellen liegen im Bereich des Köllicker Organs (vgl Abb. 4.10 und 4.11), die späteren äußeren Sulcuszellen sind zwischen den äußeren Haarsinneszellen und dem Spiral ligament lokalisiert.

Nach dem Ausbleichen eines definierten Areals durch einen Laserimpuls (Wellenlänge 405 nm), wurde die Fluoreszenzregeneration durch die Diffusion von Calcein aus den benachbarten, nicht-gebleichten Zellen gemessen. Dabei war zu beachten, dass eine vollständige Regeneration der Fluoreszenz einhergehend mit vorherigen Studien (Rabut und Ellenberg, 2005), aufgrund der Ansammlung eines gewissen Teils von Calcein in subzellulären Organellen, nicht erlangt wird.

In Cx30^{+/+} organotypischen Kulturen der Cochlea konnte eine Fluoreszenzregeneration durch die Ausbreitung von Calcein zwischen den inneren bzw. äußeren Sulcuszellen beobachtet werden (Abb. 4.15, blau). In Cx30^{+T5M}-Kulturen zeigte sich hingegen eine leichte Reduktion der Farbstoff-Kopplung (Abb. 4.15, grün Linie). Diese Reduktion des Farbstoff-Transfers war in den Cx30^{T5M/T5M}-Zellen jedoch sehr viel ausgeprägter (Abb. 4.15, rot). Als Kontrolle wurden Cx30^{+/+}-Kulturen vor der Gap-FRAP Analyse mit Carbenoxolon (CBX), einem nicht-spezifischen Inhibitor von Gap Junction Kanälen (Rozental et al., 2001) inkubiert (Abb. 4.15 schwarz). Ein Farbstoff-Transfer in den so behandelten Zellen wurde nicht beobachtet. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Zell-Zell-Kopplung durch die Mutation Cx30T5M beeinträchtigt, jedoch nicht vollständig inhibiert wird wie in den mit CBX behandelten Cochlea-Kulturen, die einen Calcein-Transfer nicht mehr zulassen.

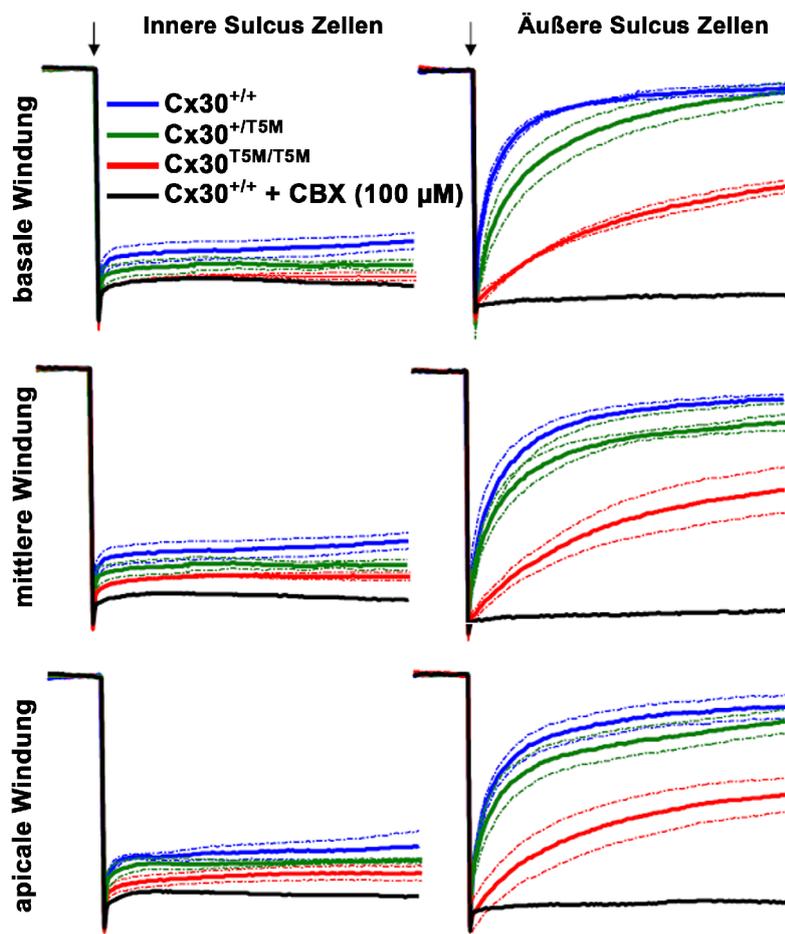


Abb. 4.15: Untersuchung der Gap Junction Permeabilität durch Gap-FRAP Analyse in der Cochlea.

Abgebildet ist die Regeneration der Fluoreszenzintensität (fb/fu, gebleicht/ungebleicht) gegen die Zeit in inneren (links) und äußeren Sulcuszellen (rechts) von der basalen, über die mittlere bis hin zur apicalen Cochleawindung. Die durchgezogenen Linien spiegeln den Durchschnitt dreier unabhängiger Versuche (n=3) wieder. Gestrichelte Linien verweisen auf 1 σ Konfidenzintervalle. Die Pfeile markieren die Zeit des gegebenen Laserimpulses (405 nm). CBX: Carbenoxolon.

4.1.10 Untersuchung der ATP-Freisetzung durch Connexin Halbkanäle

Verschiedene Studien belegen die Bildung von Connexin-Halbkanälen (Bennett et al., 2003; Goodenough und Paul, 2003) und ihre Rolle als ATP-freisetzende Kanäle im Innenohr (Zhao et al., 2005; Majumder et al., 2010). Gap Junction Vollkanäle erlauben hingegen die Diffusion Ca^{2+} -mobilisierter Sekundärbotenstoffe zwischen diesen Zellen (Beltramello et al., 2005; Anselmi et al., 2008).

Vor dem Beginn des Hörens setzen die inneren Sulcuszellen spontan ATP in den extrazellulären Raum frei (Tritsch et al., 2007). Dadurch kommt es zur Aktivierung purinergeer Rezeptoren in der Nachbarschaft der ATP-freisetzenden Zellen und damit zu einer erhöhten Ca^{2+} -Ausschüttung (Tritsch und Bergles, 2010). Um diese spontane Aktivität der inneren Sulcuszellen zu untersuchen, wurden Cochleae aus P5 $\text{Cx30}^{+/+}$ -Mäusen in Kultur genommen und mit dem Ca^{2+} Sensor „fluo-4“ behandelt. Ohne eine gezielte Stimulation der kultivierten Zellen wurden spontan eintretende Ca^{2+} -Signale aufgezeichnet. Diese konnten durch Zugabe von Flufenaminsäure (FFA) oder Nifluminsäure (NFA) (Bruzzone et al., 2005; Anselmi et al., 2008) – Inhibitoren von Connexin-Halbkanälen – reversibel unterbunden werden (Abb. 4.16, exemplarisch gezeigt für FFA).

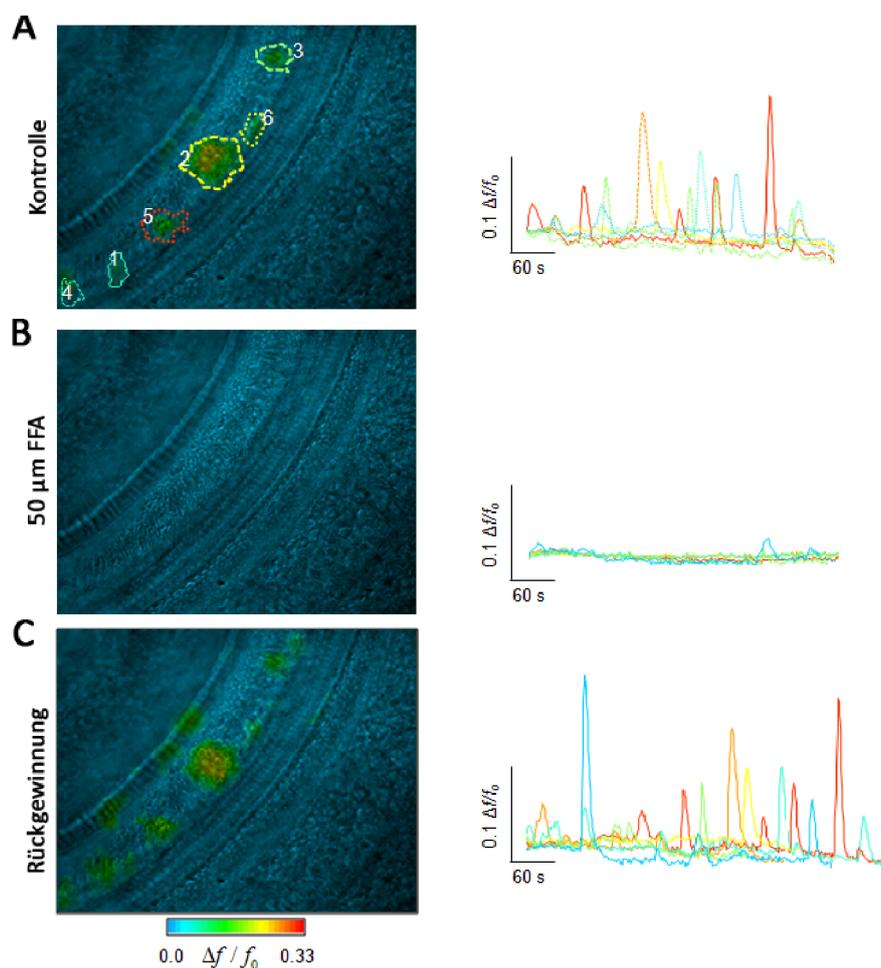


Abb. 4.16: Spontane Aktivität der inneren Sulcuszellen kann reversibel durch den Connexin Halbkanal Inhibitor FFA verhindert werden.

(A) Links: Dargestellt ist eine Projektion bestehend aus 30 Einzelbildern von P5 Cochlea-Kulturen, die mit dem Ca^{2+} -Marker „fluo-4“ behandelt wurden. Hervorgehoben sind sechs Regionen des Interesses (regions of interest, ROIs) mit unterschiedlicher Ca^{2+} -Aktivität. Rechts: Die durchschnittliche Pixelanzahl der ROIs ergeben die „fluo-4“ Spuren der Ca^{2+} -Aktivität innerhalb einer 7-minütigen Aufzeichnung. (B) Inhibierung der Ca^{2+} -Aktivität nach 20-minütiger Inkubation mit FFA. (C) Regeneration der Fluoreszenz nach Auswaschen von FFA.

Die spontane Ca^{2+} -Aktivität sollte auch quantitativ in Cochlea-Kulturen von $\text{Cx30}^{+/+}$ - und $\text{Cx30}^{\text{T5M/T5M}}$ -Mäusen analysiert werden. Dazu wurde die Ca^{2+} -Aktivität unter standardisierten Bedingungen (Beleuchtungsintensität, Expositionszeit, Bildfrequenz und Dauer der Aufzeichnung (7 min)) aufgezeichnet und anschließend aus vier unabhängigen Versuchen zusammengefasst (Tab. 4.1, Abb. 4.17). Um die Vergleichbarkeit zwischen den $\text{Cx30}^{+/+}$ - und $\text{Cx30}^{\text{T5M/T5M}}$ -Kulturen zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass die Größe der vermessenen Regionen ungefähr gleich war: $\text{Cx30}^{+/+}$ $1,35 \pm 1,13 \mu\text{m}^2$ und $\text{Cx30}^{\text{T5M/T5M}}$ $1,22 \pm 1,06 \mu\text{m}^2$. Im Unterschied zu der Ca^{2+} -Aktivität in $\text{Cx30}^{+/+}$ -Cochleakulturen war diese in $\text{Cx30}^{\text{T5M/T5M}}$ -Kulturen sowohl hinsichtlich der Frequenz als auch der Peak Amplitude der auftretenden Ereignisse signifikant um den Faktor 3,6 bzw. 2 reduziert (Tab. 4.1). Wie der Grafik in Abbildung 4.17 A zu entnehmen ist, war die Wellenform der Ca^{2+} -Signale in $\text{Cx30}^{\text{T5M/T5M}}$ -Mäusen im Durchschnitt kleiner und breiter als die der $\text{Cx30}^{+/+}$ -Mäuse. Die Verteilung der Amplituden überlappt in den niedrigeren Bereichen, jedoch fehlen die Signale der mittleren und hohen Amplituden in $\text{Cx30}^{\text{T5M/T5M}}$ -Kulturen ganz (Abb. 4.17 B-D).

	$\text{Cx30}^{+/+}$	$\text{Cx30}^{+/T5M}$	$\text{Cx30}^{\text{T5M/T5M}}$
Peak Amplitude ($\Delta f/f_0$)	$0,22 \pm 0,14$	$0,11 \pm 0,05$	$<3 \times 10^{-6}$
Ereignisse/ min	$14,0 \pm 5,9$	$3,9 \pm 1,3$	$<0,015$

Tab. 4.1: Eigenschaften der spontanen Ca^{2+} -Ereignisse.

Mittelwert \pm Standardabweichung unabhängig voneinander wiederholter Experimente ($n = 4$). P entspricht der Wahrscheinlichkeit, dass die Mittelwerte der $\text{Cx30}^{+/+}$ - und $\text{Cx30}^{\text{T5M/T5M}}$ -Mäuse gleich sind, basierend auf der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, engl. one-way analysis of variance).

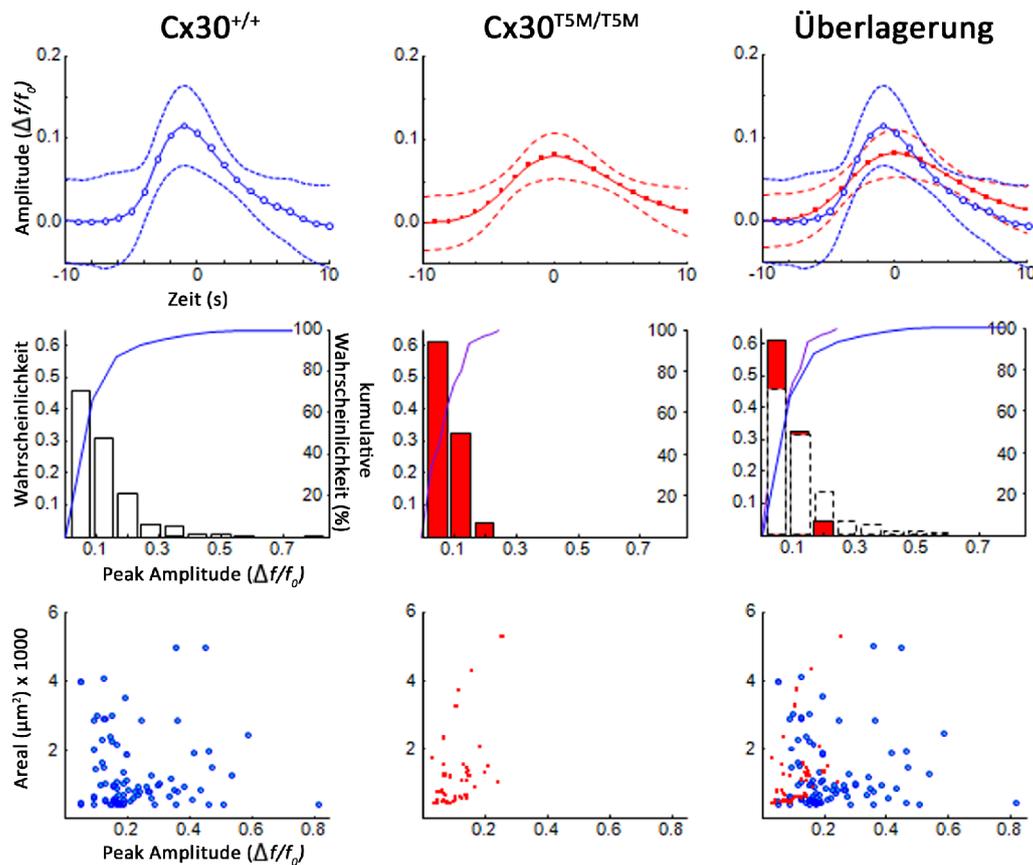


Abb. 4.17: Die spontane Aktivität der inneren Sulcuszellen ist in Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen im Vergleich zu Cx30^{+/+}-Mäusen signifikant reduziert.

Zusammengefasste Daten aus der 7-minütigen Aufnahme der spontanen Ca²⁺-Aktivität (n=4, pro Genotyp). (A) Wellenform der spontanen Ca²⁺-Signale gegen die Zeit (s). Durchgezogene Linien sind Spline-Interpolationen von Durchschnittsdaten (Symbole), gestrichelte Linien markieren die Konfidenzintervalle der Standardabweichung. (B) Wahrscheinlichkeits-Histogramme der Ca²⁺-Signal Amplitude. (C) Box-and-Whisker Diagramme (Kastendiagramm) der Daten aus B. $p < 3 \times 10^{-6}$ zeigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Mittelwerte der Cx30^{+/+}- und Cx30^{T5M/T5M}-Mäuse gleich sind, basierend auf der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, one-way analysis of variance). (D) Scatter-Diagramm der Ca²⁺-Signale gegen die Amplitude.

In dem vorangegangenen Kapitel wurde die Erzeugung und Charakterisierung der Cx30T5M-Mauslinie als mögliches Modell für humane nicht-syndromische Taubheit beschrieben. Die Ergebnisse dieser Charakterisierung zeigen eine Erhöhung der Hörschwellen der Cx30^{T5M/T5M}-Mäuse um 15 dB in allen Frequenzen. Begleitet wird diese milde Schwerhörigkeit von einem verminderten Calcein-Transport durch Gap Junction Kanäle in den inneren und äußeren Sulcuszellen des Innenohrs sowie einer Reduktion der spontanen Ca²⁺-Aktivität aufgrund der Freisetzung von ATP während der postnatalen Entwicklung der Cochlea. Immunfluoreszenzanalysen weisen auf eine unveränderte Lokalisation der Connexine Cx26 und Cx30 in der Cochlea von Cx30^{+/T5M}- und Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen, wobei, wie quantitative Immunoblotanalysen zeigen, die Expression der Connexine Cx26 und Cx30 stark herunterreguliert ist.

4.2 Erzeugung der Cx30A88V-Mauslinie

Cx30 Punktmutationen können neben nicht-syndromischer auch zu syndromischer Taubheit führen, so wird im nachfolgenden Kapitel die Erzeugung einer Cx30A88V-Mauslinie beschrieben. Im Menschen verursacht die Punktmutation Cx30A88V das Clouston Syndrom. Das Clouston-Syndrom ist eine vererbare Hauterkrankung, die in seltenen Fällen mit einem Hörverlust einhergeht und von Cx30 Mutationen hervorgerufen wird. Zur Untersuchung des Clouston-Syndroms *in vivo* sollte eine Mauslinie erzeugt werden, die die Cx30A88V Mutation unter der Kontrolle des endogenen Cx30-Promoters exprimiert. Dafür wurde die Mutation in das mCx30 Gen (*Gjb6*) eingeführt und zur Erzeugung eines Austauschvektors für die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) verwendet.

4.2.1 Der konditionale Austauschvektor „Cx30KICx30A88V“

Für die Erzeugung des 19 kb großen Austauschvektors „Cx30KICx30A88V“ wurde ein konditionaler Ansatz gewählt, der die zelltypspezifische Expression der Cx30A88V Mutation nach Cre-vermittelter Deletion der wtCx30 kodierenden Region erlaubt. Der konditionale Ansatz wurde gewählt, um mit Hilfe von Mauslinien, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle verschiedener zelltyp-spezifischer Promotoren exprimieren, den Effekt der Mutationen in der Haut und im Innenohr unabhängig voneinander untersuchen zu können. Eine schematische Darstellung des Austauschvektors ist in Abb. 4.18 zu finden. Um die Rekombination in embryonalen Stammzellen zu ermöglichen, beinhaltet der vorliegende Vektor zwei zur wtCx30 Sequenz homologe Regionen, die im 5' Bereich 4,3 kb und im 3' Bereich 1,3 kb groß sind. Zwischen den 5'- und 3'-Homologieregionen liegt die kodierende Region des murinen wtCx30. Zur Selektion in embryonalen Stammzellen der Maus folgt stromabwärts der wtCx30 kodierenden Region eine von *frt*-Stellen flankierte Neomycin-Resistenzkassette. Diese steht unter der Kontrolle eines *pgk*-Promoters und liegt entgegengesetzt zur Leserichtung des wtCx30 Gens. Das wtCx30 Gen und die Neomycin-Resistenzkassette werden von *loxP*-Stellen in gleicher Orientierung flankiert, die die Deletion des wtCx30 sowie der Neomycin-Resistenzkassette durch die Cre-Rekombinase zelltypspezifisch erlauben. Stromabwärts dieser Sequenzen befindet sich die für die Punktmutation Cx30A88V kodierende Region. Vergleichbar zu dem Cx30T5M Austauschvektor (Kap. 4.1.1) folgt eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) sowie ein *NLS-LacZ* Gen, das für die β -Galaktosidase kodiert. Außerdem beinhaltet der Austauschvektor eine Ampizillin-Resistenzkassette zur Selektion während der Vervielfältigung des Vektors in transformationskompetenten Bakterien. Der Austauschvektor kann vor dem Einbringen in ES-Zellen durch das Restriktionsenzym *NotI* linearisiert werden.

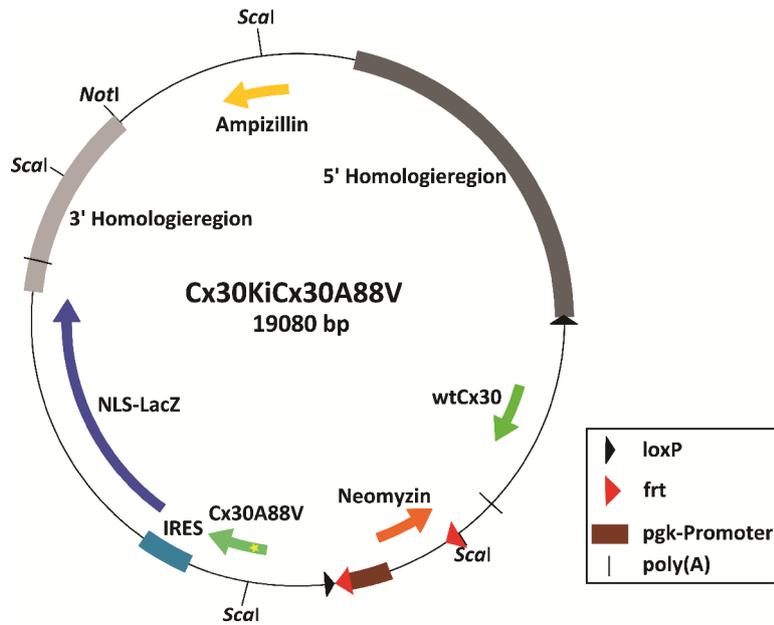


Abb. 4.18: Der konditionale Austauschvektor „Cx30KiCx30A88V“. Eingezeichnet sind die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *NotI* und *Scal*. Hierbei wird das Restriktionsenzym *NotI* zur Linearisierung des Austauschvektors vor der Transfektion embryonaler Stammzellen verwendet. Zusätzlich zu den drei bereits vorhandenen *Scal*-Restriktionsschnittstellen wurde eine weitere *Scal*-Schnittstelle eingeführt. Diese liegt auf der Cx30A88V Mutation und erlaubt den Nachweis der Mutation mittels PCR und anschließender Restriktionsspaltung.

4.2.2 Erzeugung des konditionalen Cx30A88V Austauschvektors

4.2.2.1 Einbringen der Cx30A88V Mutation in das mCx30 Gen (*Gjb6*) durch Mutagenese-PCR

Zur gezielten Erzeugung der Cx30A88V Punktmutation wurde eine PCR-Mutagenese, bestehend aus drei PCR-Reaktionen durchgeführt. In den ersten beiden PCR-Reaktionen, PCR I und II, wurden die stromaufwärts und stromabwärts der Mutation liegenden Teilsequenzen in zwei unabhängigen Reaktionsansätzen amplifiziert (Abb. 4.19). Durch geeignete Startermoleküle wurde das für Alanin kodierende Codon GCA an Position 88 des mCx30 Gens (*Gjb6*) durch das für Valin kodierende Codon GTA ersetzt. Zum indirekten Nachweis der Mutation wurde eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Scal* (AGTACT) inseriert. Die amplifizierten Fragmente waren 889 bp (Startermoleküle Cx30for, Cx30A88Vrev) und 692 bp (Startermoleküle Cx30rev, Cx30A88Vfor) groß. In beiden Reaktionen wurde als DNS-Matrize das Plasmid „10b1b/pBS SK+_mCx30Genlokus“ (D. Manthey, Diplomarbeit 1994) eingesetzt, welches den Cx30-Genlokus der Maus enthält. Für die Amplifikation der DNS-Sequenzen wurde die *Taq*-Polymerase verwendet. In einer dritten PCR-Reaktion wurden die Teilsequenzen zu einer für Cx30A88V kodierenden Sequenz vereinigt und durch die Zugabe der externen Startermoleküle Cx30for und Cx30rev vervielfältigt. Durch das Startermolekül Cx30rev wurden zwei zusätzliche Restriktionsschnittstellen eingebaut: *NsiI* (ATGCAT) und *Bam*HI (GGATCC). Diese wurden während der nachfolgenden Klonierung des Austauschvektors „Cx30KiCx30A88V“ verwendet. Um ungewünschte Mutationen zu umgehen, wurde in der dritten PCR die

Phusion High Fidelity Polymerase mit Korrekturlesefunktion (3′-5′-Exonuklease-Aktivität) eingesetzt. In Abbildung 4.19 sind die Einzelschritte der Mutagenese-PCR für die Mutation Cx30A88V dargestellt.

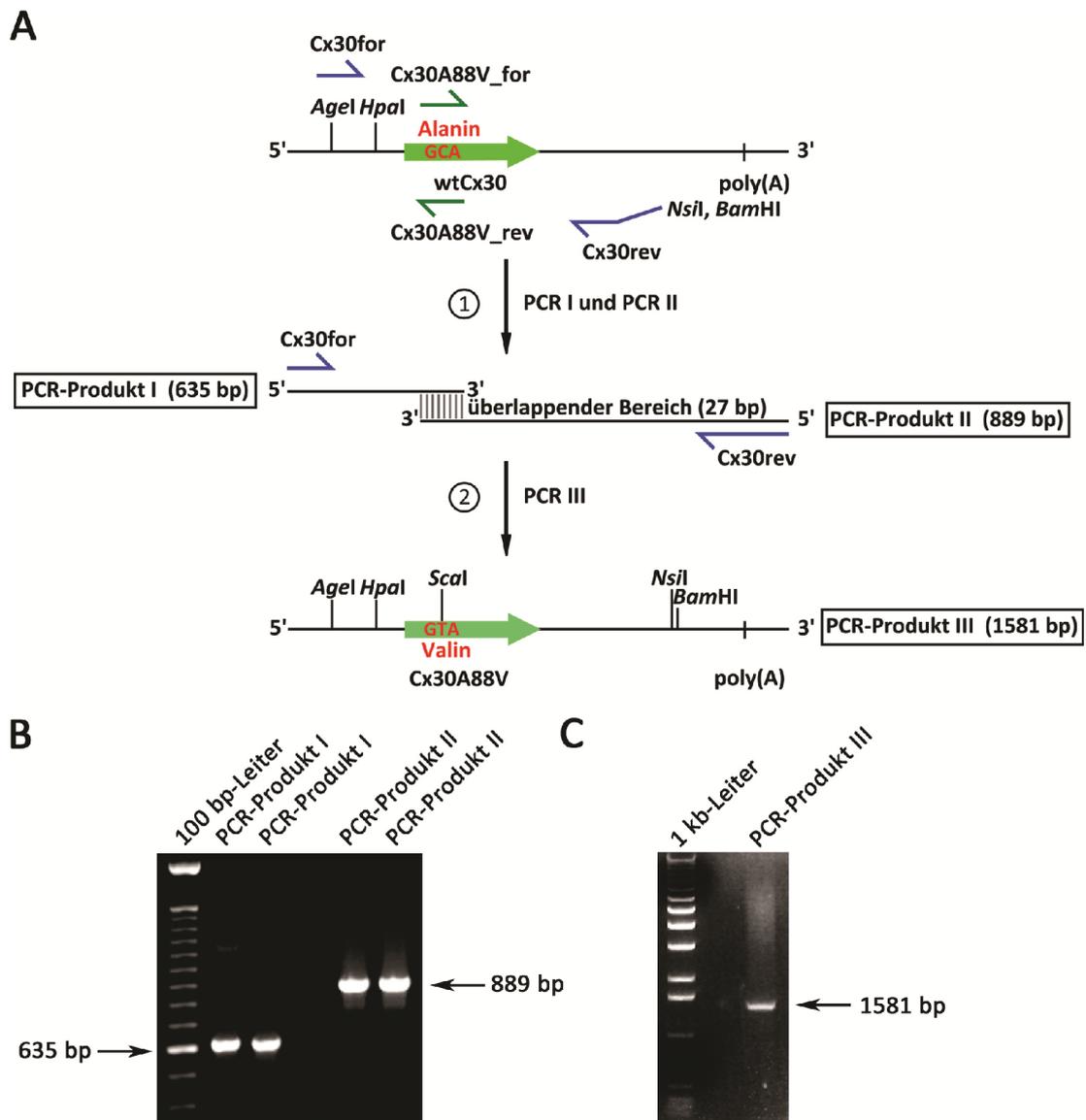


Abb. 4.19: Erzeugung der Punktmutation Cx30A88V.

(A) Schematische Darstellung der Mutagenese-PCR zur Erzeugung der Cx30A88V Mutation. Die Lage der verwendeten Startermoleküle ist in grün bzw. blau dargestellt. (B) Erzeugung der Cx30A88V Teilsequenzen durch Verwendung der dargestellten Startermoleküle. (C) Fusions-PCR, die zur Entstehung eines PCR-Produktes mit einer Länge von 1581 bp führt, das die mutierte mCx30 Sequenz enthält.

4.2.2.2 Klonierung des konditionalen Austauschvektors

Die Klonierungsstrategie (Abb. 4.20) zur Erzeugung des Austauschvektors „kondVektA88V“ umfasste fünf Teilschritte, bei denen auf vorhandene Plasmide zurückgegriffen werden konnte, die während der Klonierung des Austauschvektors „Cx30KiCx30T5M“ (M. Schütz

Diplomarbeit 2006) erzeugt wurden. Die Vektoren, die zur Klonierung des Austauschvektors verwendet oder erzeugt wurden, sind im Anhang dargestellt.

Schritt 1 („A88V_IRES_LacZ_3’HR“): Als Ausgangsvektor für den ersten Klonierungsschritt wurde der Vektor „T5M_IRES_LacZ_3’HR“ (M. Schütz Diplomarbeit 2006) verwendet, der die Kodierungsregion für die Mutation Cx30T5M, die IRES-LacZ Kasette und die 3’-Homologieregion enthält. Die Verwendung der Restriktionsenzyme *MunI* und *NsiI* erlaubte das Ersetzen des Cx30T5M Gens durch die für Cx30A88V kodierende Region.

Schritt 2 („5’HR_A88V_IRES_LacZ_3’HR“): Die Cx30A88V-IRES-LacZ Sequenz sowie die 3’-Homologieregion wurden mit den Restriktionsenzymen *MunI* und *NotI* aus dem Vektor „A88V_IRES_LacZ_3’HR“ ausgeschnitten und in den Vektor „10b1b/pBS SK+_mCx30Genlokus“ (D. Manthey, Diplomarbeit 1994) eingebracht, wodurch die 5’-Homologieregion dem Kostrukt vorangestellt wurde.

Schritt 3 („5’HR_A88V_IRES_LacZ_3’HR del *Sall*“): Das Einbringen der für Neomycin kodierenden Sequenz über die Restriktionsschnittstelle *Sall* erforderte die vorangehende Deletion dieser Schnittstelle. Hierzu wurde der Vektor „5’HR_A88V_IRES_LacZ_3’HR“ mit den Enzymen *XhoI* und *Sall* geschnitten und die Enden mit Hilfe der Klenow-Polymerase geglättet.

Schritt 4 („5’HR_loxP_wtCx30_A88V_IRES_LacZ_3’HR“): Aus dem Vektor „loxP_Cx30Wt_loxP“ (M. Schütz, Diplomarbeit 2006) wird mittels der Enzyme *XbaI* und *SpeI* die, von loxP-Elementen flankierte, wtCx30 kodierende Region ausgeschnitten und nach Glätten der Enden durch die Klenow-Polymerase in den durch *AgeI* linearisierten Vektor „5’HR_A88V_IRES_LacZ_3’HR del *Sall*“ kloniert.

Schritt 5 („Cx30KICx30A88V“): In diesem letzten Schritt wird das Neomycinresistenzgen über das Restriktionsenzym *Sall* in den Vektor „5’HR_loxP_wtCx30_A88V_IRES_LacZ_3’HR“ eingebracht.

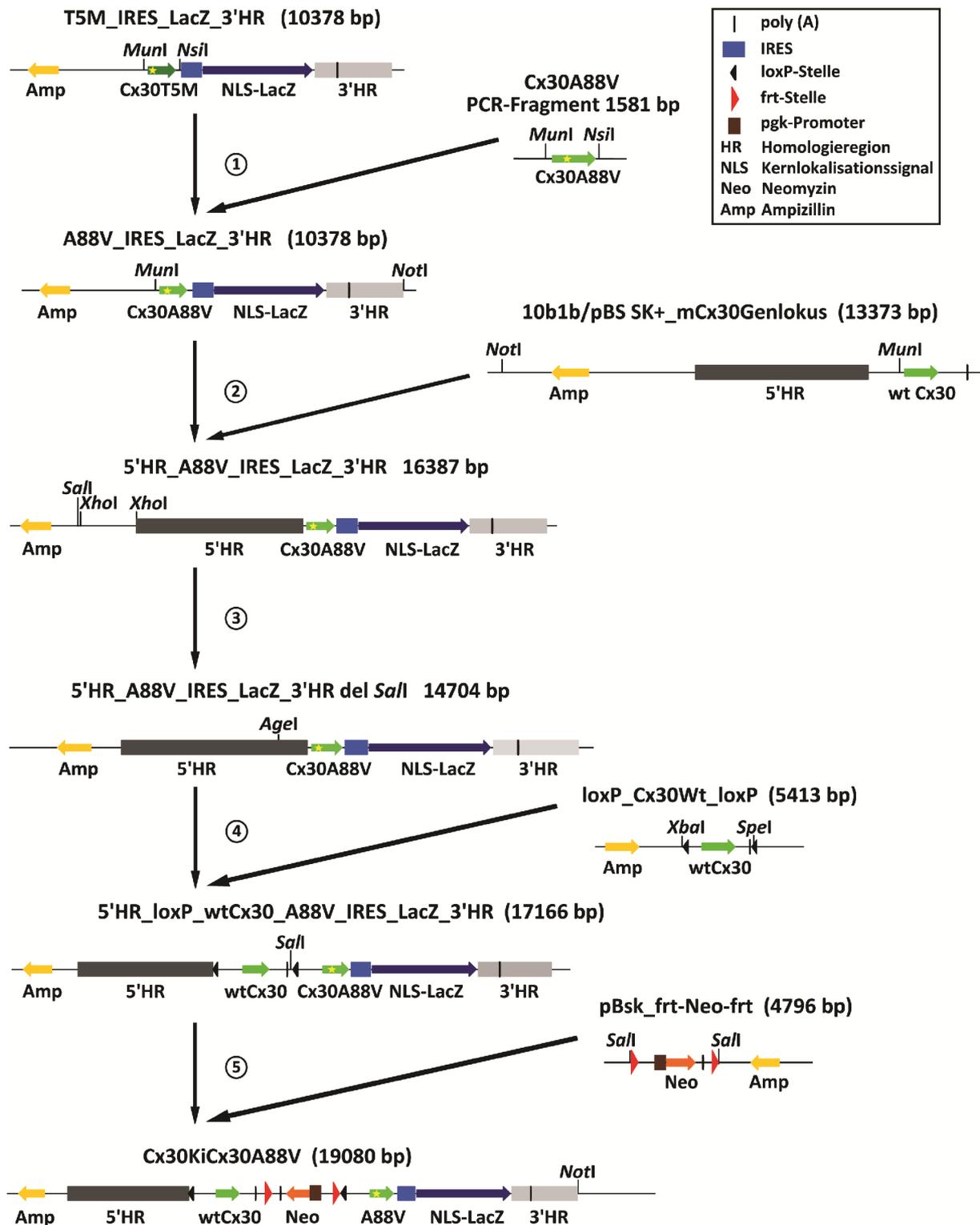


Abb. 4.10: Erzeugung des Austauschvektors „Cx30KiCx30A88V“.

Dargestellt ist die fünf Schritte umfassende Klonierungsstrategie zur Erzeugung des konditionalen Austauschvektors und die für den jeweiligen Schritt verwendeten Restriktionsenzyme.

Durch eine Restriktionsanalyse des fertigen Austauschvektors mit verschiedenen Restriktionsenzymen (Abb. 4.21) sowie einer nachfolgenden Sequenzierung (AGOWA, Berlin) konnte die Vollständigkeit und fehlerfreie Sequenz des Vektors nachgewiesen werden. Die

Funktionalität der *frt*- und *loxP*-Stellen wurde durch Transformation des Vektors in Flp- bzw. Cre-*E. coli* Bakterien (Buchholz et al., 1996) und anschließender Restriktionsspaltung und gelelektrophoretischer Auftrennung bestätigt (Daten nicht gezeigt).

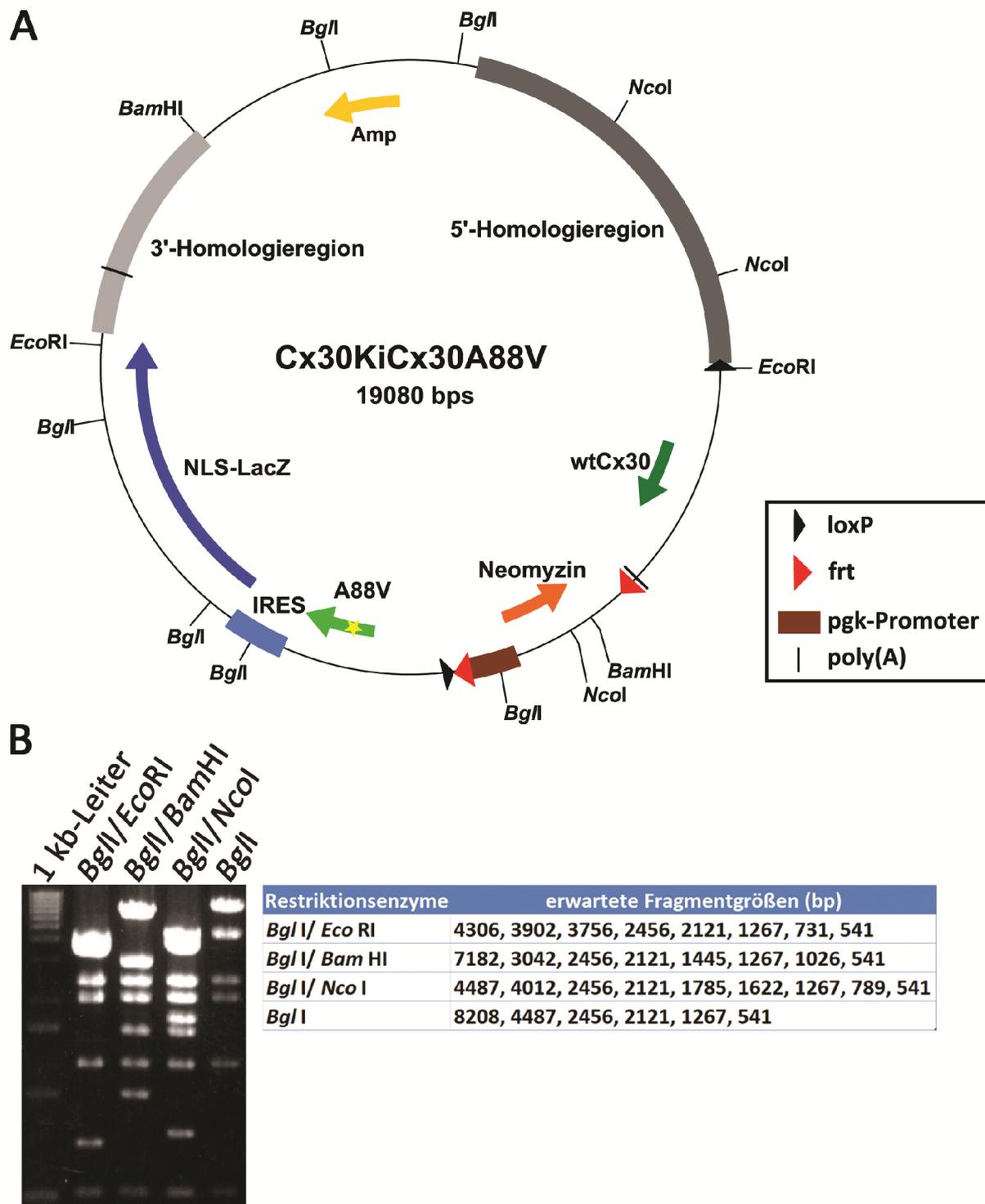


Abb. 4.21: Restriktionsanalyse des Austauschvektors „Cx30KICx30A88V“.

(A) Darstellung des Austauschvektors Cx30A88V mit den für die Überprüfung genutzten Restriktionsschnittstellen. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung des gespaltenen Vektors. Die Tabelle gibt Auskunft über die erwarteten Fragmentgrößen.

4.2.3 Erzeugung und Isolierung homolog rekombinierter muriner ES-Zellen

Analog zu der Erzeugung der Cx30T5M ES-Zellen wurde auch hier der Austauschvektor durch Elektroporation in Sv129P2/OlaHsd HM1 Zellen (Magin et al., 1992) eingebracht. Vor der Transfektion wurde die Vektor-DNS mit *NotI* linearisiert.

Ziel der Transfektion war die Rekombination zwischen der 5'- und 3'-Homologieregion des Austauschvektors und den Homologieregionen der genomischen ES-Zell-DNS und damit der Austausch der zwischen den Homologieregionen liegenden DNS-Sequenz (Abb. 4.22, durchgezogene Linien). Aufgrund des Vorhandenseins interner Homologien kann eine Rekombination auch mit diesen Regionen erfolgen (Abb. 4.22, gestrichelte Linien) und zu einer Falsch-Insertion des Austauschvektors führen. Um dies auszuschließen wurden alle isolierten ES-Zellklone, wie schon zuvor für die Cx30T5M-ES-Zellklone beschrieben, mittels PCR-Analysen und Southern Blot Hybridisierungen charakterisiert. Insgesamt wurden 587 stabil transfizierte ES-Zellklone isoliert und für weitere Analysen kultiviert.

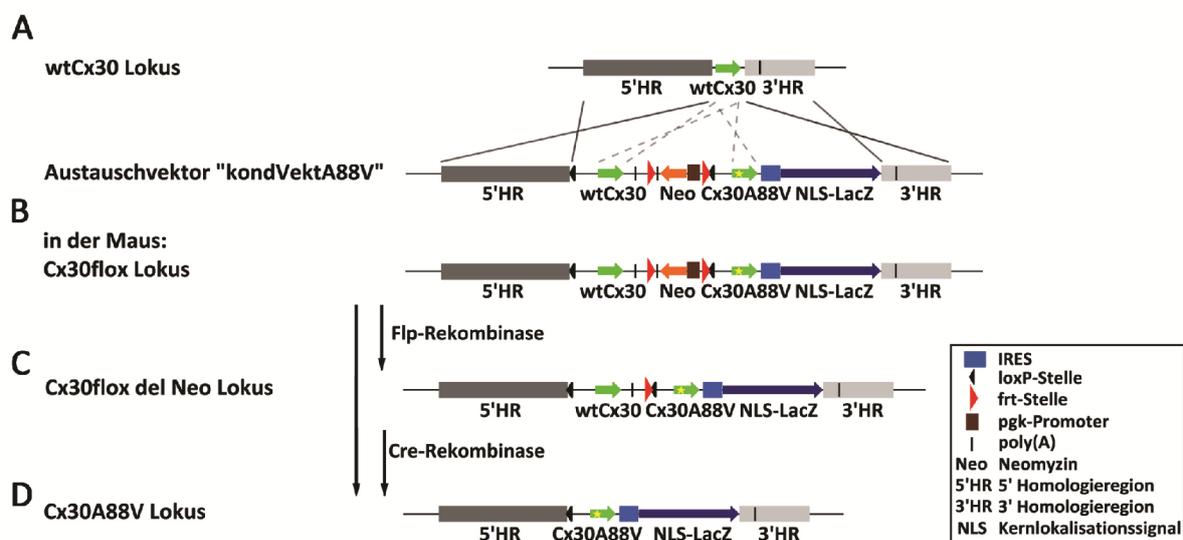


Abb. 4.22: Schematische Darstellung der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus zur Erzeugung einer Cx30A88V-Mauslinie.

(A) Die homologe Rekombination zwischen dem Austauschvektor und der ES-Zell-DNS ist durch gekreuzte Linien dargestellt. Die gestrichelten Linien zeigen eine mögliche Rekombination zwischen den internen Homologieregionen. (B) Nach der homologen Rekombination liegt in den embryonalen Stammzellen das Cx30floxed Allel vor. (C) Durch die Flp-Rekombinase kann in der Maus, die nicht mehr benötigte Neomycin-Resistenzkassette entfernt werden. (D) Nach Cre-vermittelter Deletion der wtCx30 kodierenden Region kommt es zur Expression des Cx30A88V Gens und des LacZ-Reportergens unter Kontrolle des endogenen Cx30-Promoters.

4.2.4 PCR-Analysen zur Charakterisierung der homolog rekombinierten Cx30A88V-ES-Zellklone

4.2.4.1 Etablierung der Test-PCRs

Zur Überprüfung der erfolgten Rekombination wurden die isolierten ES-Zellklone zunächst durch PCR-Analysen im 3'-Bereich („A88V_3'HR-PCR“) untersucht. Um die Zuverlässigkeit und Sensitivität der PCR-Reaktion auch bei geringer DNS-Konzentration und in Gegenwart des genomischen Hintergrundes zu gewährleisten, wurde die PCR mit Hilfe eines PCR-Testvektors etabliert. Die verwendeten Startermoleküle wurden so gewählt, dass das vorwärtsgerichtete Startermolekül im *LacZ*-Gen und das rückwärts-gerichtete Startermolekül in der genomischen Sequenz außerhalb der gewählten 3'-Homologieregion des Austauschvektors liegt. Das gewünschte Amplikon hat eine Größe von 2,3 kb. Durch die Wahl der Startermoleküle wurde sichergestellt, dass mit genomischer DNS aus ES-Zellen nur dann ein PCR-Produkt entsteht, wenn die homologe Rekombination mit dem Austauschvektor „Cx30KICx30A88V“ im 3' Bereich des Cx30 Gens stattgefunden hat. Um die PCR etablieren zu können, wurde ein PCR-Testvektor erzeugt (M. Schütz, Diplomarbeit 2006), der sowohl das *LacZ*-Gen als auch einen um 847 bp längeren 3'-Bereich als die tatsächliche verwendete 3'-Homologieregion des Austauschvektors enthält (Abb. 4.23 A). Somit konnte durch Zugabe von genomischer ES-Zell-DNS (DNS aufgereinigt aus HM1-ES-Zellen) eine vergleichbare Situation wie in den zu analysierenden ES-Zellen geschaffen werden (Abb. 4.23). Die Etablierung wurde, wie schon in Kapitel 4.1.2.1 der Cx30T5M-PCR beschrieben, unter Zugabe von HM1-DNS durchgeführt. Trotz des HM1-DNS-Hintergrundes kann bis zu einer Vektor-DNS-Menge von 10 fg in der A88V_3'HR-PCR ein Fragment der Größe 2,3 kb nachgewiesen werden. Die Hintergrundbanden sind der HM1-DNS zuzuschreiben (Abb. 4.23 C).

Die Effizienz und Zuverlässigkeit einer PCR-Reaktion über die 4,3 kb große 5' Homologieregion wäre aufgrund der Größe mittels einer durchschnittlich effizienten Taq-Polymerase nicht gewährleistet. Aus diesem Grund wurde keine PCR über die 5'-Homologieregion durchgeführt, sondern stattdessen eine zweite PCR etabliert, welche die erste loxP-Stelle („A88V_loxP-PCR“) nachweist. Hierzu wurden die Startermoleküle so gewählt, dass sie die erste loxP-Stelle (stromaufwärts der wtCx30 Sequenz) flankieren. So war es möglich ES-Zellklone auszuschließen, die durch eine interne Rekombination im Bereich der wtCx30- oder der Cx30A88V-Sequenz entstanden sind und denen dementsprechend die erste loxP-Stelle fehlt. Als Matrize für diese zweite PCR diente der Vektor „5'HR_loxP_wtCx30_A88V_IRES_LacZ_3'HR“ (Abb. 4.23 B), der während der Klonierung des Austauschvektors „Cx30KICx30A88V“ erzeugt wurde. Die Etablierung dieser

„A88V_loxP-PCR“ wurde analog zur Etablierung der „A88V_3'HR-PCR“ durchgeführt. Als Amplikon konnte bis zu einer Vektor-DNS-Konzentration von 1 fg ein Fragment von 761 bp nachgewiesen werden (Abb. 4.23 D).

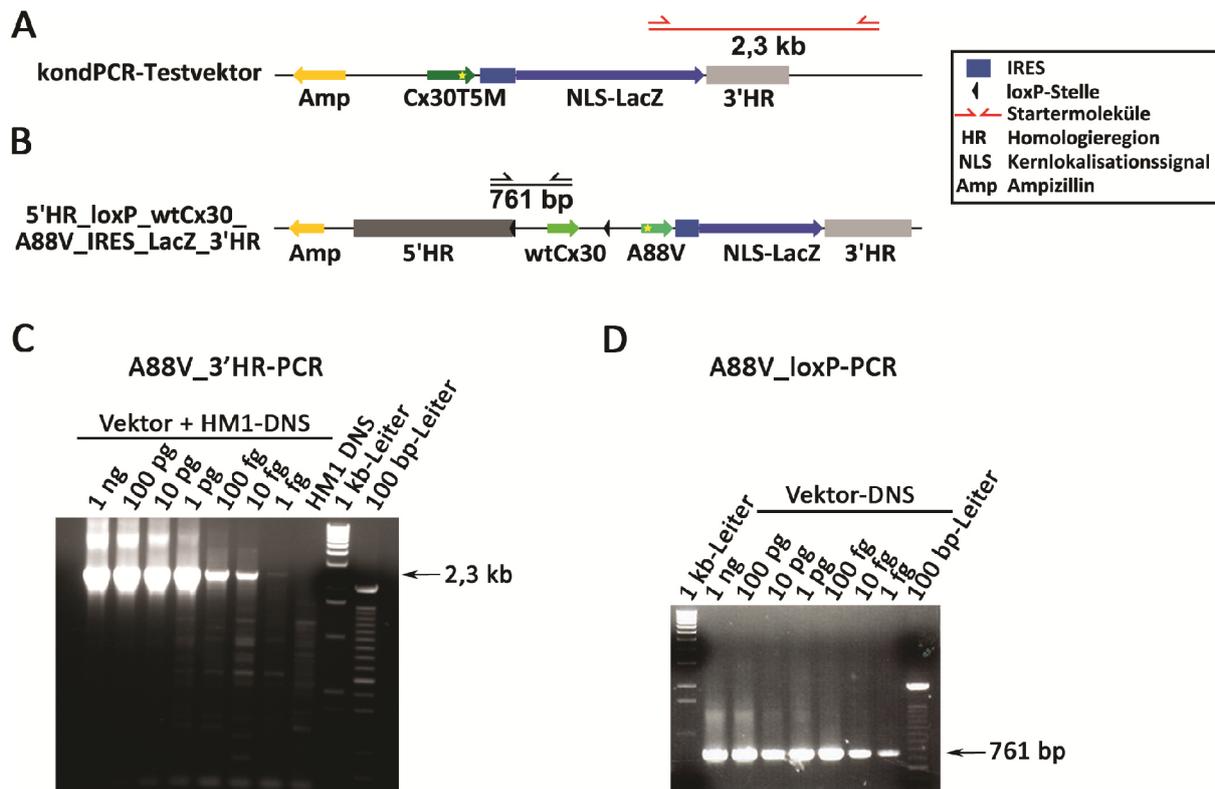


Abb. 4.23: Etablierung der PCRs zur Charakterisierung der homolog rekombinierten ES-Zellklone.

Schematische Darstellung der zur Etablierung der „A88V_3'HR-PCR“ (A) und „A88V_loxP-PCR“ (B) verwendeten Vektoren und der Lage der Startermoleküle. (C) Agarose-Gelelektrophorese der „A88V_3'HR-PCR“. Zur Kontrolle wurde eine PCR-Reaktion nur mit HM1-DNS durchgeführt. (D) Gelelektrophoretische Auftrennung der „A88V_loxP-PCR“.

4.2.4.2 PCR-Analyse der rekombinierten Cx30A88V-ES-Zellklone

Die 587 isolierten Cx30A88V-ES-Zellklone wurden zunächst auf eine im 3'-Bereich erfolgte Rekombination mittels der „A88V_3'HR-PCR“ überprüft. Bei einer Rekombination über die 3'-Homologieregion sollte ein 2,3 kb großes Fragment amplifiziert werden. In 37 der 587 überprüften Klone konnte die Amplifikation des 2,3 kb großen Fragments nachgewiesen werden (Abb. 4.24 B).

Weiterführend wurde die Rekombination dieser 37 Klone durch die „A88V_loxP-PCR“ analysiert, bei der die Startermoleküle zu beiden Seiten der ersten loxP-Stelle binden. Daraus ergibt sich ein Fragment von 761 bp für das rekombinierte Allel und ein 635 bp großes Fragment für das Wildtyp-Allel (Abb. 4.24 C). In dieser zweiten PCR wurden 25 von 37 ES-

Zellklone positiv getestet und für eine weitere Charakterisierung durch Southern Blot Hybridisierungen ausgewählt.

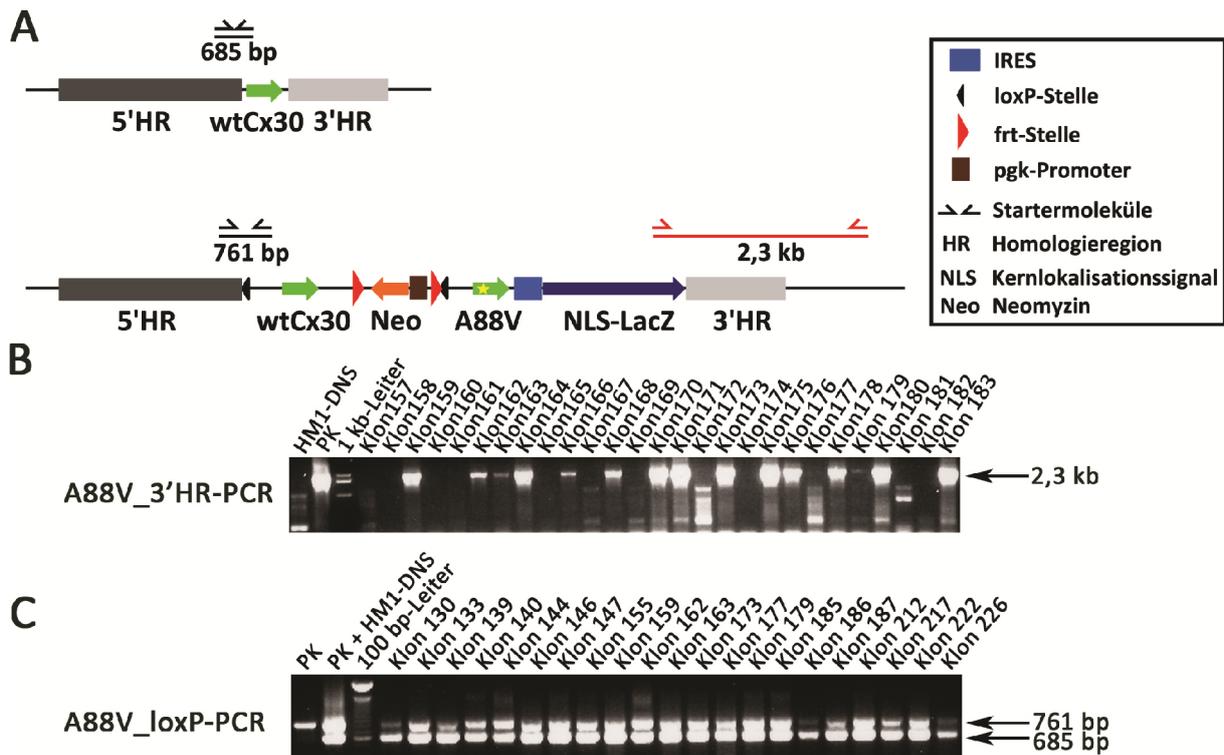


Abb. 4.24: PCR-Analyse der isolierten ES-Zellklone nach Einbringen des Austauschvektors kondVektorA88V.

(A) Schematische Darstellung der „A88V_3'HR-PCR“ (rot) und der „loxP-PCR“ (schwarz), Lage der Startermoleküle und der erwarteten Fragmentgrößen. (B) Agarose-Gelelektrophorese der „A88V_3'HR-PCR“. Nach der Rekombination mit dem Austauschvektor zeigten alle Klone, die im 3'Bereich richtig rekombiniert sind, eine Bande bei 2,3 kb. (C) Die zweite PCR („A88V_loxP-PCR“) führte bei positiven, heterozygoten Klone zu einer Amplifikation eines 761 bp (rekombiniertes Allel) und eines 685 bp (Wildtyp-Allel) großen Fragments.

4.2.5 Nachweis der homologen Rekombination durch Southern Blot Hybridisierungen

Southern Blot Hybridisierungen ermöglichen eine zuverlässige Aussage über die Integration und die Vollständigkeit der erfolgten homologen Rekombination. Die hierzu verwendeten Sonden und Restriktionsendonukleasen sind in Abbildung 4.25 schematisch dargestellt. Für die Überprüfung des 5'-Homologiebereichs wurde die isolierte genomische DNS mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI gespalten und nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (vgl. Kapitel 3.1.9). Die Verwendung einer 5'-externen Sonde, die zuvor schon für die Charakterisierung der Cx30T5M-ES-Zellklone eingesetzt wurde (vgl. Kap. 4.1.2.2), ermöglichte es, die Rekombination des 5'-Bereichs durch ein 10,8 kb großes Fragment für das rekombinante Allel zu bestätigen (Abb. 4.25 B). Das Wildtyp-Allel wurde durch ein 11,7 kb großes Fragment nachgewiesen.

Um die Rekombination auch im 3'-Bereich nachzuweisen, wurde die genomische DNS mit dem Restriktionsenzym *NcoI* gespalten. Durch eine im 3'-Bereich außerhalb der Homologieregion liegende Sonde (vgl. Kap. 4.1.2.2) wurden ein 10 kb (rekombiniertes Allel) und ein 5,7 kb (Wildtyp-Allel) großes Fragment markiert (Abb. 4.25 C). Die Spaltung der genomischen DNS durch *NcoI* erlaubte außerdem, durch Verwendung einer internen Sonde, Mehrfachintegrationen auszuschließen. Dazu wurde eine gegen das *LacZ*-Gen gerichtete Sonde (vgl. Kap. 4.1.2.2) gewählt, durch die ein 10 kb großes Fragment im rekombinanten Allel detektiert werden konnte (Abb. 4.25 D).

Aus den durchgeführten PCR- und Southern Blot Analysen wurde deutlich, dass nur ein ES-Zellklon (0,3%) (Klon 179, Abb. 4.25 rot hervorgehoben) die notwendigen Voraussetzungen für eine mögliche Injektion in Blastozysten erfüllte. Vor der Blastozysten-Injektion wurde eine Karyotypanalyse (vgl. Kap. 4.1.3) zur Bestimmung der Chromosomenanzahl durchgeführt.

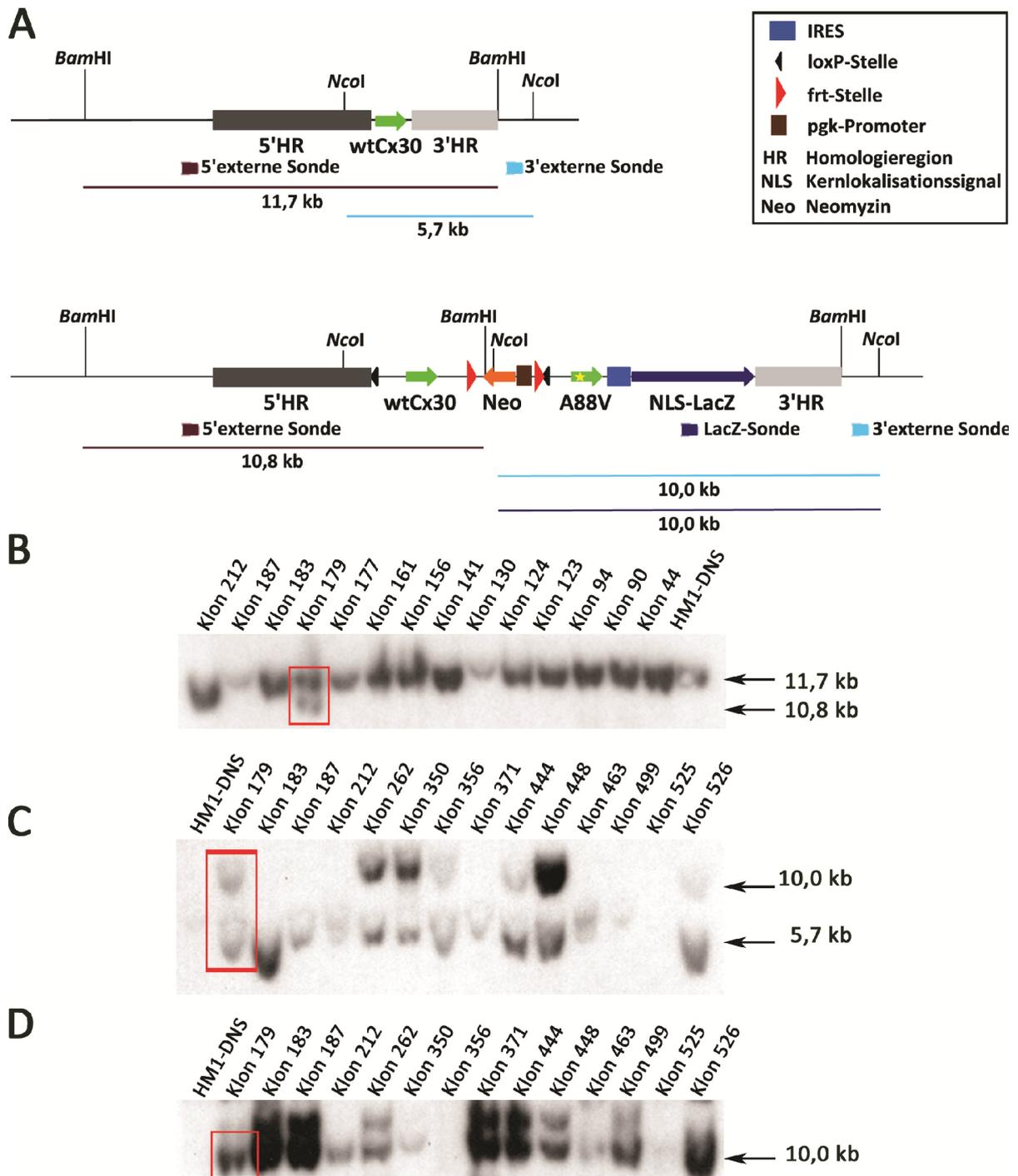


Abb. 4.25: Nachweis der homologen Rekombination durch Southern Blot Hybridisierung.

(A) Schematische Darstellung der Southern Blot Strategie. Eingezeichnet sind die verwendeten Schnittstellen, die Lage der Sonden und die Größe der entstehenden Fragmente. (B) Hybridisierung einer 5'-externen Sonde in mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI gespalteener DNS. (C) Southern Blot Hybridisierung mit einer 3'-externen Sonde nach Spaltung der DNS mit dem Enzym *Nco*I. (D) Untersuchung der ES-Zellklone hinsichtlich einer möglichen Mehrfachintegration durch Verwendung einer internen LacZ-Sonde. Die DNS wurde mit der Restriktionsendonuklease *Nco*I gespalten. Als Wildtyp-Kontrolle wurde HM1-DNS aufgetragen.

4.2.6 Erzeugung chimärer Mäuse durch Blastozysten-Injektion

In Abbildung 4.26 A ist der Chromosomensatz des Klons 179 gezeigt. Nach der Auszählung von 20 Zellen, wurde die durchschnittliche Anzahl von 40 Metaphase-Chromosomen bestätigt und der ES-Zellklon zur Blastozysten-Injektion eingesetzt.

Die Injektion des rekombinierten Cx30A88V-ES-Zellklons 179 in Blastozysten des Mausstamms C57BL/6 wurde von Christine Siegmund durchgeführt. Aus den injizierten Blastozysten entstanden insgesamt sechs chimäre Mäuse mit einem Chimärismusgrad zwischen 50-100% (Abb. 4.26 B). Zur Erzeugung der Cx30^{+ / floxA88V}-Mäuse wurden die Chimären mit C57BL/6-Mäusen verpaart. Ein agouti-farbenes Fell der Nachkommen verweist auf die Keimbahngängigkeit der Chimären. Insgesamt zwei der Chimären-Verpaarungen erzeugten agouti-farbenen Nachwuchs. Zur Genotypisierung der Nachkommen mittels PCR-Analysen wurde genomische DNS aus Schwanzspitzenbiopsien isoliert (Abb. 4.26 C und D). Bei der verwendeten PCR handelt es sich um eine PCR mit drei Startermolekülen. Dabei binden zwei der Startermoleküle im 3'-Bereich des *Gjb6* Gens, wohingegen das dritte Startermolekül im *LacZ*-Gen bindet. So wird für das Wildtyp-Allel ein 856 bp und für das rekombinierte Allel ein 761 bp großes Fragment amplifiziert. Obwohl alle drei Startermoleküle im rekombinierten Allel binden können, entsteht kein weiteres Fragment, da dieses für eine durchschnittlich effiziente *Taq*-Polymerase zu groß ist. Die Genotypisierung von 30 agouti-farbenen Nachkommen erbrachte kein Tier mit dem rekombinierten Allel. Nachdem die PCR als Fehlerquelle ausgeschlossen werden konnte (PCR amplifizierte zuverlässig das rekombinierte Allel, wenn als Matrize der Austauschvektor eingesetzt wurde), wurde die Charakterisierung des ES-Zellklons mittels Southern Blot Hybridisierungen erneut ausgewertet. Diese erneute Auswertung wies daraufhin, dass es sich bei dem für die Blastozysten-Injektion eingesetzten Klon womöglich um einen Mischklon handelt. Ein Indiz dafür zeigte die Hybridisierung der 5'-externen Sonde. Die Bande des Wildtyp-Allels war stärker als die des rekombinierten Allels. Aus diesem Grund wurde der ES-Zellklon 179 für eine Subklonierung eingesetzt. Die Subklonierung des ES-Zellklons zur Isolierung eines transgenen heterozygoten ES-Zellklons mit einem gleichen Verhältnis von Wildtyp-Allel und rekombinierten Allel führte nicht zu dem gewünschten Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Aus dieser Subklonierung gingen nur sehr wenige Klone hervor, die zum Teil ein sehr verlangsamtes Wachstum zeigten. Nachdem die Klone in ersten PCR- und Southern Blot Analysen kein eindeutiges Ergebnis aufwiesen und die Passagenzahl der in Kultur gehaltenen Klone stetig zunahm, wurde der Versuch einer Subklonierung beendet. Eine erneute Transfektion im Rahmen dieser Arbeit war aus zeitlichen Gründen nicht möglich und wurde von Felicitas Bosen in ihrer Diplomarbeit (2010) erfolgreich mit demselben Vektor unter den gleichen Bedingungen wiederholt.

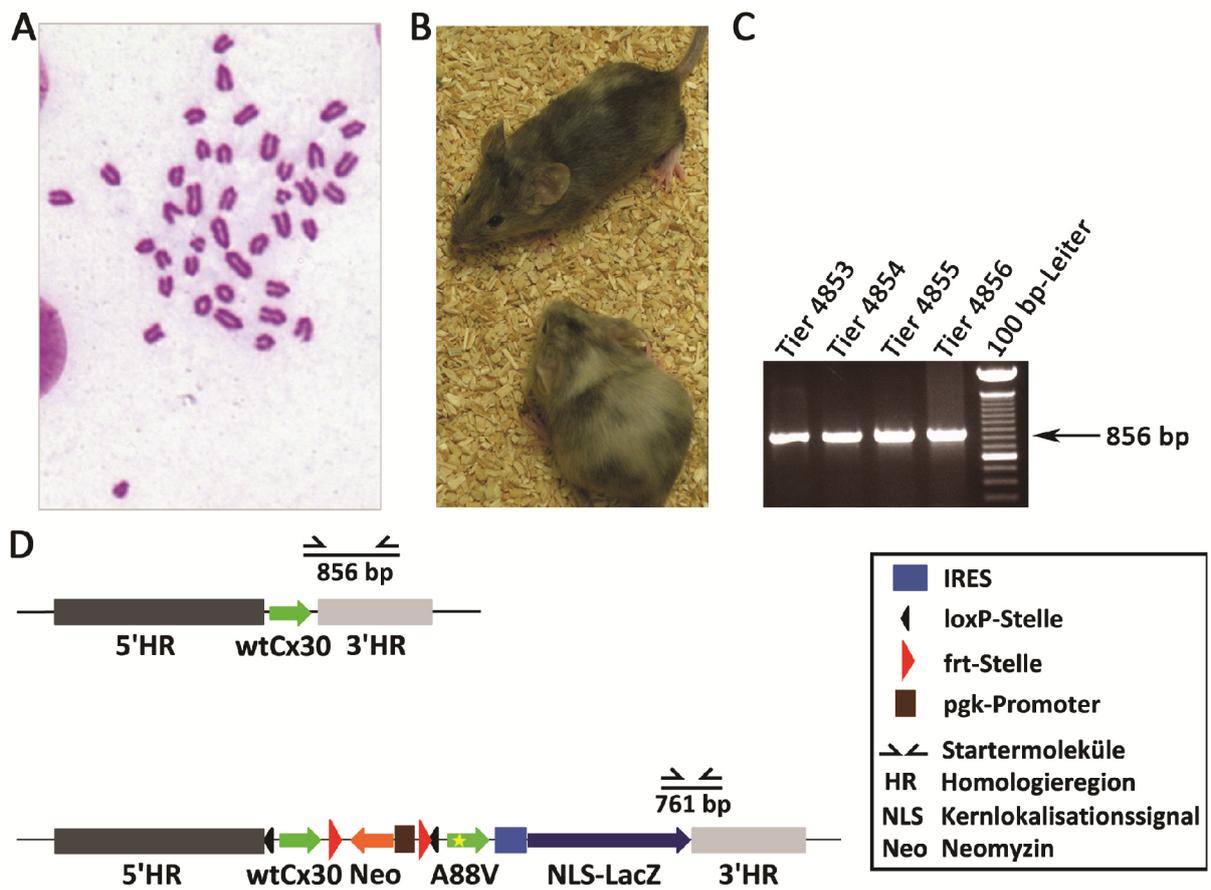


Abb. 4.26: Erzeugung der Cx30A88V-Mauslinie.

(A) Nach einer Giemsa-Färbung sind die 40 Chromosomen des Cx30A88V-ES-Zellklons 179 zu erkennen. (B) Exemplarische Darstellung zweier Chimären aus der Blastozysten-Injektion von Klon 179. (C) Genotypisierung der ersten agouti-farbenen transgenen Nachkommen durch PCR-Analyse. (D) Schematische Darstellung der Genotypisierungs-PCR. Eingezeichnet sind die Lage der eingesetzten Startermoleküle sowie die Größe der amplifizierten PCR-Produkte.

4.3 Charakterisierung der Cx26S17F-Mauslinie

Die Cx26S17F Mutation führt im Menschen zum Keratitis-Ichthyosis-Taubheitssyndrom (KID), welches durch verdickte (Akanthose), stark verhornte Haut (Hyperkeratose), Entzündungen und Gefäßbildungen in der Hornhaut des Auges sowie einem sensorisch-neuralen Hörverlust charakterisiert ist (Richard, 2005). Um die Ursachen dieser Erkrankung untersuchen zu können, wurde eine Cx26S17F-Mauslinie erzeugt (Dr. T. Auth; I. Körber, Diplomarbeit 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Haut- und Gehörphänotyp der Cx26S17F-Mauslinie in zwei verschiedenen Mausstammhintergründen analysiert.

4.3.1 Die Cx26S17F-Mauslinie

Die Cx26S17F-Mauslinie wurde durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen erzeugt (Abb. 4.27). Aufgrund eines Plazentadefekts versterben Cx26 defiziente Mäuse an Tag E10.5 der embryonalen Entwicklung (Gabriel et al., 1998; Kibschull et al., 2008). Um eine mögliche embryonale Letalität zu vermeiden, wurde bei der Erzeugung der Cx26S17F-Mäuse ein konditionaler Ansatz gewählt. Das wtCx26 Gen ist dabei von loxP-Stellen flankiert. Innerhalb dieser loxP-Stellen wurde direkt hinter das Cx26 poly(A) eine mit frt-Stellen flankierte Neomycin-Resistenzkassette eingefügt, die zur Selektion in ES-Zellen verwendet werden kann (Abb. 4.27 B). Nach Cre-vermittelter Deletion der zwischen den loxP-Stellen liegenden Sequenzen wird die Mutation Cx26S17F unter der Kontrolle des endogenen wtCx26-Promoters exprimiert (Abb. 4.27 D). Das Einbringen eines eGFP Reporterproteins sollte eine Expressionsanalyse der Cx26S17F Mutation in der Maus ermöglichen. Die Bildung eines Fusionsproteins „Cx26S17F-eGFP“ wurde durch das Einbringen einer IRES-Kassette umgangen, wodurch eine bicistronische mRNA gebildet wird, die zur voneinander getrennten Translation der Proteine Cx26S17F und eGFP führt.

Cx26^{+/*floxS17F*}-Mäuse wurden mit Mäusen verpaart, welche die Cre-Rekombinase unter dem pgk-Cre Promotor exprimieren, um eine ubiquitäre Expression von Cx26S17F zu erreichen. Die daraus resultierenden Cx26^{+/*S17F*}-Mäuse wurden durch PCR-Analysen (Abb. 4.27 E) und Southern Blot Hybridisierungen charakterisiert (Abb. 4.27 F).

Für die PCR-Analyse wurden Startermoleküle verwendet, welche die loxP-Stelle stromabwärts der 5'-Homologieregion flankieren (4.27 E). Durch die Wahl dieser Startermoleküle können die Allele „+“ (250 bp), „flox“ (360 bp) und „S17F“ (380 bp) unterschieden werden. Die Allele „flox“ und „floxΔNeo“ müssen in einer zweiten PCR („Neo-PCR“) überprüft werden (Daten nicht gezeigt, vgl. I. Körber, Diplomarbeit 2006).

Die verschiedenen Genotypen der Cx26S17F-Mauslinie wurden durch Southern Blot Hybridisierungen bestätigt (Abb. 4.27 F). Die aus der Leber von Cx26^{+/+}-, Cx26^{+/^{flox}-}-, Cx26^{flox/flox}-, Cx26^{+/^{flox}ΔNeo}- und Cx26^{+/^{S17F}}-Mäusen isolierte genomische DNS wurde durch das Restriktionsenzym *EcoRI* gespalten. Für die Southern Blot Hybridisierungen wurde eine 3'-externe Sonde gewählt, die unmittelbar stromabwärts der Homologieregion bindet, und eine interne Neomycin-Sonde (Abb. 4.27 F).

Die Expression des Reporterproteins eGFP war zu schwach, um für die Untersuchung der zellulären Lokalisation der Cx26S17F Mutation in der Cochlea und der Haut verwendet werden zu können. Auch der Nachweis über eGFP-spezifische Antikörper war nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Um die Bildung der eGFP-mRNA zu überprüfen, wurde deshalb eine reverse Transkriptase (RT)-PCR Analyse durchgeführt. Die Amplifikation der Cx26^{+/^{S17F}} cDNA mit spezifischen eGFP-Startermolekülen resultierte in der Amplifikation eines 402 bp Fragments (Abb. 4.27 G). In der RT-PCR der Cx26^{+/+} cDNA wurde kein Amplikon nachgewiesen. Eine Aktin-RT-PCR wurde durchgeführt, um eine Kontamination mit genomischer DNS auszuschließen. Bei einer Kontamination durch genomische DNS entsteht, anstelle des erwarteten 243 bp Fragments, aufgrund einer Intronsequenz ein um 87 bp längeres Fragment (330 bp).

Aus der Verpaarung von Cx26^{+/^{flox}S17F}-Mäusen mit pgk-Cre-Mäusen wurden weniger Tiere (5-10%) geboren als statistisch zu erwarten gewesen wäre (25%). Einige dieser Tiere verstarben innerhalb der ersten Tage nach der Geburt. Die überlebenden Tiere wurden für eine tiefergehende Charakterisierung des Haut- und Gehörphänotyps genutzt. Auch aus Verpaarungen heterozygoter Cx26S17F-Mäuse (Cx26^{+/^{S17F}}, Männchen) mit Mäusen (Weibchen) gingen weit weniger Tiere hervor (10%) als nach der Mendelschen Verteilung (50%) zu erwarten gewesen wäre (Abb. 4.27 H). Anders als bei den oben genannten Verpaarungen zwischen Cx26^{+/^{flox}S17F}- und pgk-Cre-Mäusen überlebte keines der Nachkommen die ersten 3 Tage nach der Geburt. Verpaarungen von Cx26^{+/^{S17F}}-Weibchen mit C57BL/6 Wildtyp-Männchen führten weder zu Nachkommen noch einer sichtbaren Schwangerschaft der Weibchen. Ebenso erzeugten Verpaarungen heterozygoter Mäuse untereinander keine Nachkommen. Diese hohe Sterberate der Cx26^{+/^{S17F}}-Mäuse senkte die notwendige Anzahl der Versuchstiere. Um die Anzahl zur Verfügung stehender Versuchstiere zu erhöhen, wurde für die Rückkreuzung nicht nur der C57BL/6-Mausstamm, sondern auch der 129Sv-Stamm verwendet. Wobei auch bei der Verwendung des 129Sv-Mausstamms weniger Tiere (30%) geboren wurden als nach Mendelscher Verteilung (50%) erwartet. Die nachfolgenden Untersuchungen entstanden mit Cx26^{+/^{S17F}}-Tieren, die entweder auf mindestens 87,5% C57BL/6 oder mindestens 75% 129Sv zurückgekreuzt wurden.

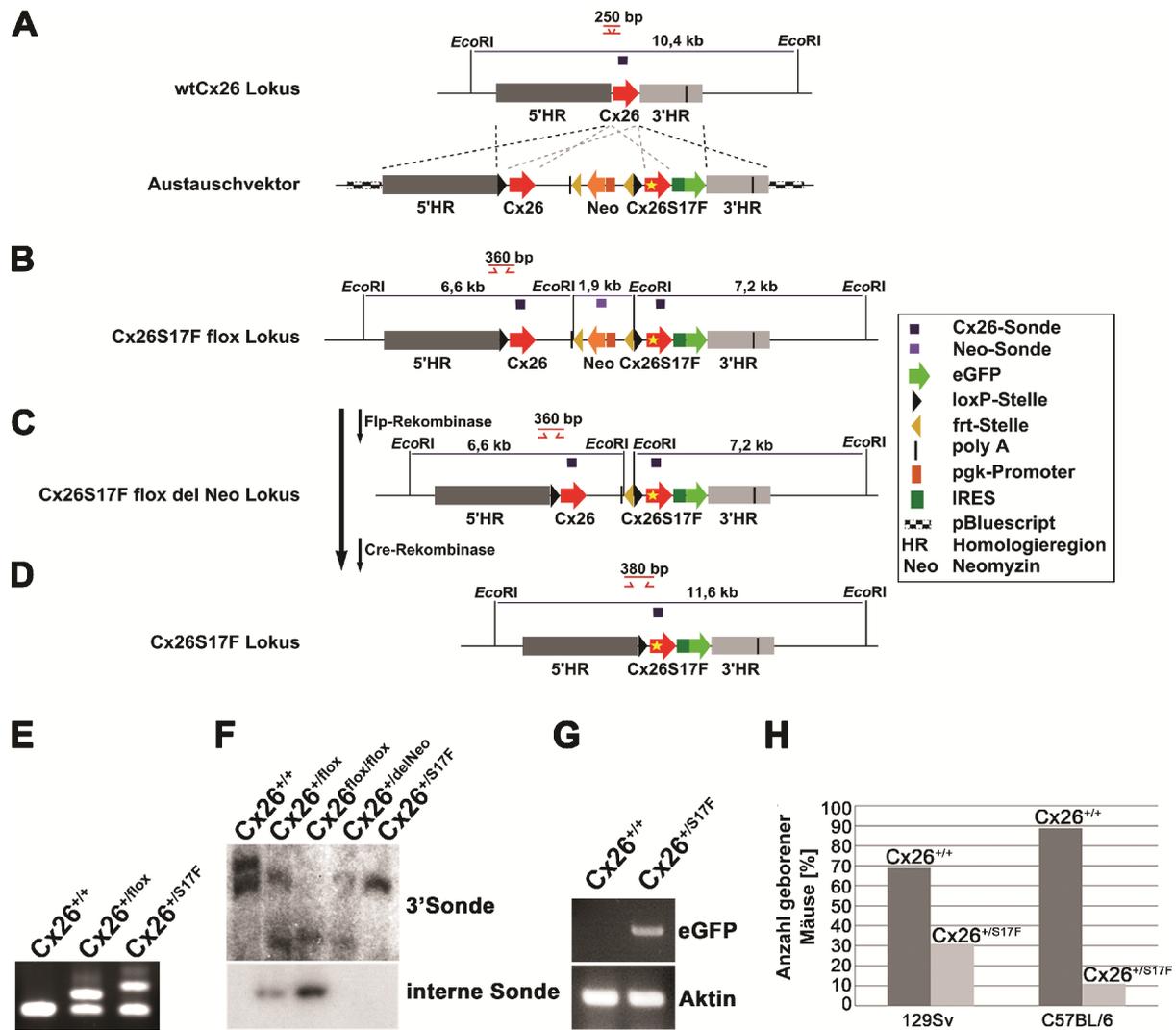


Abb. 4.27: Charakterisierung konditionaler Cx26S17F Mäuse.

(A) Schematische Darstellung der homologen Rekombination des Cx26S17F Austauschvektors in den Cx26 Genlocus. (B) Der mCx26S17F flox Lokus. (C) Deletion des Neomycin Resistenzgens durch Aktivität der Flp-Rekombinase. (D) Cre-vermittelte Deletion der Cx26 kodierenden Region führt zur Expression der Cx26S17F Mutation. (E) Genotypisierung der Cx26S17F-Mäuse durch PCR mit den unter A-D dargestellten Startermolekülen. (F) Southern Blot Hybridisierung mit einer 3'-externen Sonde und einer internen Neomycin-Sonde zum Nachweis der erfolgten Deletion des Resistenzgens. (G) In der RT-PCR der Cx26^{+/S17F} cDNS wird unter Verwendung eGFP-spezifischer Startermoleküle ein 402 bp Fragment amplifiziert. Eine Kontamination durch genomische DNS konnte mittels einer Aktin-PCR ausgeschlossen werden. (H) Wurfstatistik: Verpaarung von Cx26^{+/+} mit Cx26S17F^{+/S17F}-Mäusen. Cx26^{+/S17F}-Mäuse mit verschiedenen Mausstammhintergründen werden nicht in der erwarteten Mendelschen Verteilung von 50% geboren.

4.3.2 Phänotypische Ausprägung der Mutation Cx26S17F in transgenen Mäusen

Cx26^{+/S17F}-Mäuse (C57BL/6) zeigen starke sichtbare phänotypische Anomalien, die den Krankheitssymptomen der betroffenen KID Patienten ähneln (Abb. 4.28). Die Unterschiede zwischen heterozygoten Cx26^{+/S17F}-Mäusen und ihren Cx26^{+/+}-Geschwistertieren sind schon

unmittelbar nach der Geburt deutlich zu erkennen. Sie sind kleiner als ihre Geschwistertiere (Abb. 4.28 A), haben eine glänzende, schuppige Haut und einen verkürzten, verwundeten Schwanz (Abb. 4.28 B). Auch die Entwicklung der Pfoten ist weniger vorangeschritten als für das Alter üblich, einzelne Zehen sind nur schwer voneinander zu unterscheiden.

Adulte $Cx26^{+/S17F}$ -Mäuse leiden an Hyperkeratose der Pfoteninnenseite (Abb. 4.28 C), spärlichem Haarwuchs und annulären Einschnürungen des Schwanzes (Abb. 4.28 D). Der Größenunterschied kann sich je nach Schwere des Phänotyps im Alter reduzieren. Häufig bleiben die $Cx26^{+/S17F}$ -Tiere jedoch auch im Alter kleiner als ihre gleichaltrigen Wildtyp-Geschwister. Cornea-Defekte wurden nicht beobachtet (F. Bosen, Diplomarbeit 2010).

Der Querschnitt einer Hinterpfote einer adulten $Cx26^{+/S17F}$ Maus, angefärbt mit Hämalaun/Eosin, verdeutlicht die Verdickung der Epidermis (Akanthose) vor allem unterhalb des Nagels, der selbst deformiert erscheint (Abb. 4.29 F). Die Verdickung der Epidermis wird von einer Verdickung des Stratum corneums (Hyperkeratose) begleitet.

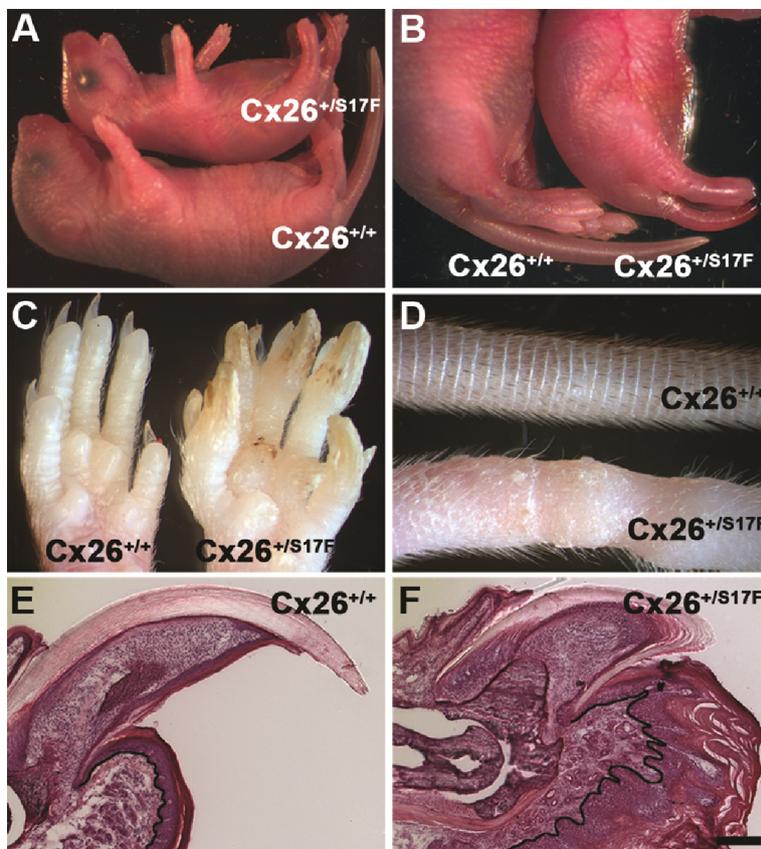


Abb. 4.28: Makroskopische Auffälligkeiten neugeborener und adulter $Cx26^{+/S17F}$ -Mäuse.

(A) $Cx26^{+/S17F}$ -Mäuse an Tag P4 sind deutlich kleiner als ihre Geschwistertiere. (B) Vergrößerung der Hinterpfoten und des verletzten Schwanzes. (C) Gezeigt ist die stark verhornte Innenfläche einer Hinterpfote eines $Cx26^{+/S17F}$ -Tiers im Vergleich zu der eines $Cx26^{+/+}$ -Tieres. (D) Spärlicher Haarwuchs und annuläre Einschnürungen des Schwanzes einer adulten $Cx26^{+/S17F}$ -Maus. HE-Färbung eines Pfoten-Querschnitts eines $Cx26^{+/+}$ - (E) und eines $Cx26^{+/S17F}$ -Tieres (F). Die schwarze Linie beschreibt die Grenze zwischen der Epidermis und der Dermis. Maßstab: 100 μ m.

4.3.3 Charakterisierung des Hautphänotyps

In $Cx26^{+/S17F}$ -Mäusen mit 129Sv Hintergrund ist der Phänotyp, der Merkmale wie Haut oder Größe betrifft, nicht so stark ausgeprägt wie in gleichaltrigen $Cx26^{+/S17F}$ -Mäusen mit C57BL/6

Hintergrund. In der folgenden, näheren Betrachtung des Hautphänotyps werden, sofern nicht anders erwähnt, Bilder der Cx26^{S17F}-Mauslinie mit C57BL/6 Hintergrund gezeigt.

4.3.3.1 Analyse der Wasserpermeabilitätsbarriere in neugeborenen Cx26^{+/S17F}-Mäusen

Die Sterberate und die variable Ausprägung des Hautphänotyps der Cx26^{+/S17F}-Mäuse ist nicht allein auf die Unterschiede in den verwendeten Mausstämmen C57BL/6 und 129Sv begründet, sondern findet sich auch innerhalb eines Mausstammes wieder. So zeigen nicht alle Cx26^{+/S17F}-Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund die gleiche Schwere des Phänotyps. Aus der geringen Anzahl der Nachkommen (10%, vgl. 1.3.2) mit dem Genotyp Cx26^{+/S17F} überleben nur wenige (30-40%) die ersten entscheidenden Tage nach der Geburt. Sobald die ersten Anzeichen der Fellbildung (P6-P7) zu beobachten sind, sinkt die Sterberate deutlich. Zusammengekommen mit der schuppigen und glänzenden Haut neugeborener Cx26^{+/S17F}-Mäuse ist dies ein Hinweis auf eine möglicherweise gestörte epidermale Barriere, die zu einem erhöhten Feuchtigkeitsverlust und damit zu einer Austrocknung dieser Mäuse führen könnte. Um die Funktionalität der epidermalen Barriere zu überprüfen, wurden Cx26^{+/+}- und Cx26^{+/S17F}-Mäuse (P1) einer Farbstoff-Penetrationsanalyse unterzogen (Abb. 4.29). Dazu wurde der Farbstoff Toluidinblau genutzt. Während dieser nicht durch die funktionale epidermale Barriere der Cx26^{+/+}-Mäuse durchdrang, konnte in Cx26^{+/S17F}-Tieren eine blaue Färbung beobachtet werden (Abb. 4.29 B-C). Die Penetration des Farbstoffs Toluidinblau zeigte sich vor allem an der Bauchunterseite und im Bereich der Vorder- und Hinterpfoten.

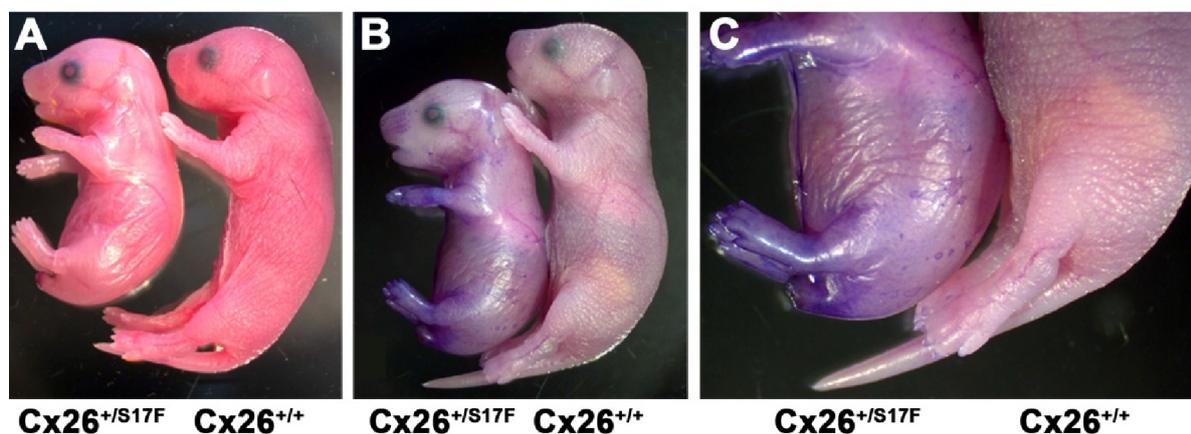


Abb. 4.29: Überprüfung der Wasserpermeabilitätsbarriere mittels Toluidinblaupenetration.

(A) Cx26^{+/S17F}- und Cx26^{+/+}-Mäuse (P1, C57BL/6) vor der Farbstoff-Penetrationsanalyse. (B) Toluidinblaufärbung neugeborener Cx26^{+/S17F}- und Cx26^{+/+}-Mäuse. (C) Vergrößerung der Hinterpfoten und Schwanzregion nach Toluidinblaupenetration.

4.3.3.2 Immunfluoreszenzanalysen der Haut

4.3.3.2.1 Expression verschiedener Markerproteine in der Haut von Cx26^{+ / S17F}-Mäusen

Die Epidermis der Haut ist in mehrere Schichten unterteilt, die unterste Schicht bildet das Stratum basale (Basalzellschicht), darüber liegen das Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und das Stratum granulosum (Körnerzellschicht). Den Abschluss bildet das Stratum corneum, die Hornzellschicht. Jede dieser Zellschichten ist gekennzeichnet durch die spezifische Expression verschiedener Proteine (vgl. Kap. 1.3.1 und Kap. 1.3.3). Die Epidermis adulter Cx26^{+ / S17F}-Mäuse ist vor allem im Bereich der Pfoten und des Schwanzes stark verdickt. Um zu untersuchen, ob sich diese Verdickung auf alle epidermalen Schichten bezieht oder nur eine einzelne Zellschicht verdickt ist, wurden Immunfluoreszenzanalysen gegen verschiedene spezifisch exprimierte Proteine durchgeführt (Abb. 4.30).

Immunfluoreszenzanalysen gegen die Keratine K1 und K14 erlauben eine Unterscheidung zwischen den suprabasalen (Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum) und basalen Zellschichten (Stratum basale). Keratin1 (K1) wird überwiegend in den suprabasalen Schichten exprimiert und dient in den vorliegenden Untersuchungen als Marker für diese Hautschichten. Die basalen Keratinozyten exprimieren hingegen Keratin14 (K14). Die Expression dieser Keratine in Gefrierschnitten der Schwanzhaut von Cx26^{+ / S17F}-Mäusen zeigt, dass hauptsächlich die suprabasale Epidermis verdickt ist, während sich die Basalzellschicht dieser Tiere in ihrer Dicke kaum von der der Wildtyp-Mäuse unterscheidet (Abb. 4.30 A-F).

Durch die Untersuchung der Connexin Expression in der Haut wurde die verdickte suprabasale Schicht eingehender bestimmt (Abb. 4.30 C-H). Die Connexine Cx26 und Cx30 werden in der gesunden Maushaut schwach im Stratum granulosum exprimiert und während der Wundheilung in allen Schichten stark hochreguliert. Cx43 wird im Stratum basale und im Stratum spinosum exprimiert (Kretz et al., 2003). Cx30 und Cx43 wurden in Immunfluoreszenzanalysen zusammen mit dem Basalzellschicht-Marker K14 angefärbt. Aus den Abbildungen 4.30 C und D geht hervor, dass Cx30 (grün) im Stratum granulosum exprimiert wird. Doch anders als in der Haut von Cx26^{+ / +}-Tieren, in der nur ein schmales Band punktierter Signale (grün) im Stratum granulosum beobachtet werden konnte, zeigt das Stratum granulosum der Cx26^{+ / S17F}-Mäuse eine starke Cx30 Expression und eine Verdickung dieser epidermalen Schicht. Auch die Zellen erscheinen vergrößert. Die Expression von Cx43 konnte in beiden untersuchten Genotypen im Stratum spinosum und Stratum basale nachgewiesen werden (Abb. 4.30 E, F). Das Stratum spinosum der Cx26^{+ / S17F}-Mäuse ist stark verdickt, während das Stratum basale in diesen Tieren nur eine gerinfügige

Verdickung aufweist. Die gelben Signale deuten auf eine Kolo-kalisation von K14 (rot) und Cx43 (grün) in der Basalzellschicht hin.

Loricrin gehört zu den Proteinen der Zellplasma-umhüllenden Schicht während der Hautverhornung (cornified cell envelope) und wird häufig als später Differenzierungsmarker eingesetzt (vgl. Kap. 1.3.1). Eine Immunreaktivität gegen Loricrin konnte in den Cx26^{+/-}-Mäusen im Stratum granulosum nachgewiesen werden (Abb. 4.30 G). Die Expression von Cx26 wurde in diesen Tieren nicht gefunden, wohingegen Cx26^{+S17F}-Mäuse eine vergleichsweise starke Expression von Cx26 (Abb. 4.30 H, grün) zeigen. Diese überlappt im Stratum granulosum mit der Expression von Loricrin (gelb), beschränkt sich aber nicht allein auf das Stratum granulosum, sondern zieht sich bis ins Stratum spinosum. Während der Migration von der Basalzellschicht zur Hornzellschicht durchlaufen die Keratinozyten einen Differenzierungsprozess, bei dem sie ihre ursprünglich runde Form verlieren und immer stärker abflachen. In den Cx26^{+S17F}-Tieren wirken die Loricrin-exprimierenden Zellen des Stratum granulosum jedoch relativ groß und rund. Dies könnte auf einen gestörten Differenzierungsprozess hindeuten.

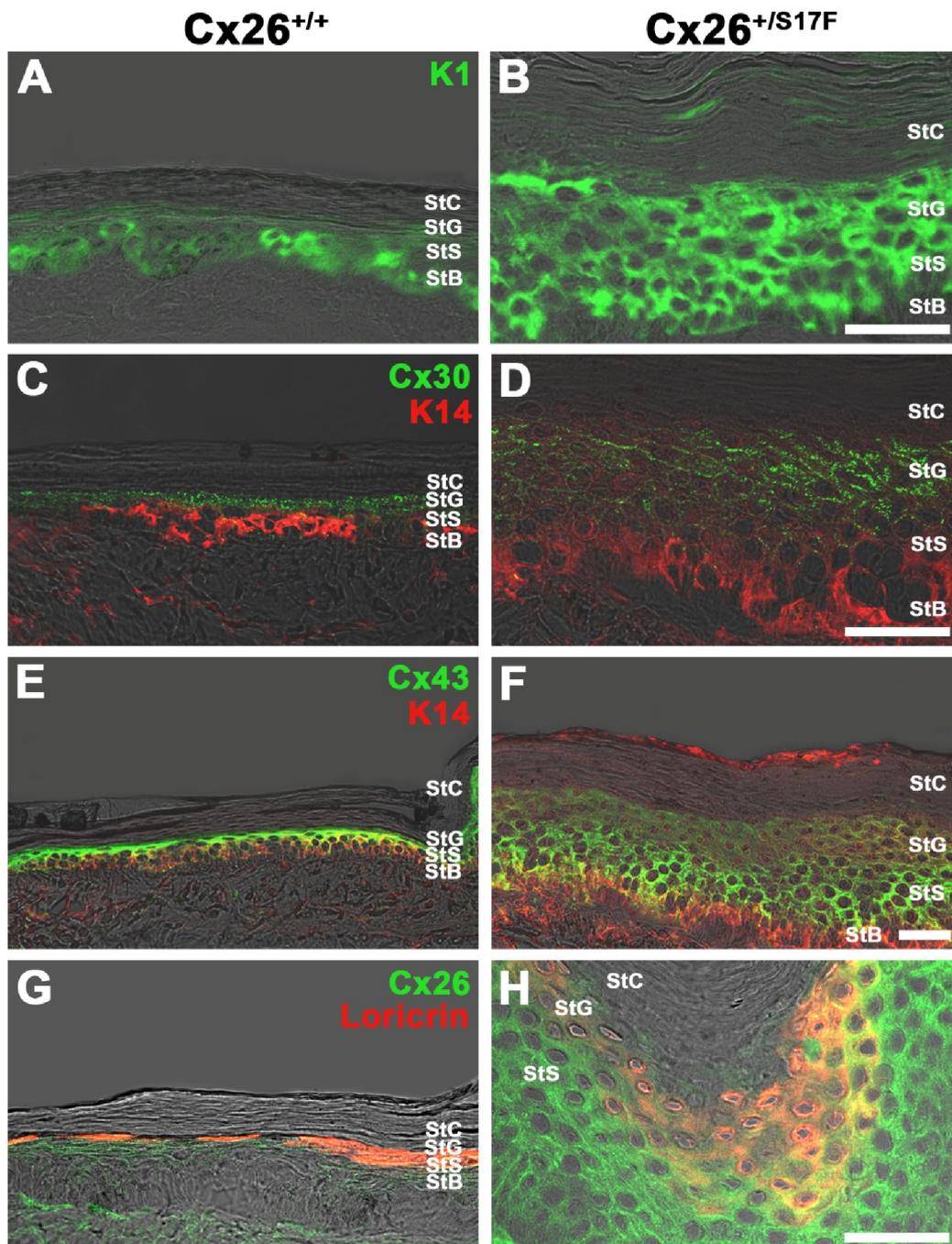


Abb. 4.30: Immunfluoreszenzanalysen der Schwanzhaut mit verschiedenen Markerproteinen.

Links: $Cx26^{+/+}$ -Mäuse. Rechts: $Cx26^{+/S17F}$ -Mäuse. (A, B) Keratin1 (K1) Expression. (C, D) Keratin14 (K14) und Cx30 Expression. (E, F) K14 und Cx43 Expression. (G, H) Cx26 und Loricrin Expression. Maßstabsbalken 100 μ m.

4.3.3.2.2 Expression der Connexine Cx26, Cx30 und Cx43 in der Haut von $Cx26^{+/S17F}$ -Mäusen

Zellkulturstudien weisen darauf hin, dass eine Vielzahl krankheits-assoziiertes Cx26 Mutationen (Rouan et al., 2001; Thomas et al., 2004) einen trans-dominanten Effekt auf die ebenfalls in der Haut exprimierten Connexine Cx30 und Cx43 ausüben. Um herauszufinden, ob auch die Mutation Cx26S17F die Expression der genannten Connexine in der Haut

beeinflusst, wurden Doppel-Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt (Abb. 4.31). Die Expression der Connexine Cx26 (grün) und Cx30 (rot) ist in Cx26^{+S17F}-Mäusen stärker ausgeprägt als in den Cx26^{+/+}-Mäusen. Eine punktierte Anfärbung dieser Connexine konnte sowohl in der Cx26^{+/+}- als auch in den Cx26^{+S17F}-Mäusen an Zell-Zellkontakten im Stratum granulosum und vereinzelt im Stratum spinosum nachgewiesen werden (Abb. 4.31 A, B). Die gelbe Färbung weist auf eine Kolo-kalisation beider Connexin im selben Gap Junction Plaque hin.

In der gesunden Maushaut kann die Expression der Connexine Cx26 und Cx43 in unterschiedlichen Hautschichten nachgewiesen werden. (vgl. 4.3.3.2.1). Aus der Abbildung 4.31 C wird ersichtlich, dass in der Haut der Cx26^{+/+}-Mäuse Cx26 (grün) im Stratum granulosum und Cx43 (rot) im Stratum spinosum und Stratum basale exprimiert wird. Diese Beobachtung trifft jedoch nicht vollständig für die Expression dieser Connexine in der Haut von Cx26^{+S17F}-Mäusen zu (Abb. 4.31 D). In diesen Mäusen kommt es zu einer überlappenden Expression beider Connexine an der Grenze zwischen Stratum granulosum und Stratum spinosum (gelb).

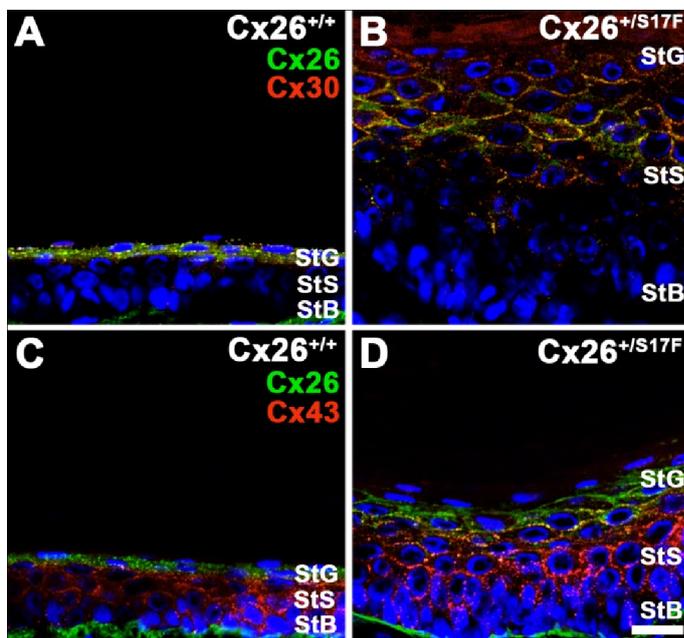


Abb. 4.31: Immunfluoreszenzanalyse an Gefrierschnitten der Haut von Cx26^{+S17F}-Mäusen.

Cx26 ist in grün dargestellt, die Connexine Cx30 und Cx43 in rot. Die Zellkerne wurden mit Draq5 markiert. (A, B) Cx26 und Cx30 Expression. (C, D) Cx26 und Cx43 Expression. Maßstabsbalken 20 μ m.

4.3.3.3 Proliferationsanalysen (Ki67, PCNA)

Oftmals geht eine Akanthose der Haut auch mit einer vermehrten Zellbildung einher (Hyperplasie), daher wurde die Proliferation der Haut durch Immunfluoreszenz- und Immunoblotanalysen in Zusammenarbeit mit Felicitas Bosen untersucht.

Die Zellproliferation wurde an Kryoschnitten von Pfortenepidermis adulter Cx26^{+S17F}-Mäuse und ihrer Cx26^{+/+}-Geschwistertiere mit spezifischen Antikörpern gegen den

Proliferationsmarker Ki67 (rot) untersucht. Bei Ki67 handelt es sich um ein nukleäres Nicht-Histon Protein, das in Zellen während der G2 und M Phase des Zellzyklus vorliegt (Sasaki et al., 1987; Iamaroon et al., 2004). Wie aus der Abbildung 4.32 B und D für Cx26^{+S17F}-Mäuse in beiden Mausstammhintergründen (C57BL/6 und 129Sv) ersichtlich wird, ist die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 in der epidermalen Basalschicht stark erhöht. Dies weist darauf hin, dass die Verdickung der Haut auf eine Hyperproliferation zurückzuführen ist. Die Basalschicht wurde mit K14-spezifischen Antikörpern (grün) hervorgehoben.

Um die relative Proliferationsstärke zu bestimmen, wurde die Proliferation in Immunoblotanalysen von Hautlysaten weiterführend untersucht. Dazu wurde der Proliferationsmarker PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) verwendet (Abb. 4.32 E, F). Bei der Analyse wurde eine dreifache Erhöhung der Proliferation ($3,1 \pm 0,12$) in Cx26^{+S17F}-Mäusen (C57BL/6) gefunden. Normalisiert wurde gegen die Expression von PCNA in Wildtyp-Mäusen. Im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen ist die Proliferation in 129Sv-Tieren nur leicht erhöht ($1,6 \pm 0,33$) (Abb. 4.32 F).

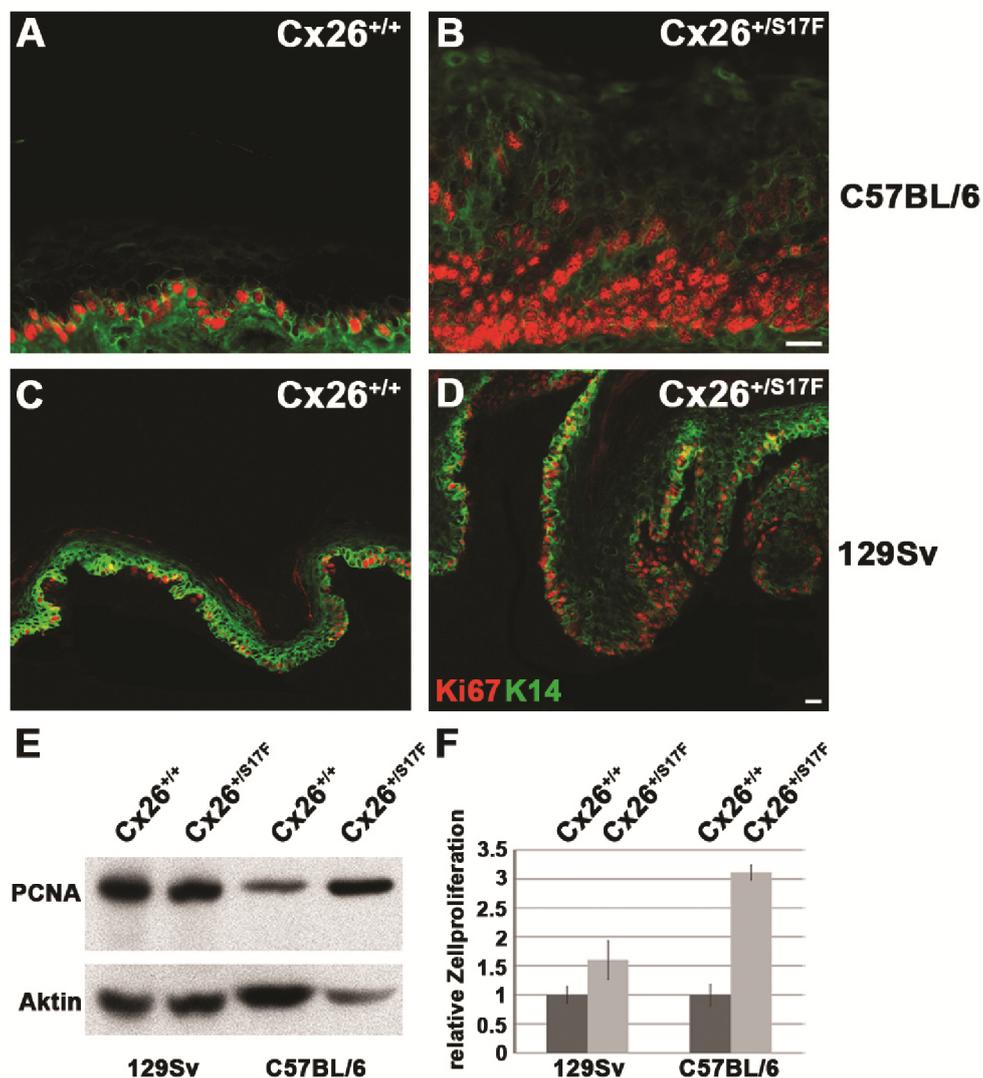


Abb. 4.32: Untersuchung der Proliferation der Haut von $Cx26^{+/S17F}$ -Mäusen vor verschiedenen Mausstammhintergründen.

(A-D) Immunfluoreszenzanalysen des Proliferationsmarkers **Ki67** (rot). In grün (**K14**) abgebildet ist die Basalzellschicht. Maßstabsbalken 20 μm . (E, F) Immunoblotanalysen mit dem Proliferationsmarker PCNA und quantitative Auswertung.

4.3.4 Charakterisierung des Hörphänotyps

4.3.4.1 Cx26 und Cx30 Expression in der Cochlea

Die Expression der Connexine Cx26 (Abb. 4.33, rot) und Cx30 (Abb. 4.33, grün) wurde in Cochleae adulter $Cx26^{+/+}$ - und $Cx26^{+/S17F}$ -Mäuse mittels Immunfluoreszenzanalysen überprüft. Es wurden keine augenscheinlichen Veränderungen in den Expressionsorten der Connexine beobachtet, allerdings erscheint die Expression von Cx26 insbesondere in den Fibrozyten Spiral limbus (Abb. 4.33, rot) vermindert zu sein. Die untersuchten Connexine wurden in den Stützzellen des Corti Organs, den Fibrozyten des Spiral limbus und Spiral ligament sowie in den Basalzellen der Stria vascularis nachgewiesen. Die inneren und äußeren Haarsinneszellen zeigten keine Cx26 bzw. Cx30 Immunreaktivität.

Morphologische Unterschiede oder eine vermehrte Apoptose (TUNNEL-Assay) wurde in den $Cx26^{+/S17F}$ -Mäusen nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

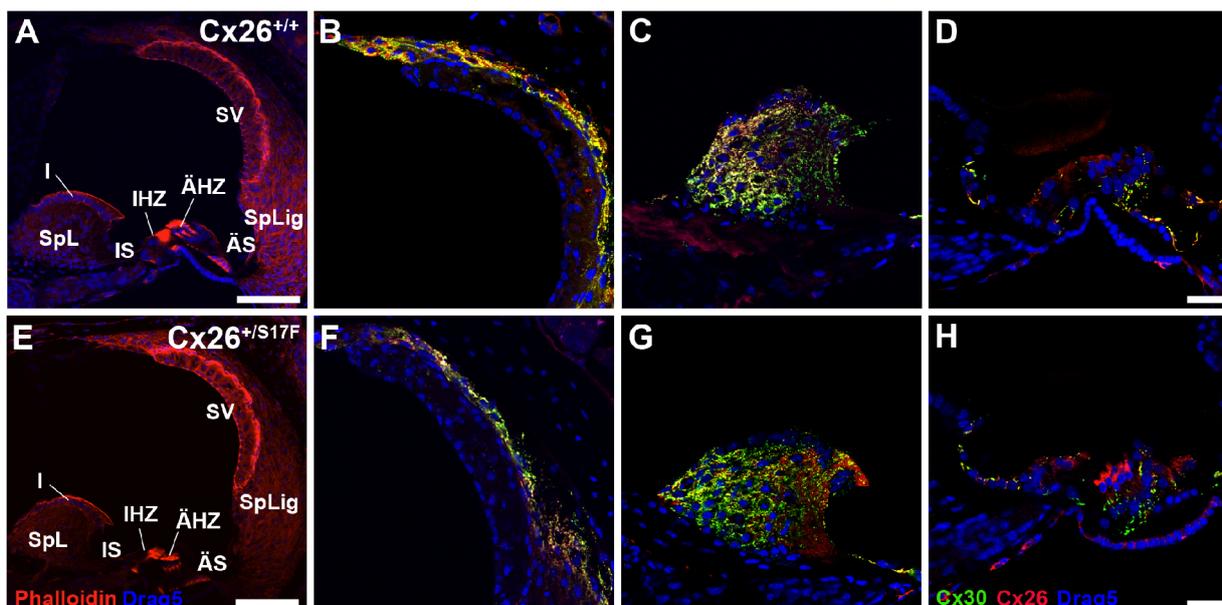


Abb. 4.33: Analyse der Cx26 und Cx30 Expression in der Cochlea adulter $Cx26^{+/+}$ - und $Cx26^{+/S17F}$ -Mäuse.

Obere Reihe: Querschnitt durch die Cochlea einer $Cx26^{+/+}$ -Maus. Untere Reihe: Querschnitt durch die Cochlea einer $Cx26^{+/S17F}$ -Maus. (A, E) Übersicht der Cochlea. Rot: Aktinfilamente (**Phalloidin**). Blau: Zellkerne (**Draq5**). Maßstabsbalken 50 μm . (B, F) Stria vascularis. (C, G) Spiral limbus. (D, H) Corti Organ. Rot: **Cx26**. Grün: **Cx30**. Maßstabsbalken 20 μm . I: Interdentalzellen. IHS: innere Haarsinneszellen. IS: innere Sulcuszellen. ÄHZ: äußere Haarsinneszellen. ÄS: äußere Sulcuszellen. SpL: Spiral limbus. SpLig: Spiral ligament. SV: Stria vascularis.

4.3.4.2 Bestimmung der Hörschwellen durch Ableitungen am Hirnstamm (ABR) und des endocochlearen Potentials

Die in den nachfolgenden Abschnitten beschriebenen Analysen der Hörschwellen und des endocochlearen Potentials der Cx26^{S17F} Mauslinie sind in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Tobias Moser, Abteilung Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Bernstein Center for Computational Neuroscience, Universität Göttingen durchgeführt worden.

In Abbildung 4.34 A und B sind die Hörschwellen der Cx26^{+/+}- und Cx26^{+/S17F}-Mäuse, die zwischen dem Hirnstamm und dem Hörnerv abgeleitet wurden, als elektrische Antwort auf verschiedene „Clicks“ und Tonfrequenzen dargestellt. Während schon schwache Stimuli in Cx26^{+/+}-Mäusen eine Antwort auf die verschiedenen Tonfrequenzen induzierten, war bei Cx26^{+/S17F}-Mäusen eine stärkere Stimulation notwendig. So sind die Hörschwellen in diesen Mäusen um 40 dB im 129Sv-Hintergrund und um 30 dB im C57BL/6-Hintergrund erhöht.

Um die Funktion der Stria vascularis und des cochlearen Ionenhaushalts zu analysieren, wurde das endocochleare Potential gemessen. In Korrelation mit der verminderten Hörfähigkeit zeigten Cx26^{+/S17F}-Tiere eine signifikante Reduktion ($p < 0,001$) ihres endocochlearen Potentials auf 80 mV im C57BL/6- und auf 60 mV im 129Sv-Mausstammhintergrund (Abb. 4.34 C). Die Reduktion des endocochlearen Potentials der Cx26^{+/S17F}-Mäuse war im 129Sv-Hintergrund stärker als im C57BL/6-Hintergrund.

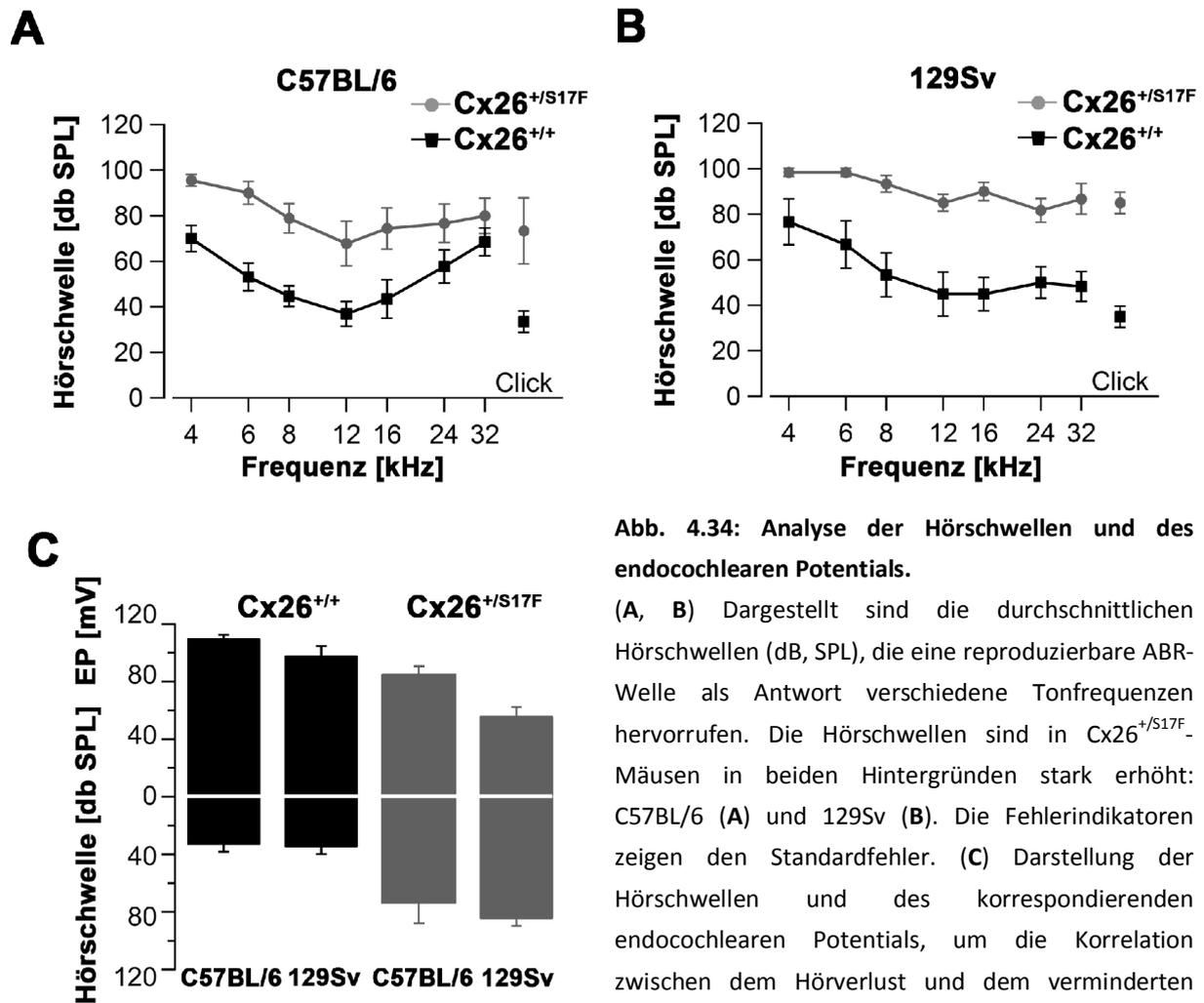


Abb. 4.34: Analyse der Hörschwellen und des endocochlearen Potentials.

(A, B) Dargestellt sind die durchschnittlichen Hörschwellen (dB, SPL), die eine reproduzierbare ABR-Welle als Antwort verschiedene Tonfrequenzen hervorrufen. Die Hörschwellen sind in Cx26^{+/S17F}-Mäusen in beiden Hintergründen stark erhöht: C57BL/6 (A) und 129Sv (B). Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler. (C) Darstellung der Hörschwellen und des korrespondierenden endocochlearen Potentials, um die Korrelation zwischen dem Hörverlust und dem verminderten endocochlearen Potential zu verdeutlichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Punktmutation Cx26S17F, die im Menschen das KID-Syndrom verursacht, in einer konditionalen Mauslinie untersucht. Heterozygote Cx26^{+/S17F}-Mäuse zeigen Hyperkeratosen der Schwanz- und Pfotenepidermis, annuläre Einschnürungen des Schwanzes und sind kleiner als ihre Wildtyp-Geschwister. Zudem weisen Untersuchungen durch Toluidinblau-Penetration auf einen Defekt in der Ausbildung der epidermalen Permeabilitätsbarriere. Immunfluoreszenzanalysen im Innenohr und in der Haut zeigen, dass die Lokalisation der Connexinproteine Cx26, Cx30 und Cx43 nicht verändert ist. Die erhöhte Expression der Proliferationsmarker Ki67 und PCNA deuten auf eine Hyperproliferation der basalen Keratinozyten. Die Hörschwellen der Cx26^{+/S17F}-Mäuse sind durchschnittlich um 35 dB in allen Frequenzen erhöht und korrelieren mit einer Reduktion des endocochlearen Potentials um 20-40%.

4.4 Die Cx26floxLacZ[Cx32]-Mauslinie

Die Defizienz von Cx26 führt in Mäusen zu Taubheit (Cohen-Salmon et al., 2002). Um zu untersuchen, ob Cx26 im Innenohr funktionell durch Cx32 ersetzt werden kann, sollte die Cx26floxLacZ[Cx32] Mauslinie analysiert werden. Die Aktivität der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Innenohr-spezifischen Otogelin (Otog)-Promotors wurde durch Nachweis der β -Galaktosidase überprüft. Immunfluoreszenzanalysen wurden durchgeführt, um die Expression von Cx26, Cx30 und Cx32 nachzuweisen. Der funktionelle Ersatz von Cx26 durch Cx32 wurde durch Ableitungen der Hörschwellen am Hirnstamm bestimmt.

Die für diese Untersuchung verwendeten Allele wurden ausführlich in Eckardt et al., 2004 der Doktorarbeit von N. Pielensticker (2005) und in der Diplomarbeit von N. Dicke (2006) beschrieben. Eine vereinfachte Darstellung der verschiedenen Genotypen ist in Abbildung 4.35 zu finden. Neben dem Cx26⁺-Allel wurden zur Erzeugung der verschiedenen Allelkombinationen zwei weitere Allele genutzt, das Cx26^{flox}- und das Cx26^{floxLacZ[Cx32]}-Allel. Sowohl die Cx26 als auch das *LacZ*-Gen liegen flankiert von loxP-Stellen vor und können so in der Maus durch die Aktivität einer Cre-Rekombinase deletiert werden. Durch das Einbringen des Reportergens *LacZ* anstelle des Cx26 Gens (*Gjb2*) wird die β -Galaktosidase unter der Kontrolle des endogenen Cx26-Promotors exprimiert. Nach Cre-vermittelter Deletion der *LacZ* kodierenden Region, kommt es zur Expression des Cx32 Proteins unter der Kontrolle des endogenen Cx26-Promotors (Cx26^{Cx32}). Das verwendete Transgen Otogelin-Cre (Otog-Cre) (Cohen-Salmon et al., 1997; Cohen-Salmon et al., 2002) führt zu einer Cre-Expression in den Stützzellen des cortischen Organs, den Epithelzellen der Reissner's Membran, Fibrozyten des Spiral limb und des Spiral ligaments.

Die nachfolgenden Expressionsanalysen und elektrophysiologischen Untersuchungen zur Messung der Hörschwellen der Cx26floxLacZ[Cx32]-Mauslinie sind in Zusammenarbeit mit Dr. Joachim Degen, Universität Bonn und der Arbeitsgruppe von Prof. Tobias Moser, Abteilung Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Bernstein Center for Computational Neuroscience, Universität Göttingen durchgeführt worden.

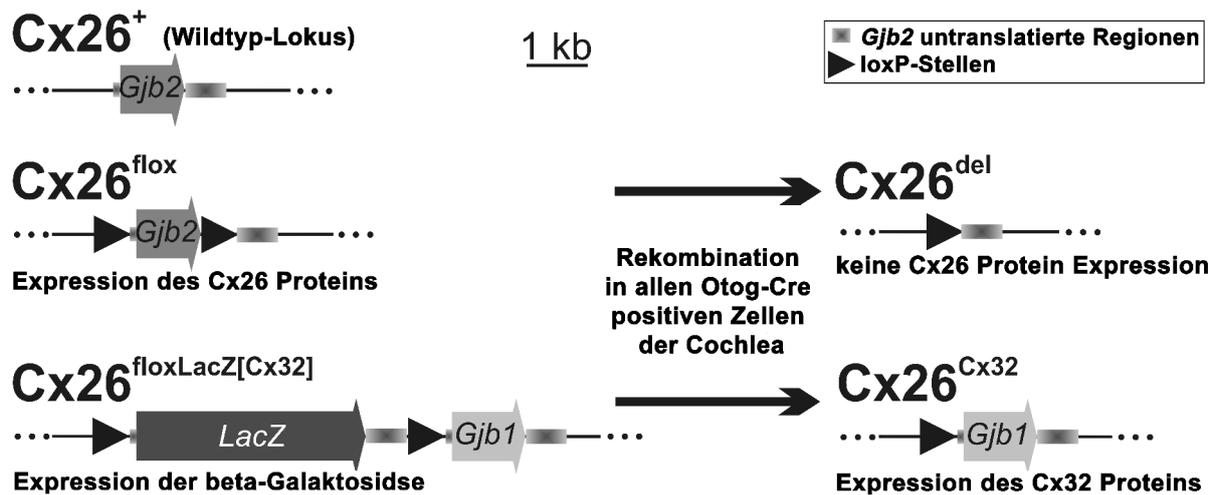


Abb. 4.35: Darstellung der unterschiedlichen Genotypen der $Cx26^{floxLacZ[Cx32]}$ Mauslinie.

Die Struktur des endogenen *Gjb2* Wildtyp-Allels ($Cx26^+$) sowie der anderen verwendeten Allele sind vor und nach Aktivität der Otog-Cre-Rekombinase abgebildet. Die kodierende Region von *Cx26* liegt flankiert von loxP-Stellen ($Cx26^{flox}$) vor. Nach Aktivität der Cre-Rekombinase kommt es zur Deletion der *Cx26* kodierenden Region ($Cx26^{del}$), das *Cx26*-Protein wird in Otogelin (Otog)-positiven Zellen nicht mehr exprimiert. Das zweite konditionale Allel, das in dieser Studie genutzt wurde, ist das $Cx26^{floxLacZ[Cx32]}$ -Allel. Hierbei wird anstelle von *Cx26* das Reporterprotein β -Galaktosidase unter der Kontrolle des endogenen *Cx26*-Promoters exprimiert. Die Expression der Otog-Cre-Rekombinase führt zur Deletion der β -Galaktosidase kodierenden Region und zur Expression des *Cx32*-Proteins (*Gjb1*) unter der Kontrolle des endogenen *Cx26*-Promoters ($Cx26^{Cx32}$, Knock-In Allel).

4.4.1 Nachweis der β -Galaktosidase Aktivität in der Cochlea von $Cx26^{floxLacZ[Cx32]}$ -Mäusen

In der $Cx26^{floxLacZ[Cx32]}$ -Mauslinie wird das von loxP-Stellen flankierte Reportergen *LacZ* unter der Kontrolle des endogenen *Cx26*-Promoters exprimiert. Dies erlaubt auf der einen Seite, die Expression von *Cx26* indirekt zu analysieren, und auf der anderen Seite die Otog-Cre-Aktivität, vor und nach der Deletion des *LacZ*-Gens, zu untersuchen (Abb. 4.36). Aufgrund der fehlenden Reporterexpression des $Cx26^{flox}$ -Allels wurde keine *LacZ*-Färbung in $Cx26^{flox/flox}$ - und $Cx26^{flox/flox}:$ Otog-Cre-Mäusen beobachtet (Abb. 4.36 A, exemplarisch gezeigt für $Cx26^{flox/flox}$ Mäuse). $Cx26^{flox/floxLacZ[Cx32]}$ -Mäuse exprimieren das *LacZ*-Gen unter der Kontrolle des endogenen *Cx26*-Promoters. Der Nachweis der β -Galaktosidase erlaubt so die indirekte Untersuchung der *Cx26* Expression (Abb. 4.36 B). Eine *LacZ*-Färbung wurde in den Basalzellen der Stria vascularis, den Stützzellen des Corti Organs sowie in den Fibrozyten des Spiral limb und Spiral ligaments nachgewiesen. Wird durch die Otog-Cre-Rekombinase Aktivität das loxP-flankierte *LacZ* entfernt, kommt es zur Expression von *Cx32* in allen Otogelin-positiven Zellen der Cochlea. In Abbildung 4.36 C ist eine *LacZ*-Färbung nur noch in vereinzelt Zellen des Spiral limb, Spiral ligament und der Stria vascularis der $Cx26^{+/floxLacZ[Cx32]}:$ Otog-Cre-Mäuse zu beobachten. In den übrigen Otogelin-positiven Zellen

des Spiral ligaments und des Spiral limbus sowie in den Stützzellen des Corti Organs wurde die kodierende Region der β -Galaktosidase nach Cre-Rekombinase Aktivität erfolgreich deletiert.

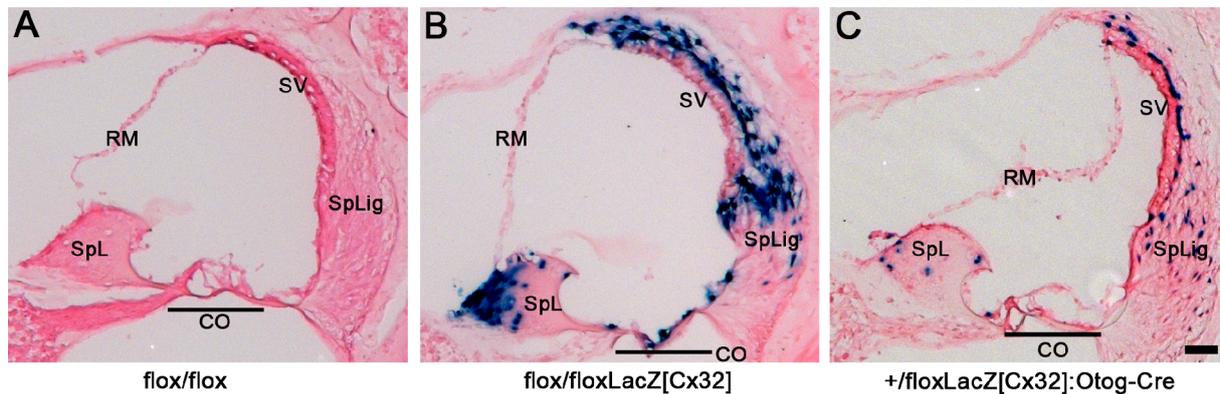


Abb. 4.36: LacZ-Färbung der Cochlea vor und nach Otog-Cre vermittelter Deletion.

(A) In $Cx26^{flox/flox}$ -Mäusen ist keine LacZ Expression nachzuweisen. (B) LacZ Expression in $Cx26^{flox/floxLacZ[Cx32]}$ -Mäusen. (C) Durch die Deletion des *LacZ*-Gens in $Cx26^{+/floxLacZ[Cx32]}$:Otog-Cre-Mäusen zeigen nur noch wenige Zellen eine LacZ-Färbung. CO: Corti Organ. RM: Reissner's Membran. SpL: Spiral limbus. SpLig: Spiral ligament. SV: Stria vascularis. Maßstabsbalken 100 μ m.

4.4.2 Immunfluoreszenzanalysen der Connexine Cx26, Cx30 und Cx32 in der Cochlea von $Cx26^{floxLacZ[Cx32]}$ -Mäusen

Die Expression der Connexine Cx26, Cx30 und Cx32 in der Cochlea adulter Mäuse wurde in Koimmunfluoreszenzanalysen untersucht. In der Cochlea Cx26 exprimierender Mäuse ($Cx26^{flox/flox}$, $Cx26^{flox/floxLacZ[Cx32]}$, $Cx26^{+/floxLacZ[Cx32]}$:Otog-Cre) wurde eine Cx26 Immunreaktivität (Abb. 4.37, rot) in den Stützzellen des Corti Organs, den Basalzellen der Stria vascularis und in Fibrozyten des Spiral limbus und Spiral ligaments beobachtet (exemplarisch gezeigt für die Stria vascularis), wobei diese in $Cx26^{flox/flox}$:Otog-Cre-Mäusen, aufgrund der Otog-Cre Rekombinase Aktivität, schwächer ausfiel (Abb. 4.37 B).

Die Cx32 Expression (Abb. 4.37, grün) konnte durch spezifische gegen Cx32 gerichtete Antikörper in Mäusen gezeigt werden, bei denen das $Cx26^{floxLacZ[Cx32]}$ -Allel durch die Otog-Cre-Rekombinase deletiert wurde (Abb. 4.37 C, D). Cx32 wurde in Zellen der Stria vascularis und in benachbarten Zellen des Spiral ligaments nachgewiesen, wo Cx32 gemeinsam mit Cx26 exprimiert wird (Abb. 4.37 C).

Der mögliche Einfluss der verminderten Cx26 Expression und des Einbringens von Cx32 auf Cx30 wurde in Cx26 und Cx30 Koimmunfluoreszenzanalysen untersucht. Cx30 (grün) wurde in allen untersuchten Genotypen nachgewiesen, jedoch schien in Mäusen, die Cx32 exprimieren, sowohl die Cx26 als auch die Cx30 Expression vermindert zu sein (Abb. 4.37 G,

H). Eine gemeinsame Expression der Connexine Cx26 und Cx30 konnte in Zellen des Spiral limb, des Spiral ligaments, des Corti Organs und der Stria vascularis nachgewiesen werden. (gelb, Abb. 4.37 E-H).

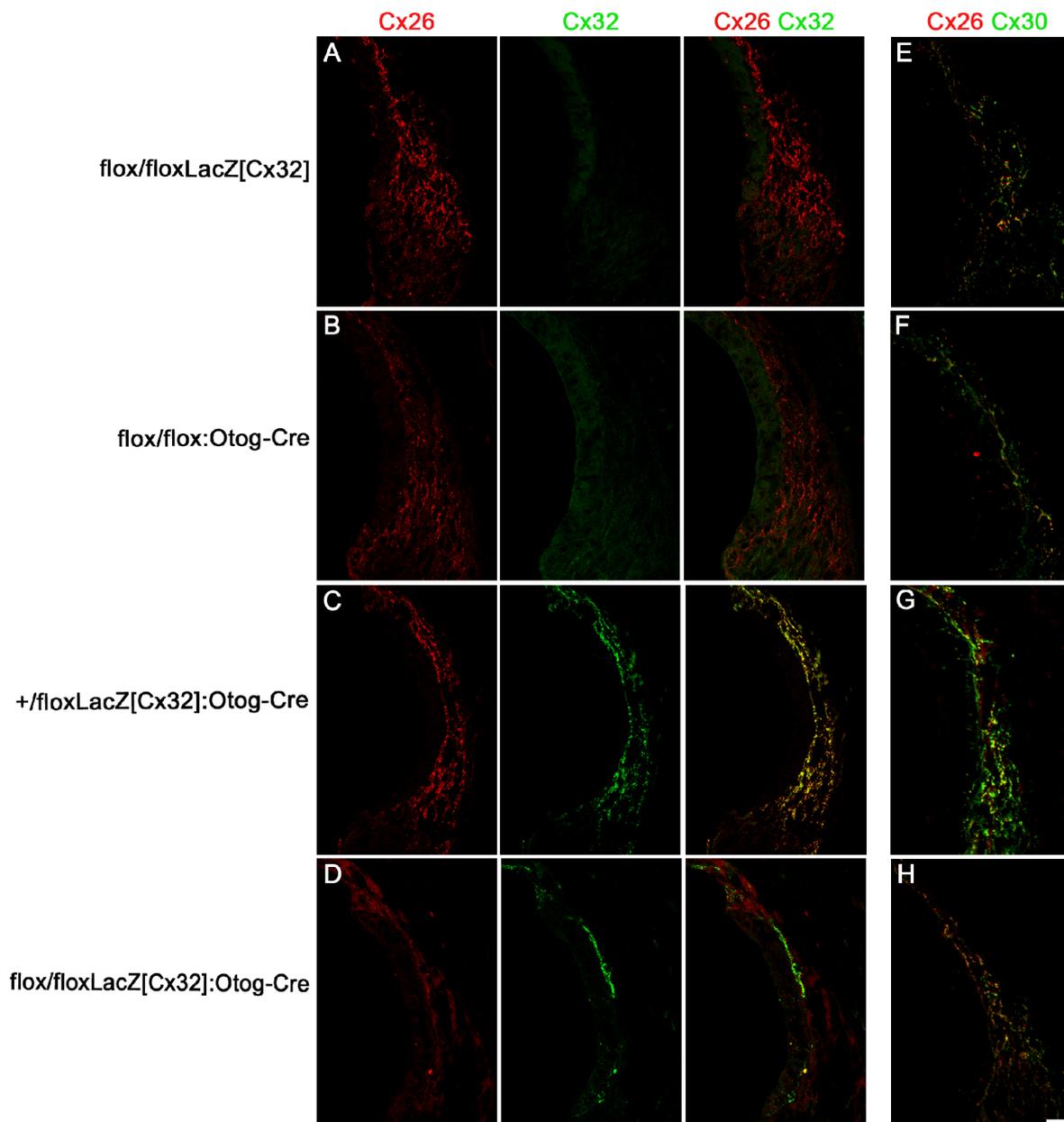


Abb. 4.37: Immunfluoreszenzanalyse der Connexine Cx26, Cx32 und Cx30 in der Stria vascularis von Cx26floxLacZ[Cx32] Mäusen.

(A-D) Cx26 und Cx32 Expression in der Stria vascularis. In Cx26^{flox/floxLacZ[Cx32]}-Mäusen (A) wurde keine Cx32 Expression nachgewiesen. Cx26 wurde in den Basalzellen der Stria vascularis und den benachbarten Fibrozyten des Spiral ligaments detektiert. (B) Nach Deletion der Cx26 kodierenden Region durch die Otog-Cre-Rekombinase, wurde eine schwächere Cx26 Expression beobachtet. (C) In Cx26^{+/floxLacZ[Cx32]}:Otog-Cre-Mäusen wurde Cx26 nur noch in wenigen Zellen des Spiral ligaments und der Stria vascularis nachgewiesen. Die Cx32 Expression konnte in diesen Mäusen in Otogelin-positiven Zellen gezeigt werden. (D) Cx26 ist sehr schwach in nicht Otogelin-exprimierenden Zellen nachzuweisen. Cx32 wurde in den Basalzellen der Stria vascularis beobachtet.

(E-H) Die Connexine Cx26 und Cx30 werden in allen untersuchten Genotypen exprimiert. In Cx26^{flox/floxLacZ[Cx32]}- (E) und Cx26^{flox/flox}:Otog-Cre-Mäusen (F) wurde die Expression der Connexine Cx26 und Cx30 in den Basalzellen der Stria vascularis und in den Fibrozyten des Spiral ligaments nachgewiesen. In diesen Zellen wurde eine gemeinsame Expression in einem Gap Junction Plaque (gelb) beobachtet. Nach Deletion der Cx26 kodierenden Region in Otogelin-positiven Zellen der Cochlea von Cx26^{+floxLacZ[Cx32]}:Otog-Cre-(G) und Cx26^{flox/floxLacZ[Cx32]}:Otog-Cre-Mäusen (H) wurde eine schwächere Cx26 und Cx30 Expression gezeigt. Maßstabsbalken: 20 µm.

4.4.3 Messung der Hörschwellen der Cx26floxLacZ[Cx32]-Mäuse

Die Hörschwellen der Cx26floxLacZ[Cx32]-Mäuse wurden als Antwort auf verschiedene „Clicks“ und Tonfrequenzen (4-6-8-12-16-24-32 kHz) durch Ableitung elektrischer Signale am Hirnstamm bestimmt (Abb. 4.38). In Cx26^{flox/flox}:Otog-Cre-Mäusen ist durch die Otog-Cre Aktivität die Kodierungsregion von Cx26 deletiert. So exprimieren diese Tiere nur in einigen wenigen nicht-Otogelin positiven Zellen Cx26. Die Cx30 Expression in der Cochlea dieser Tiere ist ebenso vermindert (vgl. Kap. 4.4.2). Dies führt zu einer Erhöhung der Hörschwelle um bis zu 40 dB in den mittleren Frequenzen (blau, Abb. 4.39, 12-16 kHz) im Vergleich zu den Cx26^{flox/flox}-Kontrolltieren (gelb, Abb. 4.38), die Cx26 auf beiden Allelen exprimieren. In Cx26^{flox/floxLacZ[Cx32]}-Mäusen ist Cx26 auf einem Allel durch das Reportergen *LacZ* ersetzt worden (schwarz, Abb. 4.38). Die Hörschwellen dieser Mäuse sind im Vergleich zu den Hörschwellen der Cx26^{flox/flox}-Mäuse leicht erhöht. Mäuse des Genotyps Cx26^{+floxLacZ[Cx32]}:Otog-Cre (grün, Abb. 4.38) weichen in ihren Hörschwellen kaum von den Hörschwellen der Cx26^{flox/flox}-Mäuse ab. In den Cx26^{+floxLacZ[Cx32]}:Otog-Cre-Mäusen kommt es auf einem Allel durch die Deletion des loxP-Stellen flankierten *LacZ*-Gens zur Expression von Cx32 unter der Kontrolle des endogenen Cx26-Promoters. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei der Analyse der Cx26^{flox/floxLacZ[Cx32]}:Otog-Cre-Mäuse (rot, Abb. 4.38). Durch die Aktivität der Otog-Cre-Rekombinase wird das Cx26 Gen (*Gjb2*) nicht länger exprimiert und es kommt zur Expression des Cx32 Proteins. Trotz der Abwesenheit des Cx26 Proteins in Otogelin-positiven Zellen der Cochlea konnten in diesen Tieren nahezu unveränderte Hörschwellen im Vergleich zu den Cx26^{flox/flox}-Kontrolltieren beobachtet werden. Dies führt zu der Annahme, dass Cx26 durch Cx32 funktionell im Innenohr ersetzt werden kann.

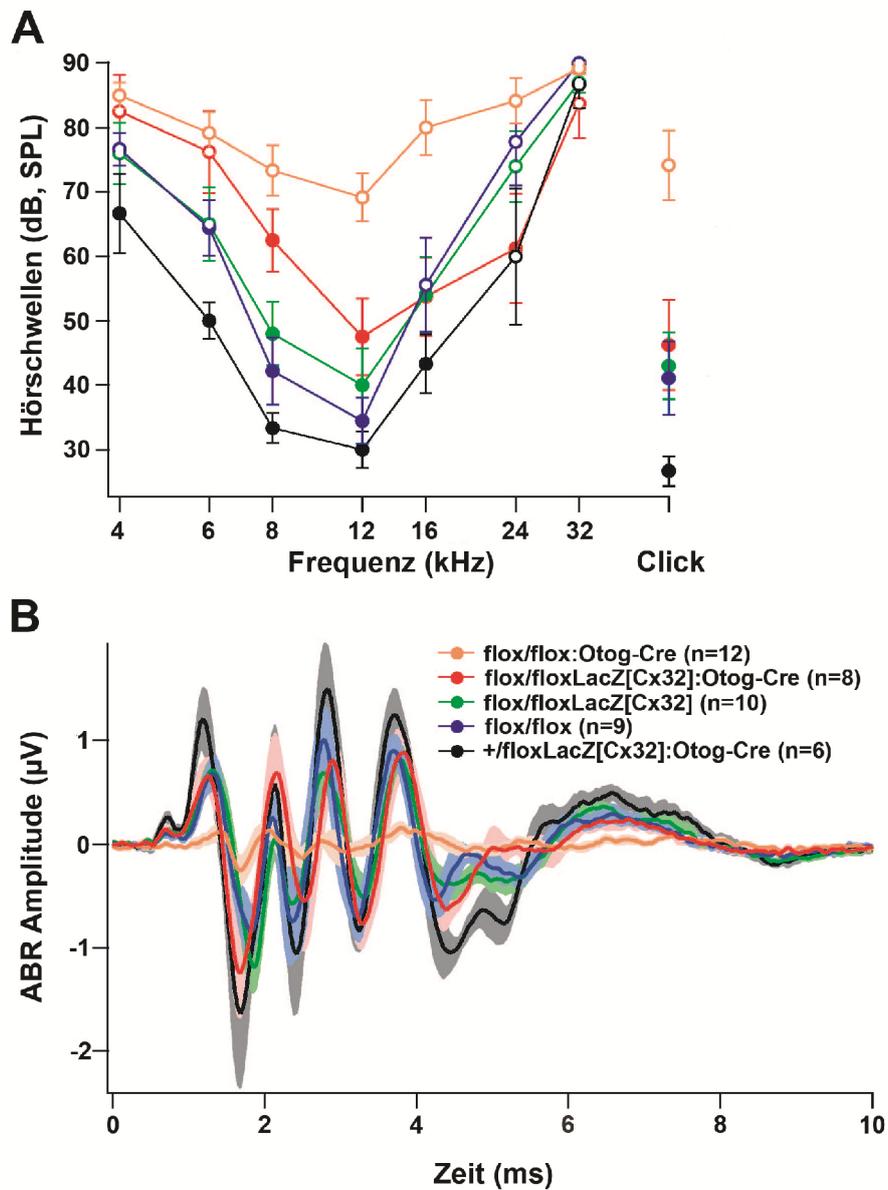


Abb. 4.38: Hörschwellen der Cx26floxLacZ[Cx32] Mäuse.

(A) Dargestellt sind die durchschnittlichen Hörschwellen (dB, SPL), die eine reproduzierbare ABR-Welle als Antwort verschiedene Tonfrequenzen hervorrufen. Vermessen wurden Tiere im Alter von $11,6 \pm 0,4$ Wochen. Die nicht ausgefüllten Kreise repräsentieren Datenpunkte, in denen einige oder alle Tiere Hörschwellen zeigten, welche die maximale Leistung der Lautsprecher (85 dB) überschritten. Diesen Datenpunkten wurde ein Wert von 90 dB zugewiesen. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler. (B) Kurvenverlauf der durchschnittlichen ABR Antworten auf 80 dB Click Stimuli. Mäuse mit einer Reduktion der Cx26 Expression zeigen verminderte ABR Amplituden, aber keine Verschiebung der ABR Latenzen, die mit einer Veränderung der Endolymphzusammensetzung einhergehen würde.

5 Diskussion

Die essentielle Bedeutung der Connexine Cx26 und Cx30 für das Hören wurde durch Studien an Cx26 und Cx30 defizienten Mäusen (Cx26^{Otog-Cre}- und Cx30^{-/-}-Mäuse) (Cohen-Salmon et al., 2002; Teubner et al., 2003) verdeutlicht, doch ist die Funktion beider Connexine im Innenohr bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Auch spiegeln die genannten Mauslinien nur unzureichend die genetische Ursache der mit Cx26 und Cx30 Mutationen assoziierten menschlichen Erkrankungen des Gehörs wider, die in seltenen Fällen auch von weiteren Symptomen – insbesondere der Haut – begleitet werden. So liegt die Ursache der Erkrankungen nicht im Fehlen eines Connexins, sondern in seinen, durch eine Mutation, veränderten Eigenschaften, die beispielsweise den Transport der Connexine zur Membran, die Permeabilität der Kanäle oder ihre Interaktion mit anderen Proteinen betreffen. Um den zugrundeliegenden Mechanismus aufzuklären, ist die Erzeugung von Mauslinien wichtig, die die Situation im Menschen möglichst genau nachahmen. Dazu wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit die Punktmutationen Cx30T5M und Cx26S17F in der Maus charakterisiert. Zusätzlich dazu wurde eine weitere Mauslinie erzeugt, welche die Punktmutation Cx30A88V exprimiert, die im Menschen ursächlich für die Ausbildung des Clouston Syndroms ist. Als ergänzender Aspekt wurde außerdem analysiert, in wie weit Cx32 – im Gegensatz zu Cx30 (1.2.3.2) – Cx26 im Innenohr der Maus funktionell ersetzen kann.

5.1 Cx26 und Cx30 punktmutierte Mäuse

5.1.1 Die Cx30T5M-Mauslinie

5.1.1.1 Die Erzeugung der Cx30T5M-Mauslinie

Zur Analyse der molekularen Ursachen, die im Menschen zu nicht-syndromischer Taubheit führen, wurden Mäuse erzeugt, die die Mutation Cx30T5M (Grifa et al., 1999) exprimieren. Es wurde ein nicht-konditionaler Ansatz gewählt, da aufgrund des Phänotyps der Cx30^{-/-}-Mäuse nicht von einer embryonalen Letalität ausgegangen werden musste (Teubner et al., 2003). Zur Erzeugung der Cx30T5M-Mauslinie wurde ein Austauschvektor kloniert, der eingerahmt von den homologen Bereichen des *Gjb6* Gens (Cx30) die Cx30T5M DNS anstelle der Kodierungsregion des wtCx30 sowie eine IRES-NLS-LacZ Kasette trägt. Die Selektion in ES-Zellen, nach erfolgter homologer Rekombination, wurde durch das Einbringen einer durch *frt*-Stellen flankierten Neomycin-Resistenzkasette ermöglicht (vgl. Abschnitt 4.1.1). Nach erfolgreicher homologer Rekombination wird die Cx30T5M Mutation unter der Kontrolle des endogenen Cx30-Promoters exprimiert. Bei der Klonierung wurde darauf geachtet, dass die Kozak-Sequenz des *Gjb6* Gens sowie das endogene poly(A) Signal des *Gjb6* erhalten bleiben.

In der *Gjb6* Sequenz wurde lediglich das für die Aminosäure Threonin kodierende Codon „ACC“ an Position 5 durch das für Methionin kodierende Codon „ATG“ ersetzt. Der Basenaustausch wurde so gewählt, dass eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *SphI* (GCATGC) entstand. Dies ermöglichte, die Punktmutation im Verlauf der weiteren Arbeit durch eine PCR mit anschließender Restriktionsspaltung indirekt nachzuweisen. Durch diese punktuelle Veränderung des genomischen Locus sollte eine möglichst ähnliche Expression der Mutation im Vergleich zum wtCx30 gegeben sein, ohne Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen, die zu einer veränderten Expression der Cx30T5M Mutation oder benachbarter Gene führen könnten.

Nach erfolgreicher homologer Rekombination in ES-Zellen und der anschließenden Charakterisierung der Zellklone durch PCR-, Southern Blot und Karyotyp Analysen, wurden zwei Klone zur Blastozysteninjektion ausgewählt (vgl. Abschnitt 4.1.2). Die hieraus entstandenen Chimären mit einem Chimerismusgrad von 80 - 100% wurden mit C57BL/6-Mäusen verpaart, um heterozygote Cx30T5M exprimierende Tiere ($Cx30^{+/T5M^{Neo}}$) zu erhalten. Zur Deletion der durch *frt*-Stellen flankierten Neomycin-Resistenzkassette wurden die heterozygoten Nachkommen mit deleter-Flp Tieren (Rodríguez et al., 2000) verpaart. Heterozygote Tiere ohne Neomycin-Resistenzkassette ($Cx30^{+/T5M}$) wurden untereinander verpaart, um eine homozygote Expression der Mutation ($Cx30^{T5M/T5M}$) zu erreichen. Die $Cx30^{T5M/T5M}$ -Tiere werden in der erwarteten Mendel'schen Verteilung geboren, sind lebensfähig und fertil.

5.1.1.2 Die Charakterisierung des Phänotyps und möglicher Ursachen

Messungen der Hörschwellen von $Cx30^{T5M/T5M}$ -Mäusen durch Ableitungen am Hirnstamm zeigten in allen untersuchten Frequenzen eine signifikante Erhöhung um 15 dB, während $Cx30^{+/T5M}$ -Mäuse keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu $Cx30^{+/+}$ -Mäusen aufwiesen (vgl. Abb. 4.15). Diesem milden Phänotyp entsprechend wurden in keinem der untersuchten Genotypen Veränderungen des endocochlearen Potentials (vgl. Abb. 4.15) oder der cochlearen Morphologie (vgl. Abb. 4.10) beobachtet. Im Gegensatz zu $Cx30^{-/-}$ -Mäusen, bei denen die Deletion des wtCx30 zum Verlust des Hörvermögens, des endocochlearen Potentials sowie zur Apoptose der äußeren und inneren Haarsinneszellen sowie der umliegenden Stützzellen führt (Teubner et al., 2003).

Im Vergleich zu $Cx30^{-/-}$ -Mäusen, in denen das wtCx30-Protein vollständig fehlt, wird das Cx30T5M-Protein in adulten $Cx30^{T5M/T5M}$ -Mäusen noch immer exprimiert (vgl. Abb. 4.11-4.12), wobei eine Reduktion der Cx30T5M-Proteinexpression um zwei Drittel im Vergleich zur wtCx30 Expression beobachtet wurde (Abb. 4.13 A). Zudem wurde in diesen Tieren eine

signifikante Herunterregulation von Cx26 nachgewiesen (Abb. 4.13 B). In Cx30^{-/-}-Mäusen ist die Cx26 Expression in Abhängigkeit der Anzahl exprimierter Cx30 Allele reduziert (Ahmad et al., 2007). Die Überexpression von Cx26 durch Verwendung einer BAC^{Cx26}-Maus führt im Cx30^{-/-}-Hintergrund zu einer Wiederherstellung der cochlearen Morphologie und des Hörvermögens (Ahmad et al., 2007). Umgekehrt hat die Überexpression von wtCx30 in konditionalen Cx26 defizienten Mäusen jedoch weder einen Effekt auf das Hörvermögen, noch wird die Apoptose der Haarsinnes- und Stützzellen verhindert (Lin et al., 2009). Aus diesen Gründen vermuten die Verfasser der Studien, dass nicht die Funktion der Cx30-Kanäle, sondern vielmehr die stabilisierende Wirkung von Cx30- auf Cx26-Proteine zur Aufrechterhaltung des Hörvermögens notwendig ist. Studien an Cx26- bzw. Cx30-defizienten organotypischen Cochleakulturen (P5) stützen diese Schlussfolgerungen allerdings nicht. Hier scheint vielmehr eine gegenseitige Regulation der Connexine Cx26 und Cx30 stattzufinden (Ortolano et al., 2008). Nichtsdestotrotz scheinen die verbleibenden Mengen an Cx26 und Cx30 Protein in Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen ausreichend zu sein, um die cochleare Morphologie und das endocochleare Potential aufrechtzuerhalten (Abb. 4.14).

Neben einer verringerten Connexinexpression wurde in organotypischen Cochleakulturen fünf Tage alter Cx30^{T5M/T5M}-Mäuse auch eine Reduktion des Calceintransfers und der spontanen Ca²⁺-Freisetzung in den inneren und äußeren Sulcuszellen festgestellt (Abb. 4.16).

Verschiedene Studien belegen die Bildung von Connexin-Halbkanälen (Bennett et al., 2003; Goodenough und Paul, 2003) und ihre Rolle als ATP-freisetzende Kanäle im Innenohr (Zhao et al., 2005). In organotypischen Cochlea-Kulturen konnte gezeigt werden, dass in Mäusen defizient für Pannexin1 (Px1), P2X₇-Rezeptor, Cx26 oder Cx30 als Antwort auf eine P2Y/PLC/IP₃/Ca²⁺-Signalkaskade, Cx26 und Cx30 Halbkanäle die Freisetzung von ATP aus den Stütz- und Epithelzellen der Cochlea vermitteln (Anselmi et al., 2008). Gap Junction Vollkanäle erlauben hingegen die Diffusion von Ca²⁺-mobilisierter Sekundärbotenstoffe durch diese Zellen. Vor dem Beginn des Hörens setzen die inneren Sulcuszellen spontan ATP in den extrazellulären Raum frei (Tritsch et al., 2007). Dadurch kommt es zur Aktivierung purinerge Rezeptoren in der Nachbarschaft der ATP-freisetzenden Zellen und damit zu einer erhöhten Ca²⁺-Ausschüttung (Tritsch und Bergles, 2010).

In verschiedenen Studien stellten die Autoren die Hypothese auf, dass nicht die Stabilisierung von Cx26 ausschlaggebend für die auditive Wahrnehmung sei, sondern vielmehr die Ausbildung heteromerer Cx26/Cx30-Kanäle (Sun et al., 2005; Yum et al., 2007). Es wurde ausführlich beschrieben, dass in der humanen und murinen Cochlea Cx26 und Cx30 in nahezu allen Zellen mit Ausnahme der Deiter Zellen eine Kolo-kalisation zeigen und heteromere Kanäle ausbilden (Sun et al., 2005; Liu et al., 2009). Heteromere Kanäle können

sich in ihren Eigenschaften von denen ihrer homomeren Gegenstücke unterscheiden (Sun et al., 2005; Yum et al., 2007). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Ca^{2+} -Transfer durch heteromere Kanäle schneller verläuft als durch ihre homomeren Gegenstücke (Sun et al., 2005). Wie eine Untersuchung transfizierter HeLa-Zellen zeigt, kann auch die Permeabilität der heteromeren Cx26/Cx30-Kanäle für bestimmte Moleküle variieren. Homotypische Cx26-Kanäle erlauben den Transport anionischer und kationischer Moleküle, wohingegen homotypische Cx30-Kanäle nur eine eingeschränkte Permeabilität für kationische Moleküle aufweisen (Yum et al., 2007). Heteromere Cx26/Cx30-Kanäle zeigen hingegen eine Permeabilität sowohl für Kationen als auch Anionen. So passiert das anionische Calcein heteromere Kanäle, kann aber homomere Cx30-Kanäle nicht passieren. Cx26 unterstützt somit den Transport dieses Moleküls.

Wie bereits erwähnt wurde, ist die Durchlässigkeit für Calcein in der sich entwickelnden Cochlea von Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen reduziert. Mit Hilfe der Patch Clamp Technik (engl. „patch“ = Flicker, hier Membranausschnitt; „clamp“ = befestigen) wurde gezeigt, dass die elektrische Kopplung zwischen den Sulcuszellen jedoch nicht betroffen ist (Schütz et al., 2010). Gestützt werden diese Ergebnisse durch frühere Untersuchungen transfizierter HEK293 Zellen, die das Cx30T5M-Protein überexprimieren und nur eine Beeinträchtigung der Permeabilität für Propidiumiodid und IP_3 zeigen (Zhang et al., 2005), aber nicht für Ca^{2+} - oder K^+ -Ionen. Es liegt demnach nahe die verminderte Kanalfunktion auf die Bildung nicht funktioneller Cx26/Cx30T5M-Kanäle zurückzuführen. Jedoch sollte nicht außer acht gelassen werden, dass auch eine generelle Reduktion der Cx26 Expression durch eine destabilisierende Wirkung der Cx30T5M Mutation auf das wtCx26-Protein diesen Effekt herbeiführen könnte.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit (Immunfluoreszenz-, Gap-FRAP-Analysen, Ca^{2+} -Messungen) und in Übereinstimmung mit verschiedenen Zellkulturstudien (Common et al., 2002; Zhang et al., 2005) konnte bestätigt werden, dass das Cx30T5M-Protein in der Maus zur Zellmembran transportiert wird und Gap Junction Kanäle ausbildet (Abb. 4.11-4.13), die jedoch eine reduzierte Permeabilität für Calcein und Ca^{2+} -Ionen aufweisen (Abb. 4.17).

Ähnlich der menschlichen Patienten, die die Mutation Cx30T5M heterozygot tragen, wurden auch in den untersuchten Mäusen keine Hautveränderungen gefunden (vgl. Abschnitt 4.1.5). Patienten, die an nicht-syndromischer Taubheit aufgrund der Cx30T5M Mutation leiden, zeigen einen Hörverlust von 20-50 dB in allen Frequenzen zwischen 2 und 8 kHz oder absolute neurosensorische Taubheit (Grifa et al., 1999). Verglichen mit den humanen Trägern dieser Mutation weisen Cx30T5M-Mäuse einen milderen Phänotyp auf. Diese Unterschiede in der Schwere der Erkrankung zwischen Mensch und Tier liegen ursächlich möglicherweise in der differentiellen Expression oder Permeabilität humaner und muriner

Connexinkanäle. Humane Cx26 (hCx26)-, hCx30- und murine Cx26 (mCx26)-Kanäle wurden in transfizierten HeLa-Zellen mittels Mikroinjektion von Molekülen unterschiedlicher Größe und Ladung sowie der Patch Clamp Technik untersucht (Beltramello et al., 2003). In dieser Studie konnten alle getesteten Moleküle bis zu einer molekularen Masse von 622 Da (Calcein) mCx26-Kanälen passieren. Die analysierten Moleküle wurden aber durch hCx26-Kanäle weitaus effizienter transportiert. Außerdem wurde der Transport größerer Moleküle nachgewiesen (Alexa Fluor 594, 759 Da). Durch hCx30-Kanäle konnten Moleküle nur bis zu einer molekularen Masse von 457 Da passieren.

Zurzeit werden zwei Hypothesen zur Erklärung der Connexinfunktion im Innenohr kontrovers diskutiert; zum einen die passive Diffusion von K^+ -Ionen (vgl. Kap. 1.2.2.1) und zum anderen der Transport von sekundären Botenstoffen (vgl. Kap. 1.2.2.2). Der milde Phänotyp der Cx30^{T5M/T5M}-Mäuse beruht mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf einer Störung der K^+ -Zirkulation durch das Connexin-Netzwerk. Denn wie Messungen der elektrischen Kopplung in Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen zeigen, ist diese durch die Expression der Mutation nicht beeinträchtigt. Anstatt dessen und übereinstimmend mit den kürzlich veröffentlichten Röntgenstrukturanalysen des hCx26 (Maeda et al., 2009), könnte die N-terminale Lokalisation der Mutation ursächlich für eine verminderte biochemische Permeabilität sein. So vermuten Maeda et al., dass der N-Terminus zur Öffnung eines Gap Junction Kanals beiträgt (vgl. Kap. 1.1.3) und die aminosäureterminale Zusammensetzung die Größen- und Ladungs-Spezifität des Kanals beeinflusst.

Zusammengenommen weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass der Austausch von Threonin zu Methionin in Cx30T5M-Mäusen die Kopplung in nicht-sensorischen Stützzellen des cortischen Organs beeinflussen könnte. Eine Schlüsselrolle liegt dabei möglicherweise in der spontanen Aktivität der inneren Sulcuszellen während der postnatalen cochlearen Entwicklung und der damit einhergehenden Ca^{2+} -Freisetzung (Tritsch et al., 2007; Tritsch und Bergles, 2010). Diese ist in organotypischen Cochleakulturen von P5 Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen im Vergleich zu Cx30^{+/+}-Tieren signifikant reduziert (vgl. Abb. 4.16, Tab. 4.1). Von der Annahme ausgehend, dass die Cx30T5M Mutation keinen Effekt auf die elektrophysiologische Kopplung hat (Daten nicht gezeigt), wäre demnach eine eingeschränkte biochemische Kopplung die Ursache für Taubheit in Mensch und Tier.

5.1.2 Die Cx30A88V-Mauslinie

Das Clouston Syndrom (vgl. Kap. 1.4.1.2, Hidrotische ektodermale Dysplase) führt u. a. zu palmoplantarer Keratose, spärlichem Haarwuchs und Nageldystrophien. In seltenen Fällen wurden auch Hörbeeinträchtigungen in den betroffenen Patienten beobachtet. Die Erkrankung gründet sich vor allem in Mutationen des *GJB6* Gens (Cx30). Dazu gehört auch die Mutation Cx30A88V (Lamartine et al., 2000). Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollte eine Mauslinie erzeugt werden, in der die Mutation Cx30A88V anstelle von wtCx30 exprimiert wird und so möglicherweise als Modell der menschlichen Erkrankung zur Aufklärung des zugrundeliegenden Mechanismus beitragen.

5.1.2.1 Die Erzeugung der Cx30A88V-Mauslinie

Zu Beginn der vorangegangenen Diplomarbeit (M. Schütz, Diplomarbeit 2006) waren bereits einige Mutationen in den Genen *GJB2* und *GJB6* bekannt und in Zellkulturversuchen hinsichtlich ihrer Eigenschaften charakterisiert (Grifa et al., 1999; Richard et al., 2002; Richard et al., 2004; Beltramello et al., 2005; Zhang et al., 2005). Während der Diplomarbeit und der nachfolgenden Doktorarbeit sollten zwei Mauslinien erzeugt werden, die sich in den Eigenschaften der exprimierten *GJB6* Mutationen und den daraus resultierenden menschlichen Erkrankungen unterscheiden. So wurde die Cx30T5M Mutation ausgewählt, die in HeLa- und HEK-Zellen zu einem Verlust der biochemischen Permeabilität führt (engl., „loss-of-function mutation“), während die elektrophysiologische Kopplung nicht betroffen zu sein scheint (Grifa et al., 1999; Common et al., 2002; Zhang et al., 2005). Die zweite Mutation, die ausgewählt wurde – die Cx30A88V Mutation – wurde als „gain-of-function“ Mutation (engl. „gain“ = Gewinn, „function“ = Funktion) beschrieben. In transfizierten HeLa-Zellen führte die alleinige Expression der Cx30A88V Mutation zu einem Transportdefekt, einhergehend mit einer primär zytoplasmatischen Lokalisation des Proteins. Ein Transport zur Membran wurde nur beobachtet, wenn das Cx30A88V-Protein gemeinsam mit dem wtCx30-Protein exprimiert wurde (Common et al., 2002). In einer weiterführenden Studie resultierte die Expression der Cx30A88V Mutation in einer erhöhten Halbkanalaktivität und einer damit einhergehenden vermehrten Freisetzung von ATP in das extrazelluläre Medium (Essenfelder et al., 2004). Eine solch erhöhte ATP-Freisetzung könnte als parakriner Botenstoff epidermale Wachstumsfaktoren beeinflussen, welche die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten sowie die Zelladhäsion kontrollieren und so ursächlich für die Ausbildung des Clouston Syndroms sein. Auch für andere mit Hauterkrankungen-assoziierte Punktmutationen in den Connexingenen *GJB2* und *GJB6* wurde eine vermehrte Halbkanalbildung gezeigt (Lee et al., 2009). Eine erhöhte Halbkanalaktivität könnte somit einen grundlegenden Mechanismus für eine Vielzahl menschlicher Hauterkrankungen

darstellen, die durch Punktmutationen in Connexingenen verursacht werden. Entgegen des, für die Cx30T5M Mutation, gewählten nicht-konditionalen Ansatzes wurde für die Cx30A88V Mutation, aufgrund des Funktionsgewinns, dessen Einfluss in der Maus nicht vorhergesehen werden konnte, ein konditionaler Ansatz gewählt. Dieser erlaubt zudem die voneinander unabhängige Untersuchung des Hör- und Hautphänotyps durch die Nutzung verschiedener Cre-Mauslinien, z. B. K5-Cre (undifferenzierte Keratinozyten, Basalschicht der Epidermis) oder Otog-Cre (Otogelin-positive Zellen des Innenohres).

Analog zu der Erzeugung des Cx30T5M Austauschvektors wurde in fünf Schritten ein weiterer Austauschvektor kloniert. Dieser führt, nach erfolgter homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus, zur Expression des punktmultierten Proteins Cx30A88V. Während der Klonierung dieses Austauschvektors konnte auf Plasmide zurückgegriffen werden, die als Zwischenschritte zur Erzeugung des Cx30T5M Vektors entstanden (vgl. M. Schütz, Diplomarbeit 2006 und Anhang dieser Arbeit). In dem Austauschvektor „Cx30KiCx30A88V“ liegt die wtCx30 kodierende DNS-Sequenz flankiert von loxP-Elementen vor. Die Mutation Cx30A88V wird erst nach Cre-vermittelter Deletion der wtCx30 DNS unter der Kontrolle des endogenen Cx30-Promoters exprimiert. Wie der Cx30T5M Austauschvektor enthält auch der „Cx30KiCx30A88V“ Vektor zur Expressionsanalyse eine IRES-NLS-LacZ Kasette. Zwischen den loxP-Elementen liegt außerdem die kodierende Region der Neomycin-Selektionskasette. Sie wird von frt-Stellen flankiert und erlaubt, durch die Aktivität der FLP-Rekombinase, eine Cre-Rekombinase-unabhängige Deletion der Neomycin kodierenden Region. Auch bei dieser Klonierung wurde darauf geachtet, dass die Kozak-Sequenz des *Gjb6* Gens sowie das endogene poly(A) Signal erhalten blieben. Lediglich das für die Aminosäure Alanin kodierende Triplet „GCA“ wurde durch das für Valin kodierende Triplet „GTA“ ersetzt. Um den Nachweis der Mutation durch eine PCR und anschließende Restriktionsspaltung zu erlauben, wurde ähnlich wie für die Mutation Cx30T5M ein Basenaustausch gewählt, der zur Bildung einer Erkennungssequenz für eine Restriktionendonuklease (*ScaI*) führt. Dieser recht kleine Eingriff in die *Gjb6* Sequenz sollte möglichst genau die Situation in den betroffenen menschlichen Patienten nachahmen.

5.1.2.1.1 Etablierung der Cx30A88V-Mauslinie

Die richtige Integration des Austauschvektors durch homologe Rekombination in das ES-Zellgenom wurde durch PCR-Analysen und Southern Blot Hybridisierungen nachgewiesen. Eine Veränderung der durchschnittlichen Chromosomenanzahl, z. B. durch Trisomien, konnte mittels der Bestimmung des Karyotyps ausgeschlossen werden. Aus diesen Untersuchungen ging ein Klon hervor, der für die Blastozysteninjektion eingesetzt wurde.

Die aus der Blastozysteninjektion hervorgegangenen sechs Chimären wurden mit C57BL/6-Mäusen verpaart. Aus diesen Verpaarungen gingen agouti-farbene Nachkommen hervor, welche die Keimbahngängigkeit des injizierten Klons bestätigten. Der Genotyp dieser Mäuse wurde mittels PCR-Analysen bestimmt. Keines der untersuchten 30 Tiere zeigte den erhofften Genotyp $Cx30^{+/floxA88V}$ (vgl. Kap. 4.2.6). Auch bei Verwendung anderer Startermoleküle blieb das Ergebnis das Gleiche. Die Zuverlässigkeit der PCR-Reaktionen wurde durch die Verwendung des Austauschvektors als Matrize bestätigt. In diesem Fall amplifizierten die genutzten Startermoleküle zuverlässig das erwartete Fragment, das bei Anwesenheit des rekombinierten Allels entstehen sollte. Nach erneuter Auswertung der Southern Blot Hybridisierungen, die auf einen möglichen Mischklon hinwies (vgl. Kap. 4.2.6), wurde eine Subklonierung des, für die Blastozysteninjektion eingesetzten, ES-Zellklons durchgeführt. Durch diese sollte ein Subklon isoliert werden, der das Wildtyp- und das rekombinante Allel im gleichen Verhältnis trägt. Der Versuch der Subklonierung wurde beendet, nachdem weder PCR- noch Southern Blot Analysen ein eindeutiges Ergebnis zeigten und die Passagenzahl der Klone durch die fortdauernde Kultivierung zunahm. Klone mit einer zu hohen Passagenzahl können häufig nicht effizient zur Erzeugung chimärer Tiere eingesetzt werden. Auch Veränderungen des Chromosomensatzes, z. B. Trisomien, treten vermehrt auf. Eine erneute Transfektion des Austauschvektors „Cx30KiCx30A88V“, begleitet von einer Neuisolierung der Vektor-DNS und Neuetablierung der PCR-Analysen, erschien somit erfolgversprechender. Aus zeitlichen Gründen war dies innerhalb dieser Arbeit nicht mehr möglich und wurde von Felicitas Bosen erfolgreich in ihrer Diplomarbeit (2010) durchgeführt.

5.1.3 Die Cx26S17F-Mauslinie

Die Erbkrankheit Keratitis-Ichthyosis-Taubheitssyndrom (KID) wird durch Punktmutationen im *GJB2* Gen (Cx26) verursacht. Die Symptome des KID-Syndroms sind neurosensorischer Hörverlust, eine Verdickung und Verhornung der Epidermis (Acanthose und Hyperkeratose) sowie eine vaskularisierende Hornhautentzündung (Keratitis), oftmals begleitet von einer erhöhten Anfälligkeit für Plattenzellkarzinome (Richard, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde die bereits bestehende konditionale Cx26S17F-Mauslinie charakterisiert (vgl. Dr. T. Auth, I. Körber, Diplomarbeit 2008 und F. Bosen, Diplomarbeit 2010), welche die humane Mutation Cx26S17F, nach homologer Rekombination in ES-Zellen, unter der Kontrolle des endogenen Maus Cx26-Promoters exprimiert. Die Mutation wurde in heterozygoten Tieren (Cx26^{+S17F}) vor dem Hintergrund zweier Inzuchtmausstämme untersucht, C57BL/6 und 129Sv. Homozygote Cx26S17F-Mäuse (Cx26^{S17F/S17F}) wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, da Verpaarungen heterozygoter Cx26^{+S17F}-Mäuse untereinander keinen Nachwuchs erzeugten. Dieser Umstand ist möglicherweise auf eine embryonale Letalität, ähnlich der der Cx26 defizienten Mäuse (vgl. Kap. 1.2.3.1), oder auf eine Infertilität der Weibchen (Verpaarungen von Cx26^{+S17F}-Weibchen mit C57BL/6- oder 129Sv-Männchen blieben ohne Nachwuchs) zurückzuführen. Eine Zeugungsunfähigkeit der Cx26^{+S17F}-Männchen konnte hingegen ausgeschlossen werden, da die Verpaarung der Männchen mit C57BL/6- bzw. 129Sv-Weibchen zu Nachwuchs führte. Anders, als nach Mendel'scher Verteilung erwartet, wurden weniger Cx26^{+S17F}-Mäuse geboren (vgl. Abb. 4.27 H), möglicherweise aufgrund eines Defekts der epidermalen Barriere (vgl. Abb. 4.29), der zur Austrocknung der neugeborenen Mäuse führt. Auch im Menschen finden sich letale Formen des KID Syndroms. Erst kürzlich wurde veröffentlicht, dass Patienten, die die Cx26G45E Mutation tragen, in den ersten Monaten nach der Geburt aufgrund einer sich wiederholenden unkontrollierbaren Sepsis versterben. Als Ursachen dieser Sepsis sind ein Defekt der Hautbarriere, der das Eindringen von Mikroorganismen ermöglicht, sowie eine primäre Immundefizienz denkbar (Sbidian et al., 2010).

Neugeborene Cx26^{+S17F}-Mäuse (C57BL/6) sind kleiner als ihre Wildtyp-Geschwistertiere, zeigen eine schuppige, glänzende Haut und verwundete Schwanzenden (vgl. Abb. 4.28 A, B). Adulte Cx26^{+S17F}-Mäuse (C57BL/6) prägen eine starke Hyperplasie der epidermalen suprabasalen Schichten, Hyperkeratose an den Sohlen der Pfoten und annuläre Einschnürungen des Schwanzes aus (vgl. Abb. 4.28 A, B). Cornea Defekte (F. Bosen, Diplomarbeit 2010) oder Tumore wurden nicht beobachtet. Neben den beschriebenen Hautanomalien zeigen Cx26^{+S17F}-Mäuse beider Mausstammhintergründe eine signifikante Erhöhung der Hörschwellen von 30-40 dB, die mit einer Reduktion des endocochlearen

Potentials einhergeht (vgl. Abb. 4.34). Der Hördefekt der Cx26^{+S17F}-Mäuse konnte trotz der ebenfalls erhöhten Hörschwellen der Cx26^{+/+}-Kontrolltiere im Vergleich zu anderen C57BL/6- und 129Sv-Wildtyp-Tieren, möglicherweise als Folge von Lärm in den Mausställen sowie einer stammabhängigen bzw. altersbedingten Schwerhörigkeit, festgestellt werden. Der Hörphänotyp der Cx26^{+S17F}-Mäuse ähnelt dem, der für die Cx26^{loxP/loxP:Otog-Cre}-Mäuse beschrieben wurde (vgl. Kap. 1.2.3.1), mit dem Unterschied, dass der Phänotyp in diesen Mäusen noch stärker ausgeprägt war. Zudem wurde in diesen Tieren die Schwerhörigkeit mit einem Verlust der Haarsinnes- und Stützzellen des cortischen Organs assoziiert (Cohen-Salmon et al., 2002). Möglicherweise reicht in Cx26^{+S17F}-Mäusen die heterozygote Expression des wtCx26-Proteins in Wechselwirkung mit dem wtCx30-Protein aus, um zumindest eine Restfunktionalität der Cochlea zu bewahren, die in den Cx26^{loxP/loxP:Otog-Cre}-Mäusen durch das Fehlen des wtCx26 nicht mehr gewährleistet ist.

Der schwere Hör- und Hautphänotyp, der durch die Mutation Cx26S17F verursacht wird, könnte das Ergebnis einer gestörten intrazellulären Kopplung sein, wie sie schon in vorhergehenden Studien beschrieben wurde. In transfizierten HeLa Zellen wird das Cx26S17F-Protein zur Zellmembran transportiert (vgl. auch diese Arbeit Kap. 4.3.3.2 und 4.3.4.1), wo es Gap Junction Plaques ausbildet. Farbstoff-Kopplungsanalysen mit Carboxyfluorescein zeigten, dass Carboxyfluorescein zwar homomere wtCx26-Kanäle passieren kann, ein Transport durch Cx26S17F Kanäle jedoch verhindert wird (Richard et al., 2002). Die weiterführende Untersuchung dieser Mutation und anderer mit KID-assoziierten Mutationen (G12R, N14K, D50N) in *Xenopus laevis* Oozyten deutet daraufhin, dass Cx26S17F zu einem vollständigen Verlust der Gap Junction Kanal-Permeabilität führt. Weder eine biochemische noch eine elektrische Kopplung oder eine erhöhte Halbkanalaktivität wurden nachgewiesen. Ganz im Gegenteil zu den anderen analysierten KID-assoziierten Mutationen, die eine deutlich erhöhte Halbkanalaktivität aufzeigten (Lee et al., 2009).

Die verminderte Permeabilität der Cx26S17F Mutation (Richard et al., 2002; Lee et al., 2009) könnte an der Lokalisation der Mutation im N-Terminus des Cx26-Proteins liegen. Erst vor einiger Zeit wurde die Struktur des humanen Cx26 durch die Röntgenstrahlenstrukturanalyse bei einer Auflösung von 3.5 Å aufgeklärt (Maeda et al., 2009). Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass der N-Terminus durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten Trp3 und Met34 eine Art Stöpsel („plug“) bildet (vgl. auch Abschnitt 1.1.3 und Abb. 1.3), der die Kanalpore spannungsabhängig durch eine Konformationsänderung verschließt. Im Fall der N-terminalen Cx26S17F Mutation könnten die dazu notwendigen Interaktionen zwischen den Aminosäureresten verändert sein und zu einem vollständigen Verschluss des Kanals führen.

5.1.3.1 Hautphänotyp

Die Ausbildung der unterschiedlichen epidermalen Schichten, aufgrund einer schrittweisen Differenzierung der Keratinozyten, wird begleitet von einem sukzessiven Wechsel in der Keratinexpression (Proksch et al., 2008). So werden beispielsweise die Keratine K5 und K14 als Dimere in den basalen undifferenzierten Keratinozyten exprimiert und während der weiterführenden Differenzierung durch die Keratine K1 und K10 ersetzt. Die Keratine K5 und K14 eignen sich daher gut als Marker undifferenzierter und die Keratine K1 und K10 als Marker differenzierter Keratinozyten. Wie Immunfluoreszenzanalysen mit den Keratinozytenmarkern K14 und K1 zeigen, resultiert die heterozygote Expression der Cx26^{S17F} Mutation in einer Verdickung der suprabasalen Schichten. Durch die Verwendung der Proliferationsmarker Ki67 und PCNA konnte nachgewiesen werden, dass diese Verdickung mit einer erhöhten Proliferation der basalen Keratinozyten einhergeht (Hyperplasie). Die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 in basalen Keratinozyten wurde durch eine Kolo-kalisation mit dem Keratinozytenmarker K14 bestätigt. Die Verdickung der Epidermis in den Cx26^{+S17F}-Mäusen ist vermutlich auf ein Ungleichgewicht der Proliferation- und Differenzierungsprozesse zurückzuführen. Dabei resultiert die erhöhte Proliferation in einer Verdickung der suprabasalen Schichten (Acanthose) und eine reduzierte Abschuppung der ausdifferenzierten Keratinozyten in einer Verdickung des Stratum corneums (Hyperkeratose). Eine fortschreitende Verschlechterung des Hautphänotyps der Cx26^{+S17F}-Mäuse mit zunehmendem Alter wurde im Allgemeinen nicht beobachtet.

Neugeborene Cx26^{+S17F}-Mäuse zeigen in einigen Fällen einen milden Defekt der epidermalen Barriere, der zum Tod der Mäuse durch Austrocknung innerhalb der ersten 1-4 Tage nach der Geburt führen kann. Auch das Eindringen von Mikroorganismen, wie es für humane KID Patienten beschrieben wurde (Sbidian et al., 2010), wäre denkbar. In früheren Studien der Epidermis konnte beobachtet werden, dass die Expression von wtCx26 in hyperproliferierender Haut und während der Wundheilung hochreguliert (vgl. Kap. 1.3.3) wird (Labarthe et al., 1998; Kretz et al., 2003). Studien an INV-Cx26 Mäusen, in denen wtCx26 unter der Kontrolle des Epidermis-spezifischen Involucrin-Promotors exprimiert wird, zeigen, dass wtCx26 nach der Wundheilung und während der embryonalen Entwicklung der epidermalen Barriere *in utero* herunterreguliert werden muss, da ansonsten keine epidermale Differenzierung der Keratinozyten stattfindet (Djalilian et al., 2006). Die persistierende Cx26 Expression in adulten INV-Cx26 Mäusen resultiert in der Hyperproliferation der Epidermis und blockiert den Übergang zur epidermalen Differenzierung. Die Autoren wiesen nach, dass eine erhöhte Halbkanalaktivität in INV-Cx26 Mäusen und die damit einhergehende erhöhte Freisetzung von ATP zu einer veränderten Ca²⁺-Konzentration führt. Ca²⁺ ist ein wichtiger Regulator der Proteinsynthese in der

Epidermis, so reguliert Ca^{2+} u. a. die Aktivität der Transglutaminase 1, die bei der Ausbildung des „cornified envelope“ (engl. „cornified“ = verhornt, „envelope“ = Umschlag bzw. Hülle) Proteine miteinander quervernetzt. Außerdem spielt Ca^{2+} eine Rolle bei der Zelladhäsion und während der epidermalen Differenzierung. Die verschiedenen Schichten der Epidermis unterscheiden sich in ihrer intra- und extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Von den unteren undifferenzierten Schichten zu den oberen differenzierten Schichten steigt die Ca^{2+} -Konzentration an, wobei die höchste Ca^{2+} -Konzentration am Übergang vom Stratum granulosum zum Stratum corneum verzeichnet wird. Hier findet die Lipidfreisetzung und die Bildung des „cornified envelope“ statt. Eine Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration aufgrund einer vermehrten Freisetzung von ATP könnte zu einer Störung der terminalen Differenzierung und damit der Wiederherstellung der epidermalen Barriere führen.

Anders als die KID-assoziierten Cx26 Mutationen G12R, N14K und D50N (vgl. Kap. 1.1.3) führt die Ausprägung der Cx26S17F Mutation nicht zu einer erhöhten Halbkanalaktivität in *Xenopus laevis* Oozyten. Die Mutation Cx26S17F verliert die Halbkanalaktivität ganz (Lee et al., 2009). Im Gegensatz zu den Mutationen, die ähnlich der INV-Cx26 Mäuse eine erhöhte Halbkanalaktivität aufweisen und damit die Ca^{2+} -Konzentration verändern und eine Differenzierung möglicherweise verhindern, deuten unsere Ergebnisse daraufhin, dass auch ein Verlust der Kanalfunktion der Cx26S17F-Kanäle (Richard et al., 2002; Lee et al., 2009) zu den beobachteten Hautanomalien (Hyperplasie, hyperproliferierende Keratinozyten) führen kann. So könnten die Expression des mutierten Connexinproteins, seine Lokalisation in der Zellmembran und eine Interaktion mit anderen Proteinen ausreichen, um den Proliferations- und Differenzierungsprozess bzw. die Zelladhäsion in der Epidermis zu beeinflussen.

5.1.3.2 Hörphänotyp

Die inverse Korrelation des endocochlearen Potentials und der ABR Messungen weisen auf eine verhinderte Erzeugung des endocochlearen Potentials als zentralen Mechanismus der Innenohr-Pathophysiologie des KID-Syndroms und anderer verwandter Erkrankungen hin. Diese Beobachtungen werden von früheren Untersuchungen der wtCx26 und wtCx30 Defizienz in der Maus gestützt (Cohen-Salmon et al., 2002; Teubner et al., 2003). Eine Reduktion der auditiven Empfindlichkeit aufgrund einer beeinträchtigten Erzeugung des endocochlearen Potentials ist ein weit verbreiteter Mechanismus neurosensorischer Hörverluste und findet sich auch bei Furosemid-induziertem Hörverlust und altersbedingter Schwerhörigkeit (Schmiedt et al., 2002; Lang et al., 2010).

Vorhergehende Studien argumentieren, dass die Bildung heteromerer Cx26/Cx30 Gap Junction Kanäle, die sich in ihren Eigenschaften von homomeren Kanälen unterscheiden,

essentiell zur Aufrechterhaltung der Homeostase im Innenohr sind (Sun et al., 2005; Yum et al., 2007). So verläuft der interzelluläre Ca^{2+} -Transfer schneller durch heteromere Kanäle (Sun et al., 2005). In transfizierten HeLa Zellen erlauben wtCx26 homotypische Kanäle den Transfer anionischer und kationischer Moleküle, während wtCx30 homotypische Kanäle eine eingeschränkte Permeabilität für Kationen aufweisen. Werden beide zusammen exprimiert und kommt es zur Ausbildung heteromerer Kanäle, so liegen die Eigenschaften dieser Kanäle zwischen denen der homomeren Kanäle (Yum et al., 2007). $\text{Cx26}^{+/S17F}$ -Mäuse sind schwerhörig und haben ein reduziertes endocochleares Potential (vgl. Abb. 4.35), aber sie zeigen, ausgehend von den durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen, keine auffälligen Cx26 oder Cx30 Expressions- oder Lokalisationsunterschiede. Die Connexine scheinen kolokalisiert aufzutreten (Abb. 4.34), was auf die Bildung heteromerer Kanäle hinweist (Ahmad et al., 2003; Forge et al., 2003). Eine vorläufige Analyse der Connexine Cx26 und Cx30 in Immunoblots deutet daraufhin, dass beide Connexine reduziert exprimiert werden (Daten nicht gezeigt, da aufgrund eines Mangels an $\text{Cx26}^{+/S17F}$ -Mäusen nicht genügend Cochleae isoliert werden konnten, um den Versuch zu wiederholen). Die Ergebnisse dieser und früherer Studien, in denen die Cx26S17F Mutation zwar in der Membran gefunden wurde (vgl. Abb. 4.34), jedoch keine Funktionalität aufwies („loss-of-function“ Mutation) (Richard et al., 2002; Lee et al., 2009), verdeutlichen, dass außer den funktionellen wtCx26/wtCx30-Kanälen auch nicht funktionelle Cx26S17F/wtCx30 oder Cx26S17F/wtCx26-Kanäle gebildet werden. Die Mutation kann so einen trans-dominanten Effekt auf wtCx26 und wtCx30 ausüben, der die Funktionalität der betroffenen Wildtyp-Connexine einschränkt. Die verbleibenden funktionellen wtCx26/wtCx30-Kanäle erlauben möglicherweise den Erhalt eines eingeschränkten Hörvermögens und des damit einhergehenden reduzierten endocochlearen Potentials. Auch eine generelle Reduktion der Connexinexpression würde die Funktionalität der Cochlea einschränken, wobei die alleinige Reduktion der Connexinexpression, wie ein Vergleich der Cx30T5M Mutation zeigt, vermutlich nicht ausreicht, um einen so schweren Phänotyp auszubilden (vgl. Abschnitt 5.1.1).

Zusammengenommen zeigen die $\text{Cx26}^{+/S17F}$ -Mäuse einen Phänotyp, der mit den Symptomen der an KID erkrankten humanen Patienten, vergleichbar ist. Eine Ausnahme bildet die im Menschen beobachtete vaskularisierende Keratitis, die in den untersuchten $\text{Cx26}^{+/S17F}$ -Mäusen nicht nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zu anderen Mausmodellen, die Cx26 Mutationen beispielsweise unter der Kontrolle des Keratin10 (K10) Promotors exprimieren (Bakirtzis et al., 2003), bietet die Cx26S17F-Mauslinie den Vorteil, dass sie die menschliche Situation so gut wie möglich nachahmt. Der K10 Promoter ist im Vergleich zum Cx26 Promotor wesentlich stärker, auch ist die Expression von K10 in der Haut viel weiter verbreitet. In gesunder Haut ist wtCx26 dagegen nur schwach exprimiert.

Die Expression der Cx26S17F Mutation führt nicht zur Bildung funktioneller Gap Junction Kanäle (Richard et al., 2002; Lee et al., 2009), so liegt die Vermutung nahe, dass Cx26S17F den auftretenden Phänotyp durch Inhibierung der Wildtyp-Connexine und/ oder eine veränderte Interaktion mit anderen nicht-Connexin Proteinen der Haut und des Innenohr verursacht. Die Cx26^{+S17F}-Mauslinie stellt damit ein geeignetes Modell zur tiefergehenden Untersuchung des dem KID Syndrom zugrundeliegenden Mechanismus dar.

5.1.3.3 Phänotypische Unterschiede der Cx26S17F Mutation aufgrund der Verwendung verschiedener Inzucht-Mausstämme

Die Hautanomalien, die auf die Expression der Cx26S17F Punktmutation zurückzuführen sind, treten bei Cx26^{+S17F}-Mäusen mit C57BL/6-Mausstammhintergrund stärker auf als in Cx26^{+S17F}-Mäusen mit 129Sv-Hintergrund. Cx26^{+S17F}-Mäuse (129Sv) zeigen nur eine leicht verdickte Epidermis (Daten nicht gezeigt) und eine Hyperkeratose der Pfoten; annuläre Einschnürungen des Schwanzes oder Verwundungen wurden nicht beobachtet. Auch die Expression der Proteine wtCx26, wtCx30, wtCx43, K1, K14 und PCNA ist in der Epidermis von Cx26^{+S17F}-Mäusen (129Sv) im Vergleich zu Cx26^{+/+}-Mäusen nur leicht erhöht (Abb. 4.32-4.33, vgl. F. Bosen, Diplomarbeit 2010). Die Betrachtung des Hörphänotyps hingegen ergibt ein ganz anderes Bild, hier ist die Beeinträchtigung des Hörvermögens der Cx26^{+S17F}-Mäuse (129Sv) ausgeprägter als die der Cx26^{+S17F}-Mäuse (C57BL/6). Diese phänotypischen Unterschiede zwischen verschiedenen Mausstämmen sind nicht ungewöhnlich. So wurden grundlegende metabolische und biochemische Unterschiede zwischen den Mausstämmen C57BL/6 und 129Sv gefunden (Champy et al., 2008), die durch den Einfluss sogenannter „Modifier“-Gene entstehen (Johnson et al., 2006). In dem vorliegenden Fall stellen die Cx26^{+S17F}-Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund ein besseres Modell der humanen KID Erkrankung dar, da sie sowohl einen ausgeprägten Haut- als auch Hörphänotyp vorweisen. Sie bieten daher die Möglichkeit, die Erkrankung in ihrer Gesamtheit zu untersuchen, wohingegen die Cx26^{+S17F}-Mäuse mit 129Sv Hintergrund nur die Untersuchung des Gehörphänotyps ermöglichen würden, da der Hautphänotyp nur schwach ausgeprägt ist.

5.2 Die Cx26floxDacZ[Cx32]-Mauslinie

Wie bereits in Abschnitt 1.6.2 der Einleitung beschrieben, ermöglicht eine Überexpression von Cx26 in Cx30^{-/-}-Mäusen durch Verwendung einer BAC^{Cx26}-Maus die Wiederherstellung des Hörvermögens sowie des endocochlearen Potentials (Ahmad et al., 2007). Eine Überexpression von Cx30 in Cx26^{Otog-Cre} reicht jedoch nicht aus, um das Fehlen von Cx26 auszugleichen. In Hepatozyten der Leber tritt Cx26 koexprimiert mit Cx32 auf, wobei Expressionsanalysen Cx32 defizienter Mäuse daraufhinweisen, dass die fehlende Expression von Cx32 zu einer Reduktion von Cx26 führt. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass Cx32 eine stabilisierende Wirkung auf Cx26 ausübt (Nelles et al., 1996). So sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob Cx32 Cx26 im Innenohr funktionell ersetzen kann. Für diese Untersuchungen wurde die Cx26floxDacZ[Cx32]-Mauslinie verwendet (vgl. Kapitel 4.4). In konditionalen Cx26 defizienten Mäusen (Cx26^{Otog-Cre}) führt die innenohrspezifische Deletion von Cx26 durch Verwendung der Otogelin (Otog) Cre-Rekombinase zu Taubheit (Cohen-Salmon et al., 2002). Der konditionale Ansatz wurde gewählt, um die embryonale Letalität, die mit einer vollständigen Cx26 Defizienz einhergeht, zu vermeiden. Cx26 defiziente Mäuse versterben an Tag 10.5 der Embryonalentwicklung aufgrund eines Plazentadefekts (Gabriel et al., 1998; Kibschull et al., 2008). Auch führt die ubiquitäre Expression von Cx32 anstelle von Cx26 zu Missbildungen (erste Missbildungen P13.5) wie Fehlen der Mandibula (Agnathie), kleinerer Wuchs, gestörte Ausbildungen des Gefäßsystems, Bildung von Ödemen und während dem weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung zu Lethalität (P18, N. Pielenticker, Doktorarbeit 2005; N. Dicke, Diplomarbeit 2006). So musste auch der Versuch einer Wiederherstellung des Hörsinns durch das Einbringen von Cx32 vor einem konditionalen Hintergrund stattfinden. Dazu wurden zunächst Mäuse erzeugt, in denen ein wtCx26-Allel durch das für die β -Galaktosidase kodierende Gen *LacZ* ersetzt wurde (Cx26^{floxLacZ[Cx32]}). Die für die β -Galaktosidase kodierende Region liegt flankiert von loxP-Elementen vor. In Mäusen dieses Genotyps konnte die Aktivität der β -Galaktosidase unter der Kontrolle des endogenen Cx26-Promotors in den Stützzellen des Corti Organs, den Fibrozyten des Spiral limb und des Spiral ligaments, sowie in den Basalzellen der Stria Vascularis gezeigt werden (vgl. Abb. 4.37 B). Die LacZ-Färbungen veranschaulichen auch die Aktivität der Otog-Cre-Rekombinase (vgl. Abb. 4.37 C). Nach der Deletion der, für die β -Galaktosidase kodierenden, *LacZ*-DNS beschränkt sich die LacZ-Färbung auf einige wenige Stützzellen und die Basalzellen der Stria vascularis. In den Zellen, in denen die Otog-Cre-Rekombinase aktiv war, wird nun Cx32 exprimiert. Die Expression von Cx32 konnte mittels Immunfluoreszenzanalysen in den Cochleae heterozygoter Mäuse (Cx26^{+/floxLacZ[Cx32]}:Otog-Cre und Cx26^{flox/floxLacZ[Cx32]}:Otog-Cre, vgl. Abb. 4.37) bestätigt werden. Eine vorläufige Quantifizierung der Connexinexpression

durch Immunoblotanalysen (Daten nicht gezeigt) weist daraufhin, dass die Deletion von Cx26 auf einem Allel auch zu einer verringerten Cx30 Expression führt. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass für eine aussagekräftige Quantifizierung eine Normalisierung auf Aktin, Tubulin oder GAPDH nicht durchgeführt wurde und in nachfolgenden Experimenten nachgeholt werden sollte. Eine Reduktion der Cx30 Expression aufgrund einer Cx26 Defizienz wurde in früheren Studien Cx26 defizienter organotypischer Cochleakulturen beobachtet (Ortolano et al., 2008). Als Ursache dafür postulierten die Autoren eine gegenseitige transkriptionelle Regulation von Cx26 und Cx30 in der Cochlea. Die Autoren stellten zudem die Hypothese auf, dass die transkriptionelle Regulation auf einen Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus zurückzuführen sei, der möglicherweise durch den NF- κ B-Signalweg kontrolliert wird. Denn die Aktivierung der IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Antwort bei Stimulation von P2Y-Rezeptoren mit 20 nM ATP führt in Cx30 defizienten organotypischen Cochleakulturen zu einer Erhöhung der Cx26 Transkription. Dieser Effekt konnte durch die Expression des I κ B Repressorproteins inhibiert werden, der die Aktivierung von NF- κ B verhindert.

Neben den Aussagen über das Expressionsniveau der Connexine Cx26 und Cx30 bestätigen die Immunoblotanalysen auch die Expression von Cx32 in der Cochlea der Mäuse, die zusätzlich zu dem $\text{Cx26}^{\text{floxDacZ}[\text{Cx32}]}$ Allel auch die Otog-Cre Rekombinase trugen.

Ein Vergleich der verschiedenen Genotypen durch Messung der Hörschwellen durch Ableitungen am Hirnstamm ergab, dass die Mäuse ($\text{Cx26}^{+/\text{floxDacZ}[\text{Cx32}]}$:Otog-Cre bzw. $\text{Cx26}^{\text{flox}/\text{flox}}:\text{Otog-Cre}$ Mäuse), die anstelle von Cx26 Cx32 exprimierten, eine deutliche Verbesserung und sogar eine Normalisierung der Hörschwellen im Vergleich zu den $\text{Cx26}^{\text{flox}/\text{flox}}:\text{Otog-Cre}$ Mäusen zeigten (Abb. 4.38). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass das Cx32 Protein in der Lage ist, Cx26 funktionell im Innenohr zu ersetzen. Vermutlich einhergehend mit einer Verhinderung der Apoptose der Haarsinnes- und Stützzellen des cortischen Organs, die in anderen Cx26 und Cx30 defizienten Mäusen sowie in Cx26R75W punktmutierten Mäusen beobachtet wurde (Cohen-Salmon et al., 2002; Teubner et al., 2003; Sun et al., 2009; Wang et al., 2009). Ein ubiquitärer Ersatz von Cx26 durch Cx32 ist wie bereits erwähnt aufgrund der Lethalität während der späten Embryonalentwicklung jedoch nicht möglich (vgl., N. Pielensticker, Doktorarbeit 2005 und N. Dicke, Diplomarbeit, 2006 und Doktorarbeit, noch nicht veröffentlicht).

Bis jetzt konnte noch nicht erklärt werden, durch welchen Mechanismus Cx32 Cx26 funktionell im Innenohr ersetzen, Cx30 den Cx26 Verlust jedoch nicht ausgleichen kann. Viele Studien beschreiben Cx26 und Cx30 heteromere Gap Junction Kanäle als essentiell für die Aufrechterhaltung der einzigartigen Bedingungen in der Cochlea (Ahmad et al., 2003; Sun et al., 2005; Yum et al., 2007). Cx26 bzw. Cx30 homomere Kanäle könnten diese

Bedingungen hingegen nicht gewährleisten, z. B. der schnellere Transfer von Ca^{2+} oder der Transfer von sekundären Botenstoffen wie IP_3 (Beltramello et al., 2005; Sun et al., 2005). Heteromere Cx32/Cx30- Kanäle könnten ähnliche Bedingungen schaffen wie Cx26/Cx30- Kanäle. Cx26- und Cx32- Kanäle ähneln sich in ihren Permeabilitätseigenschaften und erlauben ebenso wie Cx26-Kanäle den Transport von weit mehr Moleküle (cAMP, $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$) als Cx30-Kanäle. Eine genauere Untersuchung und der Vergleich der Permeabilitätseigenschaften der heteromeren Cx26/Cx30- bzw. Cx32/Cx30-Kanäle könnte Aufschluss darüber geben, warum Cx32 Cx26 im Innenohr der untersuchten Mäusen funktionell ersetzen kann.

6 Ausblick

6.1.1 Weitere Analysen der Cx30T5M-Mauslinie

Die Cx30T5M-Mauslinie wurde in der vorliegenden Arbeit ausführlich charakterisiert und eignet sich mit Einschränkung auch als Modell der menschlichen nicht-syndromischen Taubheit. Cx30^{T5M/T5M}-Mäuse zeigen nur einen milden Phänotyp, wohingegen die Taubheit in menschlichen Trägern der dominanten Mutation Cx30T5M deutlich ausgeprägter ist.

In Cx30^{-/-}-Mäusen führt die Überexpression von wtCx26 durch die Verwendung einer BAC^{Cx26}-Maus zu einer Wiederherstellung des Hörvermögens und des endocochlearen Potentials (Ahmad et al., 2007). Interessant wäre zu sehen, ob dies auch für die Cx30T5M-Mauslinie zutrifft. In Cx30^{-/-}-Mäusen fehlt das Cx30 Protein vollständig, in Cx30^{T5M/T5M}-Mäusen liegt es verändert vor, fehlt aber nicht. Das Cx30T5M-Protein könnte demnach die Expression des überexprimierten Cx26 Proteins trans-dominant beeinflussen und eine Verbesserung des Hörvermögens verhindern. Resultiert die Cx26 Überexpression aber in einer Verbesserung des Hörvermögens, liegt die Vermutung nahe, dass ein ähnlicher Mechanismus beiden Mausmodellen zugrunde liegt. Weiterhin wäre gezeigt, dass vor allem die Cx26 Expression, wie von Ahmad et al. (2007) postuliert, für den Erhalt der cochlearen Homeostase notwendig ist, nicht aber die Ausbildung heteromerer Cx26/Cx30-Kanäle.

6.1.2 Weitere Analysen der Cx30A88V-Mauslinie

In dieser Arbeit war aus zeitlichen Gründen das erneute Einbringen des Austauschvektors Cx30KiCx30A88V in ES-Zellen nicht möglich, jedoch wurde die Mauslinie während der Diplomarbeit von F. Bosen (2010) erfolgreich etabliert.

Nach Etablierung der Cx30A88V-Mauslinie sollte eine Grundcharakterisierung erfolgen. Dabei kann die Expression und zelluläre Lokalisation der Mutation durch das Reportergen *LacZ* in der Maus untersucht werden, z. B. in der Haut, dem Innenohr und dem Gehirn. Immunfluoreszenz- und Immunoblotanalysen durch Verwendung spezifischer Connexinantikörper erlauben die Untersuchung der zellulären Lokalisation und der Expressionsstärke. Auch die Untersuchung dominanter oder trans-dominanter Effekte auf Wildtyp-Connexine, wie z. B. wtCx30, wtCx26 und wtCx43, sind möglich.

Da die Cx30A88V Mutation zu hidrotischer ektodermaler Dysplasie führt, die in seltenen Fällen auch mit einer Einschränkung des Hörvermögens einhergeht, sollte für eine tiefere Untersuchung das Hauptaugenmerk auf die Organe Haut und Innenohr gelegt

werden. Histologische Analysen (z. B. Hämalaun/ Eosinfärbung) der Haut und des Innenohrs könnten zeigen, ob eine veränderte Morphologie vorliegt, z. B. Verdickungen der Epidermis.

Die Verwendung von Hautdifferenzierungs- und Proliferationsmarkern, z. B. K14, K1, Loricrin, Filaggrin, Ki67 oder PCNA würden Effekte der Mutation auf die Differenzierung und Proliferation der Keratinozyten in der Haut aufdecken. Auch die Untersuchung der Zelladhäsion und des „cornified envelope“ würden einen tiefergehenden Eindruck der Haut vermitteln. Die Analysen sollten zu verschiedenen Zeitpunkten der postnatalen Entwicklung durchgeführt werden. Die Charakterisierung neugeborener Tiere hätte den Vorteil, dass diese noch kein Fell ausgebildet haben und Veränderungen der Haut wie Rötungen oder Verdickungen einfacher erkannt werden können. Auch die Herstellung von Hautschnitten, vor allem des Rückens, wird durch das Fehlen des sonst, für einige Analysen (z.B. Lipidzusammensetzung), störenden Fells erleichtert. Neben der Charakterisierung neugeborener Mäuse ist aber auch eine Analyse anderer Entwicklungsstufen sinnvoll, vor allem da es sich beim Clouston Syndrom um eine sehr variable, teils sporadisch auftretende Erkrankung handelt (Lamartine et al., 2000). Eine Veränderung der Epidermis, die Proliferation, Differenzierung oder Zelladhäsion betrifft, wird möglicherweise erst im Alter sichtbar. Lohnenswert wäre möglicherweise auch die Untersuchung der Cx30A88V Mutation vor einem anderen Mausstammhintergrund (z. B. Balb C), da der Mausstammhintergrund die phänotypische Ausprägung der Mutation stark beeinflussen kann (vgl. Cx26S17F Mutation in dieser Arbeit, Johnson et al., 2006). Weiterführende Untersuchungen der Haut, die nach einer ersten Charakterisierung durchgeführt werden könnten, sind in Kap. 6.1.3 beschrieben.

Ein möglicher Hördefekt könnte durch Ableitungen der Hörschwellen am Hirnstamm (ABR, engl. auditory brainstem response analyses) analysiert werden. Da in Cx30T5M-Mäusen ein reduzierter Calcein- und Ca^{2+} -Transport beobachtet wurde, würden organotypische Cochleakulturen der Cx30A88V-Mäuse zeigen, ob dies ein genereller Mechanismus der durch Cx30 Mutationen erzeugten Hördefekte ist, oder ob im Fall der Cx30A88V Mutation ein anderer Mechanismus vorliegt.

Wie Analysen verschiedener mit Hautdefekten-assoziierte Cx26 Mutationen gezeigt haben, ist den meisten eine erhöhte Halbkanalaktivität gemeinsam (Lee et al., 2009). Ebenso wurde in Studien von INV-Cx26-Mäusen nachgewiesen, dass eine persistierende Cx26 Expression in diesen Tieren zu einer vermehrten Halbkanalaktivität führt, die durch die Inhibierung der terminalen Differenzierung eine Hyperkeratose zur Folge hat (Djalilian et al., 2006). Palmoplantare Keratoderma charakterisieren das Clouston Syndrom und in transfizierten HeLa-Zellen führt die Expression der Cx30A88V Mutation zu einer vermehrten

Halbkanalaktivität (Essenfelder et al., 2004). Die Messung der Halbkanalaktivität in organotypischen Cochleakulturen und Keratinozyten der Cx30A88V-Mäuse wäre somit lohnenswert, um herauszufinden, ob die vermehrte Ausbildung von Halbkanälen grundlegend für die Ausprägung des Clouston Syndroms ist.

Wie eine erst kürzlich veröffentlichte Studie der astrozytären Kopplung Cx30 defizienter Tiere zeigte, haben Cx30 Gap Junction Kanäle einen großen Anteil an der interastrozytären Kommunikation innerhalb des Hippocampus (Gosejacob et al., 2011). Die in dieser Arbeit beschriebenen Cx30 Punktmutationen unterscheiden sich in Zellkulturstudien hinsichtlich ihrer Eigenschaften. Die Mutation Cx30T5M führt zu einer Reduktion der biochemischen Kopplung (vgl. Kap. 4.1 und 5.1), während die Mutation Cx30A88V in einer vermehrten Freisetzung von ATP durch eine erhöhte Halbkanalaktivität resultiert (Essenfelder et al., 2004). Somit könnten Kopplungsanalysen der Cx30T5M- und Cx30A88V-Mauslinien sowie die Untersuchung eines möglichen trans-dominanten Effekts auf die Expression und Funktion anderer im Gehirn exprimierter Connexine, wie Cx47, Cx43 und Cx32, einen tiefergehenden Einblick in die Funktion von wtCx30 in Astrozyten ermöglichen.

Die erzeugte Cx30A88V-Mauslinie könnte zu einem besseren Verständnis des Clouston Syndroms und seiner Ursachen beitragen. Doch erst eine genaue Charakterisierung der Cx30A88V-Mauslinie wird zeigen, ob diese das Krankheitsbild des Menschen nachahmt und sich so als Modell eignet.

6.1.3 Weitere Analysen der Cx26S17F-Mauslinie

In dieser Arbeit wurde die Cx26S17F-Mauslinie hinsichtlich ihres Hör- und Hautphänotyps charakterisiert. Jedoch bleibt der Mechanismus, der zu der Ausprägung des KID-Syndroms führt, weitgehend ungeklärt. Eine tiefergehende Charakterisierung des Hautphänotyps der Cx26^{+S17F}-Mäuse könnte durch weitere Expressionsanalysen verschiedener epidermaler Marker erfolgen. Der Defekt der epidermalen Permeabilitätsbarriere und der gestörten Abschuppung sind möglicherweise in einer Missbildung des „cornified envelopes“ zu suchen. So wäre die Expressionsanalyse des Matrixproteins Filaggrin lohnenswert. Bei der voranschreitenden Differenzierung bündelt Filaggrin die Keratinozyten zu stark abgeflachten Zellen, die charakteristisch für die Korneozyten des Stratum corneums sind. Die Bedeutung von Filaggrin für das Gleichgewicht der Haut zeigt sich auch in Filaggrinmutationen, die im Menschen die Erkrankungen Ichthyosis vulgaris und atopische Dermatitis verursacht. In der Maus konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Überexpression von Filaggrin eine verlangsamte Wiederherstellung der Hautbarriere nach sich zieht. Das Fehlen von Filaggrin führt in der Maus zu trockener, schuppiger Haut und annulären Einschnürungen des

Schwanzes und der Pfoten (zusammengefasst in Proksch et al., 2008). Die Auswirkungen des Fehlens von Filaggrin ähneln dem Phänotyp der Cx26S17F-Mäuse.

An der Ausbildung des „cornified envelopes“ sind auch maßgeblich Transaminoglutaminasen beteiligt, die Proteine wie Involucrin und Loricrin quervernetzen. Die Funktion der Transaminoglutaminasen ist vermutlich Ca^{2+} -abhängig. Ca^{2+} spielt zudem eine zentrale Rolle während der Differenzierung der Keratinozyten und ist essentiell für die epidermale Proteinsynthese und Zelladhäsion (Proksch et al., 2008). Eine veränderte Ca^{2+} -Konzentration in der Epidermis – durch die veränderten Permeabilitätseigenschaften der Cx26S17F Mutation – könnte die Differenzierung, die Zelladhäsion und die Funktion der epidermalen Proteine beeinflussen und so die Bildung und Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere verhindern.

An der Ausbildung der epidermalen Permeabilitätsbarriere sind neben den genannten Proteinen des „cornified envelopes“ auch verschiedene Lipide beteiligt. Eine Veränderung in der Lipidzusammensetzung könnte mittels Dünnschichtchromatographien ermittelt werden.

Menschen, die an der letalen Form des KID-Syndroms leiden, versterben in den ersten Monaten nach der Geburt aufgrund einer sich wiederholenden unkontrollierbaren Sepsis. Die Ursache dafür liegt vermutlich in einer defekten epidermalen Barriere, die eine primäre Immundefizienz zur Folge hat sowie das Eindringen von Mikroorganismen erleichtert (Sbidian et al., 2010). In einigen P1-P4 Cx26^{+/S17F}-Mäusen konnte eine verminderte Ausbildung der Permeabilitätsbarriere durch Toluidinblaupenetration nachgewiesen werden. Nun stellt sich die Frage, ob diese Mäuse aufgrund eines erhöhten Wasserverlustes versterben oder womöglich durch Infektionen, die durch eine Immundefizienz und das vereinfachte Eindringen von Mikroorganismen verursacht werden. Um der Ursache auf den Grund zu gehen, könnte die Expression epidermaler Cytokine untersucht werden. Die Cytokine Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor (TNF) und IL-6 werden nach einer akuten Störung der Permeabilitätsbarriere hochreguliert. Ein Fehlen der genannten Cytokine resultiert in einer verspäteten Ausbildung der Permeabilitätsbarriere (Jensen et al., 1999; Wang et al., 2004). Die Hochregulation der Cytokine ist demnach notwendig, um nach einer Störung der epidermalen Permeabilitätsbarriere eine schnelle Regeneration zu gewährleisten. Geschieht dies nicht, führt eine andauernde Hochregulation der Cytokine zu Entzündungsreaktionen und erhöhter epidermaler Proliferation. In TNF-Rezeptor 1-defizienten Mäusen war zudem die Synthese, der für die Bildung der epidermalen Barriere, notwendigen Lipide verspätet und die Funktion der Sphingomyelinase reduziert, die Ceramide für die Bildung der Permeabilitätsbarriere bereitstellt (Jensen et al., 1999).

Um die Eigenschaften der Cx26S17F Mutation in der Haut detaillierter zu charakterisieren, wäre die Untersuchung primärer Keratinozytenkulturen aus den Cx26^{+/-}- und Cx26^{+/S17F}-Mäusen möglich. Der Vorteil gegenüber den schon durchgeführten Analysen in transfizierten HeLa-Zellen und *Xenopus laevis* Oozyten (Richard et al., 2002; Lee et al., 2009) wäre, dass neben dem veränderten Cx26S17F-Protein auch andere epidermale Proteine exprimiert werden.

Neben einer Charakterisierung des Hautphänotyps könnte auch der Hörphänotyp weiterführend analysiert werden. In organotypischen Cochleakulturen fünf Tage alter Cx30^{T5M/T5M}-Mäuse wurde eine Reduktion des Calceintransfers und der spontanen Ca²⁺-Freisetzung in den inneren und äußeren Sulcuszellen festgestellt. Zudem konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen defizienten Mäusen als Antwort auf eine P2Y/PLC/IP₃/Ca²⁺ Signalkaskade, Cx26 und Cx30 Halbkanäle die Freisetzung von ATP aus den Stütz- und Epithelzellen der Cochlea vermitteln (Anselmi et al., 2008). Gap Junction Vollkanäle erlauben hingegen die Diffusion von Sekundärbotenstoffen, wie IP₃. Die Untersuchung Cx26^{+/S17F} organotypischer Cochleakulturen würde zeigen, ob der Ca²⁺- und/ oder der IP₃-Transfer auch in diesen Mäusen gestört ist und zu einer Erhöhung der Hörschwellen sowie einer Reduzierung des endocochlearen Potentials führt.

Zudem könnte ein Vergleich der Cx26S17F-Mauslinie (nicht-funktioneller Kanal, aber Protein wird noch exprimiert) mit der Cx26floxLacZ[Cx32]- und der konditionalen Cx26 defizienten Mauslinie durch die Verwendung verschiedener Cre-Mauslinien (z. B. K5-, K14-, Tie2-Cre) zu einem tieferen Verständnis der Aufgaben von Cx26 während der epidermalen Entwicklung sowie der Lymphangiogenese führen.

Um zu verdeutlichen, dass der Phänotyp nicht auf einer generellen Reduktion der Connexinexpression in der Cochlea bzw. der Haut zurückzuführen ist, wäre die Erzeugung einer Cx26^{+/-}, Cx30^{+/-}-Mauslinie denkbar. Die Untersuchung des Gehörs und der Haut dieser doppelt-heterozygoten wtCx26/wtCx30-Mauslinie würde zeigen, ob der beschriebene Gehör- und Hautphänotyp der Cx30T5M- und Cx26S17F-Mauslinien allein auf die Expression der jeweiligen Mutation zurückzuführen ist.

Die erzeugten Cx26S17F-Mäuse könnten nach einer ausführlichen Charakterisierung zur Aufklärung der dem KID Syndrom zugrundeliegenden Mechanismen führen und möglicherweise Hinweise auf therapeutische Anwendungen geben.

6.1.4 Weiterführende Analysen der Cx26floxLacZ[Cx32]-Mauslinie

Die funktionelle Analyse der Cx26floxLacZ[Cx32]-Mauslinie zeigt, dass Cx26 funktionell durch Cx32 in der Cochlea ersetzt werden kann. Der Austausch von Cx26 durch Cx32 führt dabei zu einer Wiederherstellung des Hörvermögens in Cx26^{flox/floxLacZ[Cx32]}:Otog-Cre-Mäusen. Der Mechanismus, durch den Cx32 in der Lage ist, Cx26 im Innenohr zu ersetzen, Cx30 jedoch nicht (Lin et al., 2009), ist bis jetzt ungeklärt. Vermutlich liegt die Ursache in der Ausbildung heteromerer Cx32/Cx30-Kanäle, die sich in ihren Eigenschaften von denen homomerer Kanäle unterscheiden. Für Cx26/Cx30 heteromere Kanäle wurde dies ausführlich in verschiedenen Studien bestätigt (Sun et al., 2005; Zhang et al., 2005; Yum et al., 2007), auch die Notwendigkeit der Bildung heteromer Kanäle für den Erhalt der cochlearen Homeostase wurde belegt (Zhang et al., 2005; Ortolano et al., 2008). Die Permeabilitätseigenschaften von Cx32/Cx30 Gap Junction Kanälen wurden jedoch nicht im Detail untersucht. Kopplungsanalysen, z. B. der Transport von Ca²⁺ und IP₃, in organotypischen Cochleakulturen der Cx26^{loxP/loxP}:Otog-Cre-, Cx26^{+floxLacZ[Cx32]}:Otog-Cre- und Cx26^{flox/floxLacZ[Cx32]}:Otog-Cre-Mäuse könnten Aufschluss über die Eigenschaften dieser heteromeren Cx32/Cx30-Kanäle geben. Auch wären Rückschlüsse möglich warum Cx32 zwar in der Lage ist Cx26 im Innenohr funktionell zu ersetzen, aber nicht in anderen Organen.

In konditionalen Cx26 und nicht-konditionalen Cx30 defizienten Mäusen wurde die Apoptose der Stütz- und Haarsinneszellen des cortischen Organs beobachtet (Cohen-Salmon et al., 2002; Teubner et al., 2003; Sun et al., 2009; Wang et al., 2009). Für die Cx26^{+floxLacZ[Cx32]}:Otog-Cre- und Cx26^{flox/floxLacZ[Cx32]}:Otog-Cre-Mäuse konnte das Ausbleiben des Zelltods im cortischen Organ bis jetzt nur indirekt gezeigt werden. Die Messungen der Hörschwellen durch Ableitungen am Hirnstamm bestätigen die Funktion der Cochlea. Bei einer Apoptose der Stütz- und Haarsinneszellen wäre die Reizweiterleitung in der Cochlea unterbrochen und das endocochleare Potential deutlich reduziert. Die Folge wäre eine Erhöhung der Hörschwellen. Um ein Ausbleiben der Apoptose im cortischen Organ direkt nachzuweisen, könnten TUNNEL-Assays durchgeführt werden, die Auskunft über das Vorkommen apoptotischer Zellen und ihrer Lokalisation im Organ geben. Eine allgemeine Erhöhung der Apoptose in der Cochlea könnte auch durch Immunoblotanalysen mit gegen Caspase 3 gerichteten Antikörpern gezeigt werden.

7 Zusammenfassung

Cx26 und Cx30 Mutationen gehören zu den häufigsten Ursachen für syndromische und nicht-syndromische Taubheit im Menschen. In der vorliegenden Arbeit wurde die mit nicht-syndromischer Taubheit-assoziierte Mutation Cx30T5M durch homologe Rekombination in embryonale Stammzellen der Maus eingebracht. Die Hörschwellen der Cx30^{T5M/T5M}-Mäuse sind im Gegensatz zu Cx30^{+/T5M}-Mäusen signifikant um 15 dB in allen Frequenzen erhöht. Das endocochleare Potential der Cx30^{T5M/T5M}-Mäuse ist hierbei nicht verändert. Immunfluoreszenzanalysen bestätigen die normale Lokalisierung des Cx30T5M-Proteins in der Cochlea und seine Koexpression mit wtCx26. Jedoch zeigen quantitative Immunoblotanalysen der Cochlea eine Reduktion der Expressionsstärke der untersuchten Connexine. Begleitet wird die reduzierte Connexinexpression durch einen verminderten Calceintransfer und eine verminderte spontane Ca²⁺-Aktivität in P5 organotypischen Cochleakulturen. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass eine Beeinträchtigung der biochemischen Kopplung durch Gap Junction Kanäle zu Hördefekten in Mensch und Maus führen kann. Eine Schlüsselrolle spielt dabei vermutlich die reduzierte Ca²⁺-Aktivität während der postnatalen Entwicklung der Cochlea.

Außerdem wurde die Cx26S17F Mutation, die im Menschen das Keratitits-Ichthyosis-Taubheitssyndrom verursacht, in konditionalen Cx26S17F-Mäusen untersucht. Cx26^{S17F/S17F}-Mäuse sind nicht lebensfähig, während Cx26^{+/S17F}-Tiere aufgrund eines milden Defekts der epidermalen Barriere in kleinerer Anzahl als der zu erwartenden geboren werden. Die Ausprägung der Cx26S17F Mutation resultiert in der Epidermis in einer veränderten Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten, die zu einer Verdickung der suprabasalen Schichten führt. Zudem wurden verwundete Schwänze und annuläre Einschnürungen beobachtet. Analysen der Cx26^{+/S17F}-Mäuse durch Ableitungen am Hirnstamm zeigen eine Erhöhung der Hörschwellen um 35 dB in allen Frequenzen, die einhergeht mit einer Reduktion des endocochlearen Potentials um 20-40%. Im Innenohr führt die reduzierte Kopplung durch Cx26S17F/wtCx30 und Cx26S17F/wtCx26 heteromere Gap Junction Kanäle zu einer Beeinträchtigung des Hörvermögens, während die verbleibenden wtCx26/wtCx30-Kanäle möglicherweise ausreichend sind, um eine Restfunktion der Cochlea aufrechtzuerhalten. Der Phänotyp der Cx26S17F-Mäuse gleicht in vielerlei Hinsicht den Symptomen des humanen KID Syndroms, so stellt diese Mauslinie ein geeignetes Modell dar, um die Mechanismen der Erkrankung *in vivo* zu untersuchen.

Neben der genannten Erzeugung eines Cx30T5M-Austauschvektors wurde ein weiterer Austauschvektor erzeugt, der nach erfolgter homologer Rekombination in embryonalen

Stammzellen der Maus zur Expression der humanen Cx30A88V Mutation führt. Diese Mutation ist im Menschen mit dem Clouston Syndrom (HED, Hidrotic ectodermal dysplasia) assoziiert.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Projekten wurde untersucht, inwieweit wtCx32 das wtCx26-Protein im Innenohr der Maus funktionell ersetzen kann. Ein funktioneller Ersatz des wtCx26-Proteins durch wtCx32 und damit das Wiedererlangen des Hörvermögens konnte in Cx26 defizienten Tieren durch Messungen der Hörschwellen bestätigt werden.

8 Literaturverzeichnis

- Aasen, T. and Kelsell, D.P. (2008). Connexins in Skin Biology. Connexins: A Guide. Harris, A.L. and Locke, D. New York, Humana Press Inc: 307-321.
- Ahmad, S., Chen, S., Sun, J. and Lin, X. (2003). "Connexins 26 and 30 are co-assembled to form gap junctions in the cochlea of mice." Biochem Biophys Res Commun **307**(2): 362-368.
- Ahmad, S., Tang, W., Chang, Q., Qu, Y., Hibshman, J., Li, Y., Sohl, G., Willecke, K., Chen, P. and Lin, X. (2007). "Restoration of connexin26 protein level in the cochlea completely rescues hearing in a mouse model of human connexin30-linked deafness." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(4): 1337-1341.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2004). Molecular Biology of the Cell. Weinheim, WILEY-VCH Verlag.
- Anselmi, F., Hernandez, V.H., Crispino, G., Seydel, A., Ortolano, S., Roper, S.D., Kessar, N., Richardson, W., Rickheit, G., Filippov, M.A., Monyer, H. and Mammano, F. (2008). "ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca²⁺ signals across the inner ear." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(48): 18770-18775.
- Anzini, P., Neubergh, D.H., Schachner, M., Nelles, E., Willecke, K., Zielasek, J., Toyka, K.V., Suter, U. and Martini, R. (1997). "Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32." J Neurosci **17**(12): 4545-4551.
- Bakirtzis, G., Choudhry, R., Aasen, T., Shore, L., Brown, K., Bryson, S., Forrow, S., Tetley, L., Finbow, M., Greenhalgh, D. and Hodgins, M. (2003). "Targeted epidermal expression of mutant Connexin 26(D66H) mimics true Vohwinkel syndrome and provides a model for the pathogenesis of dominant connexin disorders." Hum Mol Genet **12**(14): 1737-1744.
- Barbe, M.T., Monyer, H. and Bruzzone, R. (2006). "Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels." Physiology (Bethesda) **21**: 103-114.
- Bedner, P., Niessen, H., Odermatt, B., Kretz, M., Willecke, K. and Harz, H. (2006). "Selective permeability of different connexin channels to the second messenger cyclic AMP." J Biol Chem **281**(10): 6673-6681.
- Behne, M.J., Meyer, J.W., Hanson, K.M., Barry, N.P., Murata, S., Crumrine, D., Clegg, R.W., Gratton, E., Holleran, W.M., Elias, P.M. and Mauro, T.M. (2002). "NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis. Microenvironment acidification assessed with fluorescence lifetime imaging." J Biol Chem **277**(49): 47399-47406.

- Beltramello, M., Bicego, M., Piazza, V., Ciubotaru, C.D., Mammano, F. and D'Andrea, P. (2003). "Permeability and gating properties of human connexins 26 and 30 expressed in HeLa cells." Biochem Biophys Res Commun **305**(4): 1024-1033.
- Beltramello, M., Piazza, V., Bukauskas, F.F., Pozzan, T. and Mammano, F. (2005). "Impaired permeability to Ins(1,4,5)P3 in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness." Nat Cell Biol **7**(1): 63-69.
- Bennett, M.V. (1994). "Connexins in disease." Nature **368**(6466): 18-19.
- Bennett, M.V., Contreras, J.E., Bukauskas, F.F. and Saez, J.C. (2003). "New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate." Trends Neurosci **26**(11): 610-617.
- Bergoffen, J., Scherer, S.S., Wang, S., Scott, M.O., Bone, L.J., Paul, D.L., Chen, K., Lensch, M.W., Chance, P.F. and Fischbeck, K.H. (1993). "Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease." Science **262**(5142): 2039-2042.
- Beyer, E.C., Goodenough, D.A. and Paul, D.L. (1988). The connexins, a family of related gap junction proteins. In: Gap Junctions. New York, Springer Verlag.
- Bittman, K., Becker, D.L., Cicirata, F. and Parnavelas, J.G. (2002). "Connexin expression in homotypic and heterotypic cell coupling in the developing cerebral cortex." J Comp Neurol **443**(3): 201-212.
- Bosher, S.K. and Warren, R.L. (1978). "Very low calcium content of cochlear endolymph, an extracellular fluid." Nature **273**(5661): 377-378.
- Bruzzone, R., Barbe, M.T., Jakob, N.J. and Monyer, H. (2005). "Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes." J Neurochem **92**(5): 1033-1043.
- Bruzzone, R. and Cohen-Salmon, M. (2005). "[Ins(1,4,5)P3: a messenger for hearing]." Med Sci (Paris) **21**(6-7): 585-588.
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S.G., Barbe, M.T., Herb, A. and Monyer, H. (2003). "Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13644-13649.
- Bruzzone, R., White, T.W. and Goodenough, D.A. (1996). "The cellular Internet: on-line with connexins." Bioessays **18**(9): 709-718.
- Buchholz, F., Angrand, P.O. and Stewart, A.F. (1996). "A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs." Nucleic Acids Res **24**(15): 3118-3119.
- Bullock, W., Fernandez, J. and Short, J. (1987). "XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection." Biotechniques **5**(4): 376-379.

- Butterweck, A., Elfgang, C., Willecke, K. and Traub, O. (1994). "Differential expression of the gap junction proteins connexin45, -43, -40, -31, and -26 in mouse skin." Eur J Cell Biol **65**(1): 152-163.
- Candi, E., Schmidt, R. and Melino, G. (2005). "The cornified envelope: a model of cell death in the skin." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(4): 328-340.
- Champy, M.F., Selloum, M., Zeitler, V., Caradec, C., Jung, B., Rousseau, S., Pouilly, L., Sorg, T. and Auwerx, J. (2008). "Genetic background determines metabolic phenotypes in the mouse." Mamm Genome **19**(5): 318-331.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- Cohen-Salmon, M., El-Amraoui, A., Leibovici, M. and Petit, C. (1997). "Otogelin: a glycoprotein specific to the acellular membranes of the inner ear." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14450-14455.
- Cohen-Salmon, M., Maxeiner, S., Kruger, O., Theis, M., Willecke, K. and Petit, C. (2004). "Expression of the connexin43- and connexin45-encoding genes in the developing and mature mouse inner ear." Cell Tissue Res **316**(1): 15-22.
- Cohen-Salmon, M., Ott, T., Michel, V., Hardelin, J.P., Perfettini, I., Eybalin, M., Wu, T., Marcus, D.C., Wangemann, P., Willecke, K. and Petit, C. (2002). "Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death." Curr Biol **12**(13): 1106-1111.
- Common, J.E., Becker, D., Di, W.L., Leigh, I.M., O'Toole, E.A. and Kelsell, D.P. (2002). "Functional studies of human skin disease- and deafness-associated connexin 30 mutations." Biochem Biophys Res Commun **298**(5): 651-656.
- Coulombe, P.A. (2003). "Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery." J Invest Dermatol **121**(2): 219-230.
- Cruciani, V. and Mikalsen, S.O. (2002). "Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases." Biol Cell **94**(7-8): 433-443.
- Cruciani, V. and Mikalsen, S.O. (2007). "Evolutionary selection pressure and family relationships among connexin genes." Biol Chem **388**(3): 253-264.
- D'Hondt, C., Ponsaerts, R., De Smedt, H., Bultynck, G. and Himpens, B. (2009). "Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions?" Bioessays **31**(9): 953-974.
- Dahl, E., Manthey, D., Chen, Y., Schwarz, H.J., Chang, Y.S., Lalley, P.A., Nicholson, B.J. and Willecke, K. (1996). "Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin." J Biol Chem **271**(30): 17903-17910.

- Delmar, M., Coombs, W., Sorgen, P., Duffy, H.S. and Taffet, S.M. (2004). "Structural bases for the chemical regulation of Connexin43 channels." Cardiovasc Res **62**(2): 268-275.
- Dermietzel, R., Traub, O., Hwang, T.K., Beyer, E., Bennett, M.V., Spray, D.C. and Willecke, K. (1989). "Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(24): 10148-10152.
- Di, W.L., Common, J.E. and Kelsell, D.P. (2001a). "Connexin 26 expression and mutation analysis in epidermal disease." Cell Commun Adhes **8**(4-6): 415-418.
- Di, W.L., Rugg, E.L., Leigh, I.M. and Kelsell, D.P. (2001b). "Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31." J Invest Dermatol **117**(4): 958-964.
- Djalilian, A.R., McGaughey, D., Patel, S., Seo, E.Y., Yang, C., Cheng, J., Tomic, M., Sinha, S., Ishida-Yamamoto, A. and Segre, J.A. (2006). "Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and promotes psoriasiform response." J Clin Invest **116**(5): 1243-1253.
- Dobrowolski, R., Sommershof, A. and Willecke, K. (2007). "Some oculodentodigital dysplasia-associated Cx43 mutations cause increased hemichannel activity in addition to deficient gap junction channels." J Membr Biol **219**(1-3): 9-17.
- Dobrowolski, R. and Willecke, K. (2009). "Connexin-caused genetic diseases and corresponding mouse models." Antioxid Redox Signal **11**(2): 283-295.
- Eckardt, D., Theis, M., Doring, B., Speidel, D., Willecke, K. and Ott, T. (2004). "Spontaneous ectopic recombination in cell-type-specific Cre mice removes loxP-flanked marker cassettes in vivo." Genesis **38**(4): 159-165.
- Eiberger, J., Kibschull, M., Strenzke, N., Schober, A., Bussow, H., Wessig, C., Djahed, S., Reucher, H., Koch, D.A., Lautermann, J., Moser, T., Winterhager, E. and Willecke, K. (2006). "Expression pattern and functional characterization of connexin29 in transgenic mice." Glia **53**(6): 601-611.
- Elias, P.M., Crumrine, D., Rassner, U., Hachem, J.P., Menon, G.K., Man, W., Choy, M.H., Leypoldt, L., Feingold, K.R. and Williams, M.L. (2004). "Basis for abnormal desquamation and permeability barrier dysfunction in RXLI." J Invest Dermatol **122**(2): 314-319.
- Essenfelder, G.M., Bruzzone, R., Lamartine, J., Charollais, A., Blanchet-Bardon, C., Barbe, M.T., Meda, P. and Waksman, G. (2004). "Connexin30 mutations responsible for hidrotic ectodermal dysplasia cause abnormal hemichannel activity." Hum Mol Genet **13**(16): 1703-1714.
- Essenfelder, G.M., Larderet, G., Waksman, G. and Lamartine, J. (2005). "Gene structure and promoter analysis of the human GJB6 gene encoding connexin 30." Gene **350**(1): 33-40.

- Evans, M.J. and Kaufman, M.H. (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-156.
- Evans, W.H., Ahmad, S., Diez, J., George, C.H., Kendall, J.M. and Martin, P.E. (1999). "Trafficking pathways leading to the formation of gap junctions." Novartis Found Symp **219**: 44-54; discussion 54-49.
- Falk, M.M. (2000). "Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels." Eur J Cell Biol **79**(8): 564-574.
- Falk, M.M., Buehler, L.K., Kumar, N.M. and Gilula, N.B. (1997). "Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels." EMBO J **16**(10): 2703-2716.
- Filippov, M.A., Hormuzdi, S.G., Fuchs, E.C. and Monyer, H. (2003). "A reporter allele for investigating connexin 26 gene expression in the mouse brain." Eur J Neurosci **18**(12): 3183-3192.
- Forge, A., Becker, D., Casalotti, S., Edwards, J., Marziano, N. and Nevill, G. (2003). "Gap junctions in the inner ear: comparison of distribution patterns in different vertebrates and assesment of connexin composition in mammals." J Comp Neurol **467**(2): 207-231.
- Gabriel, H.D., Jung, D., Bützler, C., Temme, A., Traub, O., Winterhager, E. and Willecke, K. (1998). "Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice." J Cell Biol **140**(6): 1453-1461.
- Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., Sosinsky, G.E., Tsien, R.Y. and Ellisman, M.H. (2002). "Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking." Science **296**(5567): 503-507.
- George, C.H., Kendall, J.M. and Evans, W.H. (1999). "Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexins into gap junctions." J Biol Chem **274**(13): 8678-8685.
- Giepmans, B.N., Verlaan, I., Hengeveld, T., Janssen, H., Calafat, J., Falk, M.M. and Moolenaar, W.H. (2001). "Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules." Curr Biol **11**(17): 1364-1368.
- Goodenough, D.A. and Paul, D.L. (2003). "Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(4): 285-294.
- Gosejacob, D., Dublin, P., Bedner, P., Huttmann, K., Zhang, J., Tress, O., Willecke, K., Pfrieger, F., Steinhauser, C. and Theis, M. (2011). "Role of astroglial connexin30 in hippocampal gap junction coupling." Glia **59**(3): 511-519.
- Grifa, A., Wagner, C.A., D'Ambrosio, L., Melchionda, S., Bernardi, F., Lopez-Bigas, N., Rabionet, R., Arbones, M., Monica, M.D., Estivill, X., Zelante, L., Lang, F. and Gasparini, P. (1999). "Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus." Nat Genet **23**(1): 16-18.

- Hardman, M.J., Sisi, P., Banbury, D.N. and Byrne, C. (1998). "Patterned acquisition of skin barrier function during development." Development **125**(8): 1541-1552.
- Harris, A.L. (2007). "Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules." Prog Biophys Mol Biol **94**(1-2): 120-143.
- Hennemann, H., Kozjek, G., Dahl, E., Nicholson, B. and Willecke, K. (1992). "Molecular cloning of mouse connexins26 and -32: similar genomic organization but distinct promoter sequences of two gap junction genes." Eur J Cell Biol **58**(1): 81-89.
- Hernandez, V.H., Bortolozzi, M., Pertegato, V., Beltramello, M., Giarin, M., Zaccolo, M., Pantano, S. and Mammano, F. (2007). "Unitary permeability of gap junction channels to second messengers measured by FRET microscopy." Nat Methods **4**(4): 353-358.
- Hibino, H. and Kurachi, Y. (2006). "Molecular and physiological bases of the K⁺ circulation in the mammalian inner ear." Physiology (Bethesda) **21**: 336-345.
- Hoess, R.H. and Abremski, K. (1984). "Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(4): 1026-1029.
- Hombach, S., Janssen-Bienhold, U., Sohl, G., Schubert, T., Bussow, H., Ott, T., Weiler, R. and Willecke, K. (2004). "Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina." Eur J Neurosci **19**(10): 2633-2640.
- Iamaroon, A., Khemaleelakul, U., Pongsiriwet, S. and Pintong, J. (2004). "Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma." J Oral Pathol Med **33**(1): 30-36.
- Jagger, D.J. and Forge, A. (2006). "Compartmentalized and signal-selective gap junctional coupling in the hearing cochlea." J Neurosci **26**(4): 1260-1268.
- Jensen, J.M., Schutze, S., Forl, M., Kronke, M. and Proksch, E. (1999). "Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier." J Clin Invest **104**(12): 1761-1770.
- Jiang, J.X. and Goodenough, D.A. (1996). "Heteromeric connexons in lens gap junction channels." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(3): 1287-1291.
- Johnson, K.R., Zheng, Q.Y. and Noben-Trauth, K. (2006). "Strain background effects and genetic modifiers of hearing in mice." Brain Res **1091**(1): 79-88.
- Kandel, A., Bragin, A., Carpi, D. and Buzsaki, G. (1996). "Lack of hippocampal involvement in a rat model of petit mal epilepsy." Epilepsy Res **23**(2): 123-127.
- Kessel, R.G. and Kardon, R.H. (1979). "The shape, polarization, and innervation of sensory hair cells in the guinea pig crista ampullaris and macula utriculi." Scan Electron Microsc(3): 967-974, 962.
- Kibschull, M., Gellhaus, A. and Winterhager, E. (2008). "Analogous and unique functions of connexins in mouse and human placental development." Placenta **29**(10): 848-854.

- Kierszenbaum, A.L. (2002). Histology and Cell Biology: an Introduction to Pathology. St. Louis, Mosby, Inc.
- Kikuchi, T., Adams, J.C., Miyabe, Y., So, E. and Kobayashi, T. (2000). "Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness." Med Electron Microsc **33**(2): 51-56.
- Kikuchi, T., Kimura, R.S., Paul, D.L. and Adams, J.C. (1995). "Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis." Anat Embryol (Berl) **191**(2): 101-118.
- Kretz, M., Euwens, C., Hombach, S., Eckardt, D., Teubner, B., Traub, O., Willecke, K. and Ott, T. (2003). "Altered connexin expression and wound healing in the epidermis of connexin-deficient mice." J Cell Sci **116**(Pt 16): 3443-3452.
- Kretz, M., Maass, K. and Willecke, K. (2004). "Expression and function of connexins in the epidermis, analyzed with transgenic mouse mutants." Eur J Cell Biol **83**(11-12): 647-654.
- Krutovskikh, V. and Yamasaki, H. (2000). "Connexin gene mutations in human genetic diseases." Mutat Res **462**(2-3): 197-207.
- Krysko, D.V., Leybaert, L., Vandenabeele, P. and D'Herde, K. (2005). "Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals." Apoptosis **10**(3): 459-469.
- Labarthe, M.P., Bosco, D., Saurat, J.H., Meda, P. and Salomon, D. (1998). "Upregulation of connexin 26 between keratinocytes of psoriatic lesions." J Invest Dermatol **111**(1): 72-76.
- Laird, D.W. (2006). "Life cycle of connexins in health and disease." Biochem J **394**(Pt 3): 527-543.
- Lallemand, Y., Luria, V., Haffner-Krausz, R. and Lonai, P. (1998). "Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase." Transgenic Res **7**(2): 105-112.
- Lamartine, J., Munhoz Essenfelder, G., Kibar, Z., Lanneluc, I., Callouet, E., Laoudj, D., Lemaitre, G., Hand, C., Hayflick, S.J., Zonana, J., Antonarakis, S., Radhakrishna, U., Kelsell, D.P., Christianson, A.L., Pitaval, A., Der Kaloustian, V., Fraser, C., Blanchet-Bardon, C., Rouleau, G.A. and Waksman, G. (2000). "Mutations in GJB6 cause hidrotic ectodermal dysplasia." Nat Genet **26**(2): 142-144.
- Landisman, C.E., Long, M.A., Beierlein, M., Deans, M.R., Paul, D.L. and Connors, B.W. (2002). "Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus." J Neurosci **22**(3): 1002-1009.
- Lang, H., Jyothi, V., Smythe, N.M., Dubno, J.R., Schulte, B.A. and Schmiedt, R.A. (2010). "Chronic Reduction of Endocochlear Potential Reduces Auditory Nerve Activity: Further Confirmation of an Animal Model of Metabolic Presbycusis." J Assoc Res Otolaryngol.

- Lautermann, J., Frank, H.G., Jahnke, K., Traub, O. and Winterhager, E. (1999). "Developmental expression patterns of connexin26 and -30 in the rat cochlea." Dev Genet **25**(4): 306-311.
- Lee, J.R., Derosa, A.M. and White, T.W. (2009). "Connexin mutations causing skin disease and deafness increase hemichannel activity and cell death when expressed in *Xenopus* oocytes." J Invest Dermatol **129**(4): 870-878.
- Lee, M.J. and Rhee, S.K. (1998). "Heteromeric gap junction channels in rat hepatocytes in which the expression of connexin26 is induced." Mol Cells **8**(3): 295-300.
- Lewandoski, M. (2001). "Conditional control of gene expression in the mouse." Nat Rev Genet **2**(10): 743-755.
- Lewis, R.S. and Hudspeth, A.J. (1983). "Voltage- and ion-dependent conductances in solitary vertebrate hair cells." Nature **304**(5926): 538-541.
- Li, J., Hertzberg, E.L. and Nagy, J.I. (1997). "Connexin32 in oligodendrocytes and association with myelinated fibers in mouse and rat brain." J Comp Neurol **379**(4): 571-591.
- Lin, X., Ahmad, S., Chang, Q. and Tang, W. (2009). A strategy of over-expressing remaining gap junction co-assembly partner to rescue hearing of connexin30 null and conditional connexin26 null mice. International Gap Junction Conference. Sedona, Arizona, USA.
- Liu, W., Bostrom, M., Kinnefors, A. and Rask-Andersen, H. (2009). "Unique expression of connexins in the human cochlea." Hear Res **250**(1-2): 55-62.
- Locke, D., Wang, L.X., Bevans, C.G., Lee, Y.C. and Harris, A.L. (2003). "Open pore block of connexin26 and connexin32 hemichannels by neutral, acidic and basic glycoconjugates." Cell Commun Adhes **10**(4-6): 239-244.
- López-Bigas, N., Arbones, M.L., Estivill, X. and Simonneau, L. (2002). "Expression profiles of the connexin genes, Gjb1 and Gjb3, in the developing mouse cochlea." Gene Expr Patterns **2**(1-2): 113-117.
- Madison, K.C. (2003). "Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis." J Invest Dermatol **121**(2): 231-241.
- Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y. and Tsukihara, T. (2009). "Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution." Nature **458**(7238): 597-602.
- Magin, T.M., McEwan, C., Milne, M., Pow, A.M., Selfridge, J. and Melton, D.W. (1992). "A position- and orientation-dependent element in the first intron is required for expression of the mouse hprt gene in embryonic stem cells." Gene **122**(2): 289-296.
- Majumder, P., Crispino, G., Rodriguez, L., Ciubotaru, C.D., Anselmi, F., Piazza, V., Bortolozzi, M. and Mammano, F. (2010). "ATP-mediated cell-cell signaling in the organ of Corti: the role of connexin channels." Purinergic Signal **6**(2): 167-187.

- Mammano, F., Bortolozzi, M., Ortolano, S. and Anselmi, F. (2007). "Ca²⁺ signaling in the inner ear." Physiology (Bethesda) **22**: 131-144.
- Marieb, E.N. (2007). Essentials of Human anatomy and Physiology. London, Benjamin Cummings, Pearson Education.
- Martinez, A.D., Acuna, R., Figueroa, V., Maripillan, J. and Nicholson, B. (2009). "Gap-junction channels dysfunction in deafness and hearing loss." Antioxid Redox Signal **11**(2): 309-322.
- McLeod, M., Craft, S. and Broach, J.R. (1986). "Identification of the crossover site during FLP-mediated recombination in the *Saccharomyces cerevisiae* plasmid 2 microns circle." Mol Cell Biol **6**(10): 3357-3367.
- Meda, P., Pepper, M.S., Traub, O., Willecke, K., Gros, D., Beyer, E., Nicholson, B., Paul, D. and Orci, L. (1993). "Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands." Endocrinology **133**(5): 2371-2378.
- Mese, G., Richard, G. and White, T.W. (2007). "Gap junctions: basic structure and function." J Invest Dermatol **127**(11): 2516-2524.
- Moorby, C. and Patel, M. (2001). "Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation." Exp Cell Res **271**(2): 238-248.
- Moreno, A.P. (2005). "Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to channel gating." Biochim Biophys Acta **1711**(2): 164-171.
- Morris, R.J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J.S., Sawicki, J.A. and Cotsarelis, G. (2004). "Capturing and profiling adult hair follicle stem cells." Nat Biotechnol **22**(4): 411-417.
- Nadarajah, B., Jones, A.M., Evans, W.H. and Parnavelas, J.G. (1997). "Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation." J Neurosci **17**(9): 3096-3111.
- Nagy, A. (2000). "Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring." Genesis **26**(2): 99-109.
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vinterstein, K. and Behringer, R. (2003). Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. . New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nagy, J.I., Li, X., Rempel, J., Stelmack, G., Patel, D., Staines, W.A., Yasumura, T. and Rash, J.E. (2001). "Connexin26 in adult rodent central nervous system: demonstration at astrocytic gap junctions and colocalization with connexin30 and connexin43." J Comp Neurol **441**(4): 302-323.
- Neef, J., Gehrt, A., Bulankina, A.V., Meyer, A.C., Riedel, D., Gregg, R.G., Strenzke, N. and Moser, T. (2009). "The Ca²⁺ channel subunit beta2 regulates Ca²⁺ channel abundance and function in inner hair cells and is required for hearing." J Neurosci **29**(34): 10730-10740.

- Nelles, E., Butzler, C., Jung, D., Temme, A., Gabriel, H.D., Dahl, U., Traub, O., Stumpel, F., Jungermann, K., Zielasek, J., Toyka, K.V., Dermietzel, R. and Willecke, K. (1996). "Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9565-9570.
- Nickel, B.M., DeFranco, B.H., Gay, V.L. and Murray, S.A. (2008). "Clathrin and Cx43 gap junction plaque endocytosis." Biochem Biophys Res Commun **374**(4): 679-682.
- Ortolano, S., Di Pasquale, G., Crispino, G., Anselmi, F., Mammano, F. and Chiorini, J.A. (2008). "Coordinated control of connexin 26 and connexin 30 at the regulatory and functional level in the inner ear." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(48): 18776-18781.
- Oshima, A., Tani, K., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y. and Sosinsky, G.E. (2007). "Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(24): 10034-10039.
- Panchin, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N. and Lukyanov, S. (2000). "A ubiquitous family of putative gap junction molecules." Curr Biol **10**(13): R473-474.
- Peracchia, C. (2004). "Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin." Biochim Biophys Acta **1662**(1-2): 61-80.
- Perkins, G., Goodenough, D. and Sosinsky, G. (1997). "Three-dimensional structure of the gap junction connexon." Biophys J **72**(2 Pt 1): 533-544.
- Perkins, G.A., Goodenough, D.A. and Sosinsky, G.E. (1998). "Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons." J Mol Biol **277**(2): 171-177.
- Plum, A., Hallas, G., Magin, T., Dombrowski, F., Hagendorff, A., Schumacher, B., Wolpert, C., Kim, J., Lamers, W.H., Evert, M., Meda, P., Traub, O. and Willecke, K. (2000). "Unique and shared functions of different connexins in mice." Curr Biol **10**(18): 1083-1091.
- Potten, C.S. and Booth, C. (2002). "Keratinocyte stem cells: a commentary." J Invest Dermatol **119**(4): 888-899.
- Potten, C.S., Saffhill, R. and Maibach, H.I. (1987). "Measurement of the transit time for cells through the epidermis and stratum corneum of the mouse and guinea-pig." Cell Tissue Kinet **20**(5): 461-472.
- Proksch, E., Brandner, J.M. and Jensen, J.M. (2008). "The skin: an indispensable barrier." Exp Dermatol **17**(12): 1063-1072.
- Purves, D., Augustine GJ., Fitzpatrick, D., Katz, L., LaMantia AS., McNamara, J. and Williams, S., Eds. (2001). Neuroscience. Sunderland, Sinauer Associates.
- Rabionet, R., Lopez-Bigas, N., Arbones, M.L. and Estivill, X. (2002). "Connexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders." Trends Mol Med **8**(5): 205-212.

- Rabut, G. and Ellenberg, J. (2005). Photobleaching techniques to study mobility and molecular dynamics of proteins in live cells: FRAP, iFRAP, and FLIP. Live Cell Imaging. Goldman, R.D. and Spector, D.L. New York, Cold Spring Harbor Laboratory: 101-126.
- Rahman, S. and Evans, W.H. (1991). "Topography of connexin32 in rat liver gap junctions. Evidence for an intramolecular disulphide linkage connecting the two extracellular peptide loops." J Cell Sci **100 (Pt 3)**: 567-578.
- Revel, J.P. and Karnovsky, M.J. (1967). "Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver." J Cell Biol **33(3)**: C7-C12.
- Richard, G. (2005). "Connexin disorders of the skin." Clin Dermatol **23(1)**: 23-32.
- Richard, G., Brown, N., Ishida-Yamamoto, A. and Krol, A. (2004). "Expanding the phenotypic spectrum of Cx26 disorders: Bart-Pumphrey syndrome is caused by a novel missense mutation in GJB2." J Invest Dermatol **123(5)**: 856-863.
- Richard, G., Rouan, F., Willoughby, C.E., Brown, N., Chung, P., Ryyanen, M., Jabs, E.W., Bale, S.J., DiGiovanna, J.J., Uitto, J. and Russell, L. (2002). "Missense mutations in GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome." Am J Hum Genet **70(5)**: 1341-1348.
- Rodriguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A.F. and Dymecki, S.M. (2000). "High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP." Nat Genet **25(2)**: 139-140.
- Rodríguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A.F. and Dymecki, S.M. (2000). "High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP." Nat Genet **25(2)**: 139-140.
- Rosenberg, E., Spray, D.C. and Reid, L.M. (1992). "Transcriptional and posttranscriptional control of connexin mRNAs in periportal and pericentral rat hepatocytes." Eur J Cell Biol **59(1)**: 21-26.
- Rouan, F., White, T.W., Brown, N., Taylor, A.M., Lucke, T.W., Paul, D.L., Munro, C.S., Uitto, J., Hodgins, M.B. and Richard, G. (2001). "trans-dominant inhibition of connexin-43 by mutant connexin-26: implications for dominant connexin disorders affecting epidermal differentiation." J Cell Sci **114(Pt 11)**: 2105-2113.
- Rozental, R., Miduturu, S. and Spray, D.C. (2001). How to close a gap junction channel. Connexin Methods and Protocols. Bruzzone, R. and Giaume, C. Totowa, NJ, Humana Press: 447-476.
- Saéz, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martinez, A.D. and Beyer, E.C. (2003). "Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions." Physiol Rev **83(4)**: 1359-1400.
- Salameh, A. (2006). "Life cycle of connexins: regulation of connexin synthesis and degradation." Adv Cardiol **42**: 57-70.

- Salomon, D., Masgrau, E., Vischer, S., Ullrich, S., Dupont, E., Sappino, P., Saurat, J.H. and Meda, P. (1994). "Topography of mammalian connexins in human skin." J Invest Dermatol **103**(2): 240-247.
- Santarelli, R., Arslan, E., Carraro, L., Conti, G., Capello, M. and Plourde, G. (2003). "Effects of isoflurane on the auditory brainstem responses and middle latency responses of rats." Acta Otolaryngol **123**(2): 176-181.
- Sargiannidou, I., Vavlitou, N., Aristodemou, S., Hadjisavvas, A., Kyriacou, K., Scherer, S.S. and Kleopa, K.A. (2009). "Connexin32 mutations cause loss of function in Schwann cells and oligodendrocytes leading to PNS and CNS myelination defects." J Neurosci **29**(15): 4736-4749.
- Sasaki, K., Murakami, T., Kawasaki, M. and Takahashi, M. (1987). "The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression." J Cell Physiol **133**(3): 579-584.
- Sbidian, E., Feldmann, D., Bengoa, J., Freitag, S., Abadie, V., de Prost, Y., Bodemer, C. and Hadj-Rabia, S. (2010). "Germline mosaicism in keratitis-ichthyosis-deafness syndrome: pre-natal diagnosis in a familial lethal form." Clin Genet **77**(6): 587-592.
- Scemes, E., Suadicani, S.O., Dahl, G. and Spray, D.C. (2007). "Connexin and pannexin mediated cell-cell communication." Neuron Glia Biol **3**(3): 199-208.
- Scherer, S.S., Deschenes, S.M., Xu, Y.T., Grinspan, J.B., Fischbeck, K.H. and Paul, D.L. (1995). "Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS." J Neurosci **15**(12): 8281-8294.
- Scherer, S.S., Xu, Y.T., Nelles, E., Fischbeck, K., Willecke, K. and Bone, L.J. (1998). "Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy." Glia **24**(1): 8-20.
- Schmiedt, R.A., Lang, H., Okamura, H.O. and Schulte, B.A. (2002). "Effects of furosemide applied chronically to the round window: a model of metabolic presbycusis." J Neurosci **22**(21): 9643-9650.
- Schrijver, I. (2004). "Hereditary non-syndromic sensorineural hearing loss: transforming silence to sound." J Mol Diagn **6**(4): 275-284.
- Schütz, M., Auth, T., Gehrt, A., Bosen, F., Körber, I., Strenzke, N., Moser, T. and Willecke, K. (2011). "The connexin26 S17F mouse mutant represents a model for the human hereditary keratitis-ichthyosis-deafness syndrome." Hum Mol Genet **20**(1): 28-39.
- Schütz, M., Scimemi, P., Majumder, P., De Sisti, R.D., Crispino, G., Rodriguez, L., Bortolozzi, M., Santarelli, R., Seydel, A., Sonntag, S., Ingham, N., Steel, K.P., Willecke, K. and Mammano, F. (2010). "The human deafness-associated connexin 30 T5M mutation causes mild hearing loss and reduces biochemical coupling among cochlear non-sensory cells in knock-in mice." Hum Mol Genet **19**(24): 4759-4773.

- Severs, N.J., Dupont, E., Coppen, S.R., Halliday, D., Inett, E., Baylis, D. and Rothery, S. (2004). "Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease." Biochim Biophys Acta **1662**(1-2): 138-148.
- Shashikant, C.S. and Ruddle, F.H. (2003). "Impact of transgenic technologies on functional genomics." Curr Issues Mol Biol **5**(3): 75-98.
- Simpson, E.M., Linder, C.C., Sargent, E.E., Davisson, M.T., Mobraaten, L.E. and Sharp, J.J. (1997). "Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice." Nat Genet **16**(1): 19-27.
- Simpson, I., Rose, B. and Loewenstein, W.R. (1977). "Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels." Science **195**(4275): 294-296.
- Smith, F.J., Morley, S.M. and McLean, W.H. (2002). "A novel connexin 30 mutation in Clouston syndrome." J Invest Dermatol **118**(3): 530-532.
- Söhl, G., Theis, M., Hallas, G., Brambach, S., Dahl, E., Kidder, G. and Willecke, K. (2001). "A new alternatively spliced transcript of the mouse connexin32 gene is expressed in embryonic stem cells, oocytes, and liver." Exp Cell Res **266**(1): 177-186.
- Söhl, G. and Willecke, K. (2003). "An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man." Cell Commun Adhes **10**(4-6): 173-180.
- Söhl, G. and Willecke, K. (2004). "Gap junctions and the connexin protein family." Cardiovasc Res **62**(2): 228-232.
- Sosinsky, G.E. and Nicholson, B.J. (2005). "Structural organization of gap junction channels." Biochim Biophys Acta **1711**(2): 99-125.
- Southern, E.M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-517.
- Spray, D.C. and Burt, J.M. (1990). "Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel." Am J Physiol **258**(2 Pt 1): C195-205.
- Steel, K.P. and Barkway, C. (1989). "Another role for melanocytes: their importance for normal stria vascularis development in the mammalian inner ear." Development **107**(3): 453-463.
- Steel, K.P. and Kros, C.J. (2001). "A genetic approach to understanding auditory function." Nat Genet **27**(2): 143-149.
- Stout, C., Goodenough, D.A. and Paul, D.L. (2004). "Connexins: functions without junctions." Curr Opin Cell Biol **16**(5): 507-512.
- Sugata, A., Fukushima, K., Sugata, K., Fukuda, S., Kimura, N., Gunduz, M., Kasai, N., Usami, S., Smith, R.J. and Nishizaki, K. (2002). "High-throughput screening for GJB2 mutations-- its clinical application to genetic testing in prelingual deafness screening for GJB2 mutations." Auris Nasus Larynx **29**(3): 231-239.

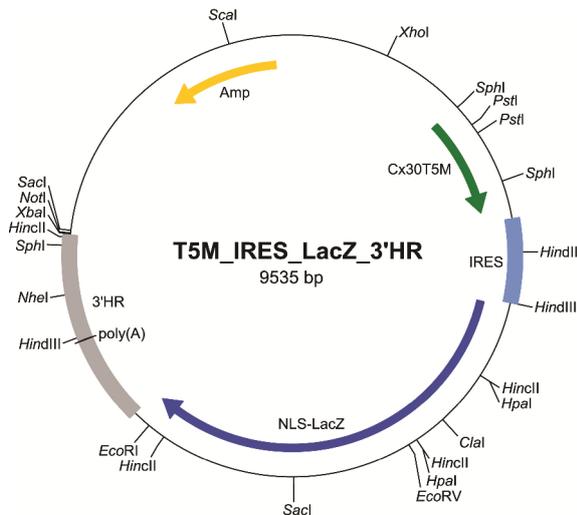
- Sun, J., Ahmad, S., Chen, S., Tang, W., Zhang, Y., Chen, P. and Lin, X. (2005). "Cochlear gap junctions coassembled from Cx26 and 30 show faster intercellular Ca²⁺ signaling than homomeric counterparts." Am J Physiol Cell Physiol **288**(3): C613-623.
- Sun, Y., Tang, W., Chang, Q., Wang, Y., Kong, W. and Lin, X. (2009). "Connexin30 null and conditional connexin26 null mice display distinct pattern and time course of cellular degeneration in the cochlea." J Comp Neurol **516**(6): 569-579.
- Teubner, B., Michel, V., Pesch, J., Lautermann, J., Cohen-Salmon, M., Söhl, G., Jahnke, K., Winterhager, E., Herberhold, C., Hardelin, J.P., Petit, C. and Willecke, K. (2003). "Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential." Hum Mol Genet **12**(1): 13-21.
- Theis, M., Magin, T.M., Plum, A. and Willecke, K. (2000). "General or cell type-specific deletion and replacement of connexin-coding DNA in the mouse." Methods **20**(2): 205-218.
- Thomas, T., Jordan, K., Simek, J., Shao, Q., Jedeszko, C., Walton, P. and Laird, D.W. (2005). "Mechanisms of Cx43 and Cx26 transport to the plasma membrane and gap junction regeneration." J Cell Sci **118**(Pt 19): 4451-4462.
- Thomas, T., Telford, D. and Laird, D.W. (2004). "Functional domain mapping and selective trans-dominant effects exhibited by Cx26 disease-causing mutations." J Biol Chem **279**(18): 19157-19168.
- Threadgill, D.W., Yee, D., Matin, A., Nadeau, J.H. and Magnuson, T. (1997). "Genealogy of the 129 inbred strains: 129/SvJ is a contaminated inbred strain." Mamm Genome **8**(6): 390-393.
- Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M. and Tada, M. (1998). "Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes." J Biol Chem **273**(21): 12725-12731.
- Tritsch, N.X. and Bergles, D.E. (2010). "Developmental regulation of spontaneous activity in the Mammalian cochlea." J Neurosci **30**(4): 1539-1550.
- Tritsch, N.X., Yi, E., Gale, J.E., Glowatzki, E. and Bergles, D.E. (2007). "The origin of spontaneous activity in the developing auditory system." Nature **450**(7166): 50-55.
- Tumbar, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W.E., Rendl, M. and Fuchs, E. (2004). "Defining the epithelial stem cell niche in skin." Science **303**(5656): 359-363.
- Unwin, P.N. and Ennis, P.D. (1983). "Calcium-mediated changes in gap junction structure: evidence from the low angle X-ray pattern." J Cell Biol **97**(5 Pt 1): 1459-1466.
- Valiunas, V., Polosina, Y.Y., Miller, H., Potapova, I.A., Valiuniene, L., Doronin, S., Mathias, R.T., Robinson, R.B., Rosen, M.R., Cohen, I.S. and Brink, P.R. (2005). "Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions." J Physiol **568**(Pt 2): 459-468.

- van Veen, A.A., van Rijen, H.V. and Opthof, T. (2001). "Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties." Cardiovasc Res **51**(2): 217-229.
- Venance, L., Rozov, A., Blatow, M., Burnashev, N., Feldmeyer, D. and Monyer, H. (2000). "Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 10260-10265.
- Wade, M.H., Trosko, J.E. and Schindler, M. (1986). "A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells." Science **232**(4749): 525-528.
- Wagner, C. (2008). "Function of connexins in the renal circulation." Kidney Int **73**(5): 547-555.
- Wang, X.P., Schunck, M., Kallen, K.J., Neumann, C., Trautwein, C., Rose-John, S. and Proksch, E. (2004). "The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis." J Invest Dermatol **123**(1): 124-131.
- Wang, Y., Chang, Q., Tang, W., Sun, Y., Zhou, B., Li, H. and Lin, X. (2009). "Targeted connexin26 ablation arrests postnatal development of the organ of Corti." Biochem Biophys Res Commun **385**(1): 33-37.
- Warn-Cramer, B.J. and Lau, A.F. (2004). "Regulation of gap junctions by tyrosine protein kinases." Biochim Biophys Acta **1662**(1-2): 81-95.
- White, T.W. and Bruzzone, R. (2000). "Intercellular communication in the eye: clarifying the need for connexin diversity." Brain Res Brain Res Rev **32**(1): 130-137.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U. and Sohl, G. (2002). "Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome." Biol Chem **383**(5): 725-737.
- Winterhager, E., Pielensticker, N., Freyer, J., Ghanem, A., Schrickel, J.W., Kim, J.S., Behr, R., Grummer, R., Maass, K., Urschel, S., Lewalter, T., Tiemann, K., Simoni, M. and Willecke, K. (2007). "Replacement of connexin43 by connexin26 in transgenic mice leads to dysfunctional reproductive organs and slowed ventricular conduction in the heart." BMC Dev Biol **7**: 26.
- Yen, M.R. and Saier, M.H., Jr. (2007). "Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily." Prog Biophys Mol Biol **94**(1-2): 5-14.
- Yum, S.W., Zhang, J., Valiunas, V., Kanaporis, G., Brink, P.R., White, T.W. and Scherer, S.S. (2007). "Human connexin26 and connexin30 form functional heteromeric and heterotypic channels." Am J Physiol Cell Physiol **293**(3): C1032-1048.
- Zdebik, A.A., Wangemann, P. and Jentsch, T.J. (2009). "Potassium ion movement in the inner ear: insights from genetic disease and mouse models." Physiology (Bethesda) **24**: 307-316.

- Zhang, J.T. and Nicholson, B.J. (1989). "Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA." J Cell Biol **109**(6 Pt 2): 3391-3401.
- Zhang, Y., Tang, W., Ahmad, S., Sipp, J.A., Chen, P. and Lin, X. (2005). "Gap junction-mediated intercellular biochemical coupling in cochlear supporting cells is required for normal cochlear functions." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(42): 15201-15206.
- Zhang, Y.W., Kaneda, M. and Morita, I. (2003). "The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43." J Biol Chem **278**(45): 44852-44856.
- Zhao, H.B., Yu, N. and Fleming, C.R. (2005). "Gap junctional hemichannel-mediated ATP release and hearing controls in the inner ear." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18724-18729.
- Zoidl, G. and Dermietzel, R. (2002). "On the search for the electrical synapse: a glimpse at the future." Cell Tissue Res **310**(2): 137-142.

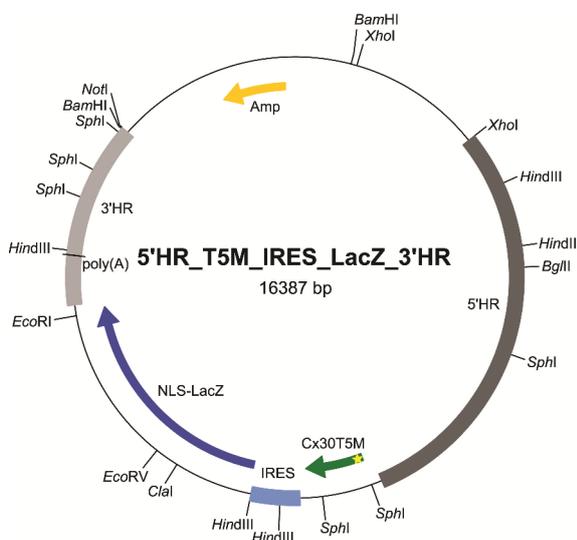
9 Anhang

Vektorkarten



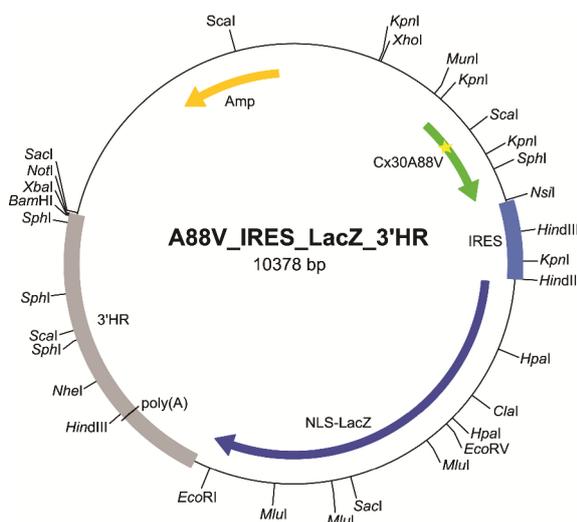
A1: Karte des Vektors „T5M_IRES_LacZ_3'HR“.

Amp: Ampizillin-Resistenzgen, Cx30T5M: kodierende, Intron-freie Region des Cx30T5M-Gens, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, NLS-LacZ: kodierende Region der β -Galaktosidase mit Kernlokalisierungssignal, poly(A): endogenes Polyadenylierungssignal des wtCx30 Gens, 3'HR: 3' homologe Region des wtCx30 Gens.



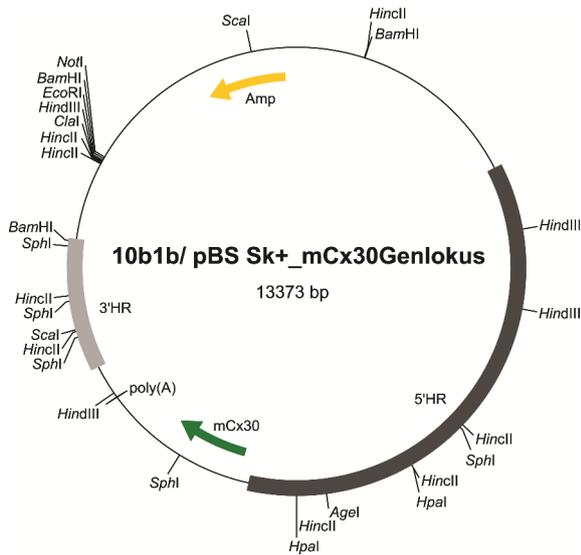
A2: Karte des Vektors „5'HR_T5M_IRES_LacZ_3'HR“.

Amp: Ampizillin-Resistenzgen, 5'HR: 5' homologe Region des wtCx30 Gens, Cx30T5M: kodierende, Intron-freie Region des Cx30T5M-Gens, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, NLS-LacZ: für die β -Galaktosidase kodierende Region mit Kernlokalisierungssignal, poly(A): endogenes Polyadenylierungssignal des wtCx30 Gens, 3'HR: 3' homologe Region des wtCx30 Gens.



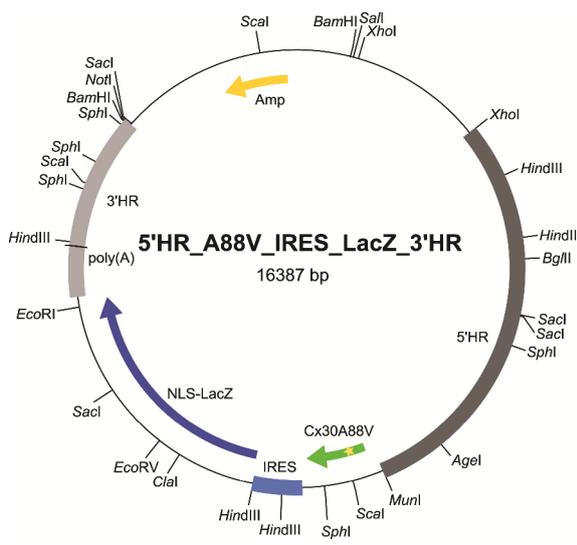
A3: Karte des Vektors „A88V_IRES_LacZ_3'HR“.

Amp: Ampizillin-Resistenzgen, Cx30A88V: kodierende, Intron-freie Region des Cx30A88V-Gens, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, NLS-LacZ: kodierende Region der β -Galaktosidase mit Kernlokalisierungssignal, poly(A): endogenes Polyadenylierungssignal des wtCx30 Gens, 3'HR: Homologieregion des wtCx30 Gens.



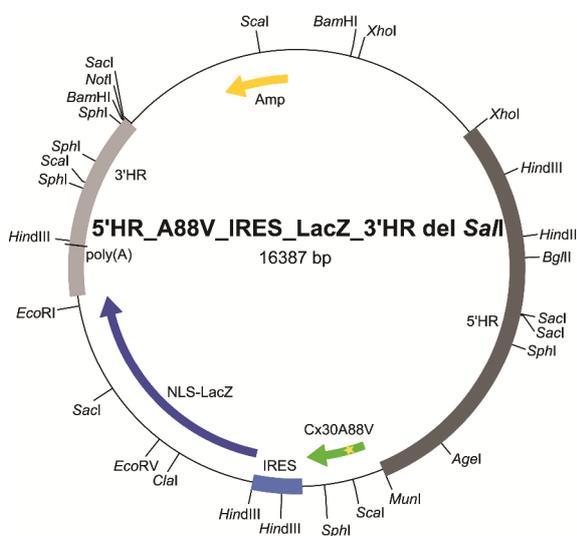
A4: Karte des Vektors „10b1b/pBS Sk+_{mCx30}Genlokus“.

Amp: Ampizillin-Resistenzgen, 5'HR: 5' Homologieregion des wtCx30 Gens, mCx30: kodierende, Intron-freie Region des murinen wtCx30-Gens, poly(A): endogenes Polyadenylierungssignal des wtCx30 Gens, 3'HR: 3' Homologieregion des wtCx30 Gens.



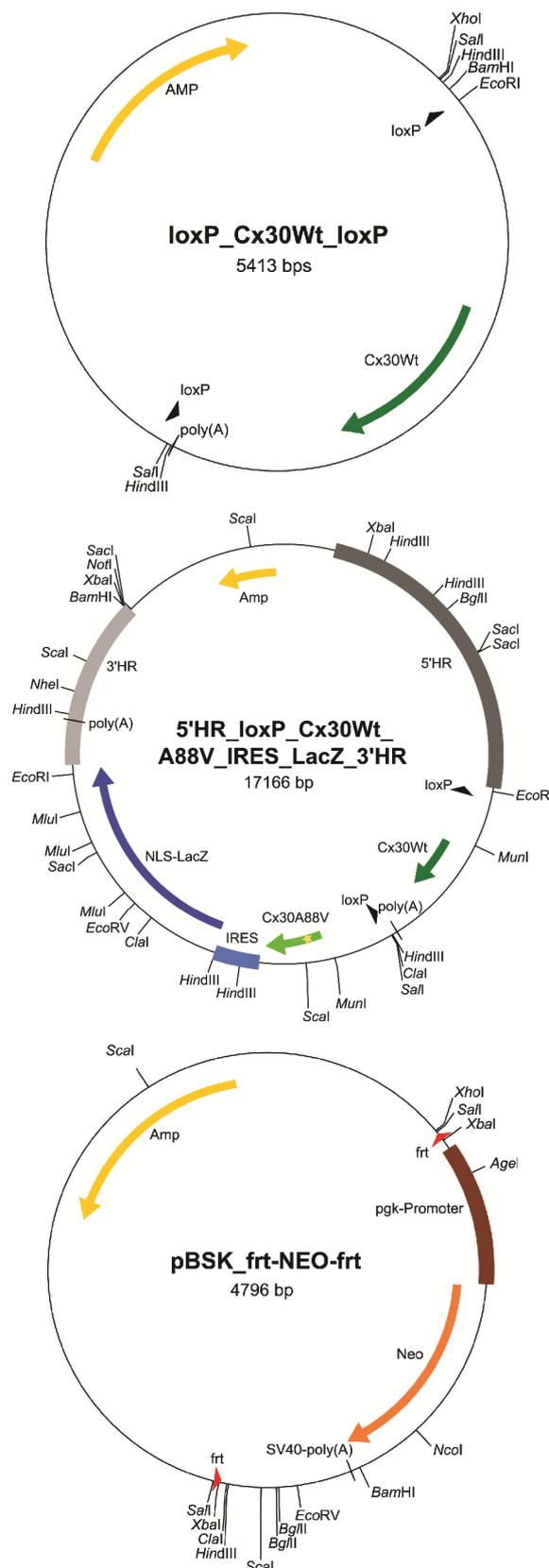
A5: Karte des Vektors „5'HR_A88V_IRES_LacZ_3'HR“.

Amp: Ampizillin-Resistenzgen, 5'HR: 5' Homologieregion des wtCx30 Gens, Cx30A88V: kodierende, Intron-freie Region des Cx30A88V-Gens, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, NLS-LacZ: kodierende Region der β -Galaktosidase mit Kernlokalisierungssignal, poly(A): endogenes Polyadenylierungssignal des wtCx30 Gens, 3'HR: Homologieregion des wtCx30 Gens.



A6: Karte des Vektors „5'HR_A88V_IRES_LacZ_3'HR del SaII“.

Entspricht dem Vektor „5'HR_A88V_IRES_LacZ_3'HR“ mit der Ausnahme, dass die Restriktionsschnittstelle *SaII* durch Schneiden des Vektors mit dem Enzym *SaII* und anschließendem Auffüllen der Enden entfernt wurde.

**A7: Karte des Vektors „loxP_Cx30Wt_loxP“.**

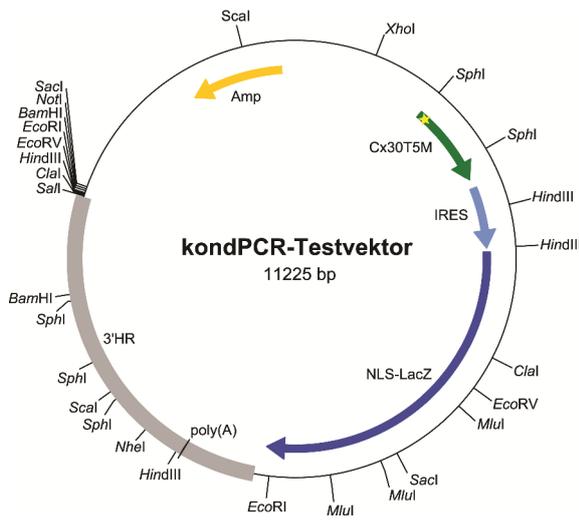
Amp: Ampizillin-Resistenzgen, loxP: Erkennungsstellen für die Cre-Rekombinase, Cx30Wt: kodierende, Intron-freie Region des wtCx30-Gens, poly(A): endogenes Polyadenylierungssignal des wtCx30 Gens.

A8: Karte des Vektors „5'HR_loxP_Cx30Wt_A88V_IRES_LacZ_3'HR“.

Amp: Ampizillin-Resistenzgen, 5'HR: 5' Homologieregion des wtCx30 Gens, loxP: Erkennungsstellen für die Cre-Rekombinase, Cx30Wt: kodierende, Intron-freie Region des wtCx30-Gens, poly(A): endogenes Polyadenylierungssignal des wtCx30 Gens, Cx30A88V: kodierende, Intron-freie Region des Cx30A88V-Gens, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, NLS-LacZ: kodierende Region der β -Galaktosidase mit Kernlokalisierungssignal, 3'HR: Homologieregion des wtCx30 Gens.

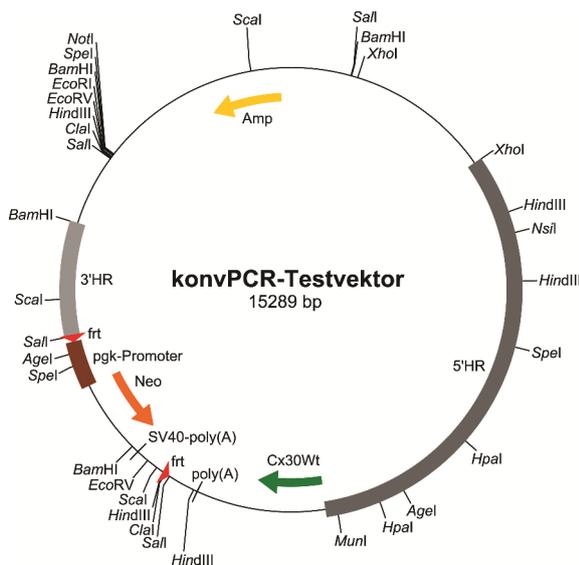
A9: Karte des Vektors pBSK_frt-Neo-frt“.

Amp: Ampizillin-Resistenzgen, frt: Erkennungsstellen für die Flp-Rekombinase, Neo: kodierende Region des Neomycin-Resistenzgens unter Kontrolle des pgk-Promoters, SV40-poly(A): Polyadenylierungssignal des SV40-Virus.



A10: Karte des Vektors „kondPCR-Testvektor“.

kond: konditional, Amp: Ampizillin-Resistenzgen, Cx30T5M: kodierende, Intron-freie Region des Cx30T5M-Gens, IRES: interne ribosomale Eintrittsstelle, NLS-LacZ: kodierende Region der β -Galaktosidase mit Kernlokalisierungssignal, poly(A): endogenes Polyadenylierungssignal des wtCx30 Gens, 3'HR: 3' Homologieregion des wtCx30 Gens.



A11: Karte des Vektors „konvPCR-Testvektor“.

konv: konventionell, Amp: Ampizillin-Resistenzgen, 5'HR: 5' Homologieregion des wtCx30 Gens, Cx30Wt: kodierende, Intron-freie Region des wtCx30-Gens, poly(A): endogenes Polyadenylierungssignal des wtCx30 Gens, frt: Erkennungsstellen für die Flp-Rekombinase, SV40-poly(A): Polyadenylierungssignal des SV40-Virus, Neo: kodierende Region des Neomycin-Resistenzgens unter Kontrolle des pgk-Promoters, 3'HR: 3' Homologieregion des wtCx30 Gens.

Publikationsliste

Schütz, M., Auth, T., Gehrt, A., Bosen, F., Körber, I., Strenzke, N., Moser, T. and Willecke, K. (2011). "The connexin26 S17F mouse mutant represents a model for the human hereditary keratitis-ichthyosis-deafness syndrome." Hum Mol Genet **20**(1): 28-39.

Schütz, M., Scimemi, P., Majumder, P., De Sisti, R.D., Crispino, G., Rodriguez, L., Bortolozzi, M., Santarelli, R., Seydel, A., Sonntag, S., Ingham, N., Steel, K.P., Willecke, K. and Mammano, F. (2010). "The human deafness-associated connexin 30 T5M mutation causes mild hearing loss and reduces biochemical coupling among cochlear non-sensory cells in knock-in mice." Hum Mol Genet **19**(24): 4759-4773.