

Erzeugung und Untersuchung neuer
transgener Mausmutanten
zur Expression und Funktion der Connexine während
der Myogenese

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

vorgelegt von
Julia Freiin von Maltzahn
aus
Düsseldorf

Bonn, 2008

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

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

Erscheinungsjahr 2008

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

Tag der Promotion: 23. Juni 2008

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, März 2008

Julia Freiin von Maltzahn

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus Willecke danke ich insbesondere für die Überlassung des interessanten Themas sowie die stete Diskussionsbereitschaft. Auch für die Freiheit, meine wissenschaftliche Arbeit eigenständig gestalten zu können, möchte ich mich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Dieter Fürst und Frau PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert danke ich für ihre Bereitschaft, der Promotionskommission als fachnahes und fachangrenzendes Mitglied zur Verfügung zu stehen.

Für die engagierte und erfolgreiche Kooperation möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernd Fleischmann bedanken. Ganz besonders erwähnen möchte ich hierbei Dr. Philipp Sasse und Dr. Daniela Wenzel.

Den jetzigen und früheren Mitarbeitern des Instituts für Genetik danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit sowie die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei wissenschaftlichen und technischen Fragen. Besonders hervorheben möchte ich dabei folgende Mitarbeiter des Labors „7.16“: Dr. Maria Kreuzberg, Dr. Goran Söhl, Volker Wulf, Philipp Wörsdörfer und Gerda Hertig. Ganz besonders möchte ich mich bei Gabi Matern für die hervorragende technische Unterstützung bedanken. Dr. Carsten Euwens danke ich für die Bereitstellung des Shuttlevektors zur Erzeugung des Cx45eGFP BACs sowie seine Einführung in die BAC-Technologie. Bei Thorsten Höher möchte ich mich für die Unterstützung bei der Analyse der Cx45eGFP Mauslinie bedanken. Christine Siegmund danke ich für die Erzeugung transgener Tiere durch Blastozysteninjektion. Bei allen Tierpflegern möchte ich mich für die Versorgung und Pflege der transgenen Mäuse bedanken.

Dr. Joachim Degen und Melanie Schütz danke ich für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Freunden, die mich nicht nur während meiner Doktorarbeit fortwährend unterstützt haben.

1	Einleitung.....	1
1.1	Gap Junctions	1
1.1.1	Struktur der Gap Junction Kanäle	2
1.1.2	Funktion der Gap Junction Kanäle	4
1.1.3	Regulation der Gap Junction Kanäle.....	5
1.2	Ausprägungsmuster des murinen Connexin39	5
1.3	Transgene Mäuse und Reportergene.....	6
1.3.1	Erzeugung Gen-defizienter Mäuse durch homologe Rekombination	6
1.3.2	Das Cre-loxP/Flp-frt System zur Gendeletion	7
1.3.3	Erzeugung transgener Mäuse mit Hilfe bakterieller artifizierlicher Chromosomen (BAC)	8
1.3.4	eGFP als Reportergen	10
1.4	Phänotypische Veränderungen Connexin-defizienter Mäuse.....	11
1.5	Der Skelettmuskel	12
1.5.1	Aufbau des Skelettmuskels	12
1.5.2	Entwicklung des Skelettmuskels	13
1.5.3	Regeneration des Skelettmuskels.....	16
1.5.4	Connexine während der Skelettmuskelentwicklung und -regeneration	17
1.6	Das zentrale Nervensystem	19
1.6.1	Zelltypen des zentralen Nervensystems	19
1.6.2	Adulte Neurogenese	20
1.6.3	Connexine im zentralen Nervensystem.....	21
1.7	Das Herz – Aufbau und Connexinexpression.....	22
1.7.1	Anatomie und Erregungsausbreitung im adulten Herzen.....	22
1.7.2	Connexin-Expression im adulten Herzen	23
1.7.3	Zelltransplantation zur Behandlung ischämischer Herzerkrankungen.	24
1.8	Ausprägungsmuster und Funktion des murinen Connexin45.....	25
1.8.1	Eigenschaften des Gjc1 Gens und Cx45 Proteins	25
1.8.2	Expressionsorte des Cx45	26
1.8.3	Analyse Cx45 defizienter Mäuse.....	27
1.9	RNS-Interferenz	28
1.10	Zielsetzung.....	30
2	Material.....	31
2.1	Chemikalien	31
2.2	Allgemeine Lösungen und Puffer	31
2.3	Lösungen für die Nukleinsäureanalytik.....	31
2.3.1	Lösungen zur Präparation genomischer DNS und der Gesamt-RNA..	31
2.3.2	Lösungen zur Präparation von Plasmid-DNS.....	32
2.3.3	Lösungen zur Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	32
2.3.4	Lösungen zur Southern Blot Analyse	32
2.4	Lösungen für die Proteinanalytik	33
2.4.1	Lösungen für die Immunoblotanalyse	33
2.4.2	Lösungen für die Affinitätsaufreinigung von Antikörpern	34
2.4.3	Lösungen für die Immunpräzipitation	35
2.4.4	Lösungen für die Immunfluoreszenz-Analyse	36
2.5	Medien und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien	36
2.5.1	Medien und Lösungen zur Herstellung kompetenter Bakterien.....	36
2.5.2	Medien und Lösungen zur Transformation und Kultivierung von Bakterien	37
2.6	Medien für die Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	38
2.6.1	Medien und Lösungen zur Kultivierung embryonaler Stammzellen.....	38

2.6.2	Medien und Lösungen zur Kultivierung von HeLa Zellen	39
2.6.3	Medien und Lösungen zur Kultivierung von C ₂ C ₁₂ Zellen	39
2.7	Lösungen für histologische Färbungen	40
2.8	Lösungen für die Mikroinjektion (in das neonatale Zwerchfell)	40
2.9	Anästhetikum	40
2.10	Kommerzielle Reagenziensätze	41
2.11	Nukleinsäuren	41
2.12	Oligonukleotide	42
2.12.1	Primer für die RT-PCR Analyse	42
2.12.2	Primer zur Genotypisierung	43
2.13	Bakterienstämme	43
2.14	Größenstandards	44
2.15	Eukaryontische Zelllinien	44
2.16	Mauslinien	44
2.17	Antikörper	45
2.17.1	Primärantikörper	45
2.17.2	Sekundärantikörper	46
2.18	Geräte	46
2.19	Sonstige Materialien	47
3	Methoden	48
3.1	DNS-Arbeiten	48
3.1.1	Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präparation)	48
3.1.2	Präparative Plasmid-Isolierung (Midi-Präparation)	48
3.1.3	Endotoxin-freie Plasmidisolierung (Maxi-Präparation)	49
3.1.4	Aufreinigung der BAC-DNS zur Oozyteninjektion	49
3.1.5	Isolierung genomischer DNS aus embryonalen Stammzellen	49
3.1.6	Isolierung genomischer DNS aus Mausschwanzspitzen	49
3.1.7	Isolierung genomischer DNS aus der Leber von Mäusen	50
3.1.8	Pulsfeld-Gelelektrophorese	50
3.1.9	DNS-Sequenzierung	51
3.1.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
3.2	RNS-Arbeiten	58
3.2.1	RNS-Isolierung aus Zellen und Geweben	58
3.2.2	RT-PCR Analysen	59
3.3	Enzymatische Modifikation, homologe Rekombination in <i>E.coli</i> und Transformation von DNS	60
3.3.1	Restriktion der DNS	60
3.3.2	Auffüllen klebriger Enden	60
3.3.3	Dephosphorylierung von Vektorenden	61
3.3.4	Ligation der DNS-Fragmente	61
3.3.5	Transformation	62
3.3.6	Homologe Rekombination in <i>E.coli</i>	63
3.4	Nukleinsäuretransfer	64
3.4.1	Transfer von DNS (Southern Blot)	64
3.5	Erzeugung markierter Sonden	65
3.5.1	Erzeugung radioaktiv markierter Sonden	65
3.5.2	Erzeugung DIG-markierter Sonden	66
3.6	Nukleinsäure-Hybridisierung	66
3.6.1	Nukleinsäure-Hybridisierung mit QuickHyb [®]	66
3.6.2	Nukleinsäure-Hybridisierung mit DIG Easy Hyb	67
3.7	Kultivierung adhärent wachsender Säugerzellen	67

3.7.1	Kultivierung von C ₂ C ₁₂ Zellen.....	67
3.7.2	Kultivierung von HeLa Zellen	69
3.7.3	Kultivierung embryonaler Stammzellen der Maus	69
3.8	Zucht und Haltung von Mäusen	72
3.8.1	Blastozysteninjektion und Uterustransfer	72
3.8.2	Erzeugung der Cx45eGFP Mauslinie durch Oozyteninjektion	73
3.9	Mikroinjektion in das neonatale Zwerchfell der Maus	74
3.9.1	Isolierung des neonatalen Zwerchfells	74
3.9.2	Mikroinjektion von Alexa488 und Rhodamin-Dextran.....	74
3.10	Affinitätschromatische Aufreinigung von Antisera	74
3.10.1	Kopplung des Antigens an eine Säulenmatrix.....	74
3.10.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung	75
3.11	Proteinpräparation.....	76
3.11.1	Herstellung von Zellysaten	76
3.11.2	Herstellung von Gewebelysaten.....	76
3.11.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	76
3.12	Immunoblotanalysen	77
3.12.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	77
3.12.2	Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran	78
3.12.3	Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen.....	78
3.12.4	Entfernung gebundener Antikörper von Nitrocellulose-Membranen....	79
3.12.5	Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Brilliant-Blue™	79
3.13	Immunpräzipitation	80
3.14	Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen	80
3.14.1	Herstellung von Gefrierschnitten	80
3.14.2	Immunfluoreszenz-Analysen an Gefrierschnitten.....	81
3.15	Histologische Färbetechniken	81
3.15.1	Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten	81
3.15.2	Hämatoxylin-Eosin Färbung	82
3.15.3	Trichrom-Färbung nach Gomori.....	82
3.15.4	Acetylcholinesterase-Färbung.....	82
3.16	Funktionelle Analysen an transgenen Mäusen.....	83
3.16.1	Verletzung des Tibialis anterior Muskels durch Injektion von BaCl ₂	83
4	Ergebnisse	84
4.1	Connexin-Expression während der Skelettmuskelentwicklung und Muskelregeneration.....	84
4.1.1	Expression und funktionelle Eigenschaften des murinen Cx39.....	84
4.1.2	C ₂ C ₁₂ Zellen als Modellsystem der Skelettmuskelentwicklung.....	94
4.1.3	Expressionsanalyse der Pannexine Panx1, Panx2 und Panx3 auf Transkriptebeine	100
4.1.4	Analysen des Skelettmuskels bei Substitution des Cx43 durch Cx26 bzw. Cx32.....	101
4.2	Transplantation Cx43 exprimierender Skelettmuskelzellen in	106
	das Mauserz.....	106
4.2.1	Charakterisierung der Cx43 ^{tetOeGFP} :MCKtTA Mäuse	106
4.2.2	Untersuchung des Herzens nach Transplantation primärer	107
	Myoblasten.....	107
4.3	Erzeugung und Analyse Cx39 defizienter Mäuse.....	110
4.4	Erzeugung und Charakterisierung einer Cx45eGFP exprimierenden Mauslinie	122
4.4.1	Generierung und Aufreinigung des Cx45eGFP BACs.....	122

4.4.2	Erzeugung Cx45eGFP transgener Mäuse	126
4.4.3	Charakterisierung und Vergleich der verschiedenen transgenen Linien	126
4.4.4	Kolokalisation des Cx45eGFP Proteins mit dem endogenen Cx45 Protein im adulten Herzen	129
4.4.5	Die Expression des Cx45eGFP im adulten Herzen.....	129
4.4.6	Kolokalisation des Cx45eGFP mit ZO-1.....	130
4.4.7	Expression des Cx45eGFP während der Embryonalentwicklung des Gehirns.....	131
4.4.8	Expression des Cx45eGFP im Cerebellum adulter Mäuse	132
4.4.9	Expression des Cx45eGFP in der Subventrikularzone	133
4.4.10	Expression des Cx45eGFP in der Niere adulter Mäuse.....	134
4.4.11	Expression des Cx45eGFP in der glatten Muskulatur adulter Mäuse	135
4.4.12	Versuche zur Überwindung der embryonalen Letalität Cx45 defizienter Tiere durch das Cx45eGFP Transgen	136
5	Diskussion.....	139
5.1	Connexine während der Skelettmuskelentwicklung und –regeneration ...	139
5.1.1	Expression des Cx39 in primären und sekundären Myotuben	139
5.1.2	Eigenschaften der durch Cx39 gebildeten Gap Junction Kanäle	140
5.1.3	Zeitliche Reihenfolge der Connexin-Expression während der Skelettmuskel-entwicklung	141
5.1.4	Herunterregulation der Expression des Cx43 in C ₂ C ₁₂ Zellen durch spezifische siRNS.....	144
5.1.5	Untersuchungen zur Redundanz der Connexine während der Muskel- regeneration	145
5.2	Transplantation Cx43 exprimierender Skelettmuskelzellen in das adulte Mausherz.....	147
5.3	Erzeugung einer Cx39 defizienten Mauslinie	149
5.4	Erzeugung einer Cx45eGFP exprimierenden Mauslinie.....	151
5.4.1	Vergleich der verschiedenen transgenen Linien	151
5.4.2	Lokalisation des Cx45eGFP im adulten Herzen.....	153
5.4.3	Expression des Cx45eGFP im Cerebellum adulter Mäuse	154
5.4.4	Expression des Cx45eGFP während der adulten Neurogenese	155
5.4.5	Expression des Cx45eGFP in der adulten Niere.....	157
5.4.6	Expression des Cx45eGFP in der glatten Muskulatur.....	158
5.5	Funktioneller Ersatz des Cx45 durch Cx45eGFP	159
6	Ausblick	161
6.1	Connexin-Expression während der Muskelentwicklung und -regeneration	161
6.2	Weitere Analyse der Cx39 defizienten Mauslinie	162
6.3	Weitere Analyse der Cx45eGFP Mauslinie	163
6.4	Ersatz des Cx45 durch Cx45eGFP	164
7	Zusammenfassung	165
8	Literaturverzeichnis	166

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest	zweifach destilliertes Wasser	NAD ⁺	Nikotinamid-adenindinukleotid
Abb.	Abbildung	Neurobiotin	N-[2-aminoethyl]-biotinamid
abs.	Absolut	N-Terminus	aminoterminales Ende eines Peptids
Amp	Ampizillin(-Resistenzgen)	OD _x	optische Dichte bei Wellenlänge x in nm
ATP	Adenosintriphosphat	P0	postnatal
A _x	Absorption bei der Wellenlänge x in nm	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
BAC	Bakterielles artifizielles Chromosom	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
bp	Basenpaare	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
bzw.	beziehungsweise	PKC	Proteinkinase C
°C	Grad Celcius	poly(A)/pA	Polyadenylierungssignal/ Polyadenylierungsstelle
cAMP	zyklisches Adenosin-monophosphat	Puro	Puromycin(-Resistenzgen)
CKII	Casein Kinase II	RNase	Ribonuklease
CL	zytoplasmatische Schleife	RNS	Ribonukleinsäure
cm	Zentimeter	RT	Raumtemperatur/ Reverse Transkription
CMV	Cytomegalovirus	SDS	Natriumdodecylsulfat
cpm	Zerfälle pro Minute	sec	Sekunde
C-Terminus	carboxyterminales Ende eines Peptids	SSC	Trinatriumcitrat
Cx	Connexin	SV40	Simian Virus 40
Da	Dalton	SVZ	Subventrikularzone
dATP	Desoxy-adenosintriphosphat	TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	TE	Tris-EDTA Puffer
deion.	deionisiert	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
DEPC	Diethylpyrocarbonat	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
DNase	Desoxyribonuklease	U	Enzymeinheit (Unit)
DNS	Desoxyribonukleinsäure	ÜN	über Nacht
dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat	Upm	Umdrehungen pro Minute
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	UTR	untranslatierter Bereich
ED	Embryonaltag	UV	ultraviolett
EDTA	Ethylendiamintetra-essigsäure	v/v	Volumen pro Volumen
eGFP	enhanced green fluorescent protein	Vol.	Volumen
et al.	et altera	w/v	Gewicht pro Volumen
EtOH	Ethanol	WT	Wildtyp
FCS	fötales Kälberserum	z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm		
g	Gramm		
h	Stunde(n)		
kb	Kilobasenpaare (1000 bp)		
kDa	Kilodalton (1000 Da)		
konz.	konzentriert		
µl	Mikroliter		
l	Liter		
LB-Medium	Luria-Bertani Medium		
Lsg.	Lösung		
M	Molar		
mA	Milliampere		
MCS	Vielfachklonierungsstelle		
MCK	Muskel Kreatin Kinase		
mg	Milligramm		
min	Minute(n)		
ml	Milliliter		
mM	millimolar		
mRNS	Boten-RNS		

1 Einleitung

In vielzelligen Organismen bilden Zellverbindungen eine Grundvoraussetzung zur Vermittlung der mechanischen Stabilität sowie zur spezifischen Interaktion zwischen Zellen eines Verbandes. Man unterscheidet drei funktionale Gruppen an Zellverbindungen: Abschlussverbindungen (Tight Junctions/Zonula occludens), welche eine Diffusionsbarriere in Epithelien ausbilden, Haftverbindungen (Adherens Junctions/Zonula adhaerens und Desmosomen/Macula adhaerens), die das Zytoskelett über Zellgrenzen hinweg verbinden und dabei für die Stabilität des Gewebes sorgen sowie kommunizierende Verbindungen (Gap Junctions/Nexus), auf die im Folgenden weiter eingegangen wird.

1.1 Gap Junctions

Gap Junctions sind Zellverbindungen, die die Zytoplasmata benachbarter Zellen miteinander verbinden. Die Bezeichnung „Gap Junction“ (Lückenverbindung von engl. „gap“ Lücke und engl. „junction“ Verbindung) leitet sich von elektronenmikroskopischen Beobachtungen benachbarter Zellen ab. Hier nähern sich die Zellmembranen auf 2 - 5 nm anstelle der sonst üblichen Abstände von 20 - 30 nm an (Revel und Karnovsky, 1967).

Sowohl bei Vertebraten wie auch bei Invertebraten wurden Genfamilien dieser Zellverbindungen nachgewiesen, die vermutlich durch konvergente Evolution entstanden sind. Die Mitglieder der Familien ähneln sich sowohl in ihrer Struktur wie auch in ihrer Funktion. Bei den Invertebraten werden die Gap Junctions von den Innexinen gebildet (Bauer et al., 2005; Phelan, 2005), bei den Vertebraten durch Connexine (Willecke et al., 2002). Homolog zu den Innexinen der Invertebraten konnten bei den Vertebraten die Pannexine nachgewiesen werden (Panchin, 2005; Shestopalov und Panchin, 2008).

Die Pannexine zeigen die gleiche Topologie in der Membran wie die Connexine, weisen aber keinerlei Sequenzähnlichkeit zu den Connexinen oder Innexinen auf (Panchin, 2005). In der Maus und im Menschen wurden bislang drei Pannexingene beschrieben (Baranova et al., 2004), die als Panx1, Panx2 und Panx3 bezeichnet werden. Im Folgenden wird ausschließlich auf die von Connexinen gebildeten Gap Junction Kanäle eingegangen.

1.1.1 Struktur der Gap Junction Kanäle

Die Zusammenlagerung vieler Gap Junction Einzelkanäle bezeichnet man als Gap Junction Plaque. Jeder Einzelkanal besteht dabei aus zwei Halbkanälen, den Connexonen, welche wiederum aus sechs Connexinen gebildet werden (Willecke et al., 2005, Abb.1.1). Ein Connexin Protein besitzt vier α -helikale Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Schleifen sowie den zytoplasmatisch gelegenen N- und C-Terminus (Mese et al., 2007, Abb.1.2). Die drei konservierten Cystein-Reste in den beiden extrazellulären Schleifen sind für das Aneinanderbinden der Halbkanäle in einem Gap Junction Kanal entscheidend. Besteht ein solcher Gap Junction Kanal aus zwei identischen Connexonen wird er als homotypisch bezeichnet, unterscheiden sich die beiden Halbkanäle, bezeichnet man den Kanal als heterotypisch (Willecke et a., 2002, Abb.1.1). Bestehen die einzelnen Halbkanäle aus den gleichen Connexinen, spricht man von homomeren Halbkanälen.

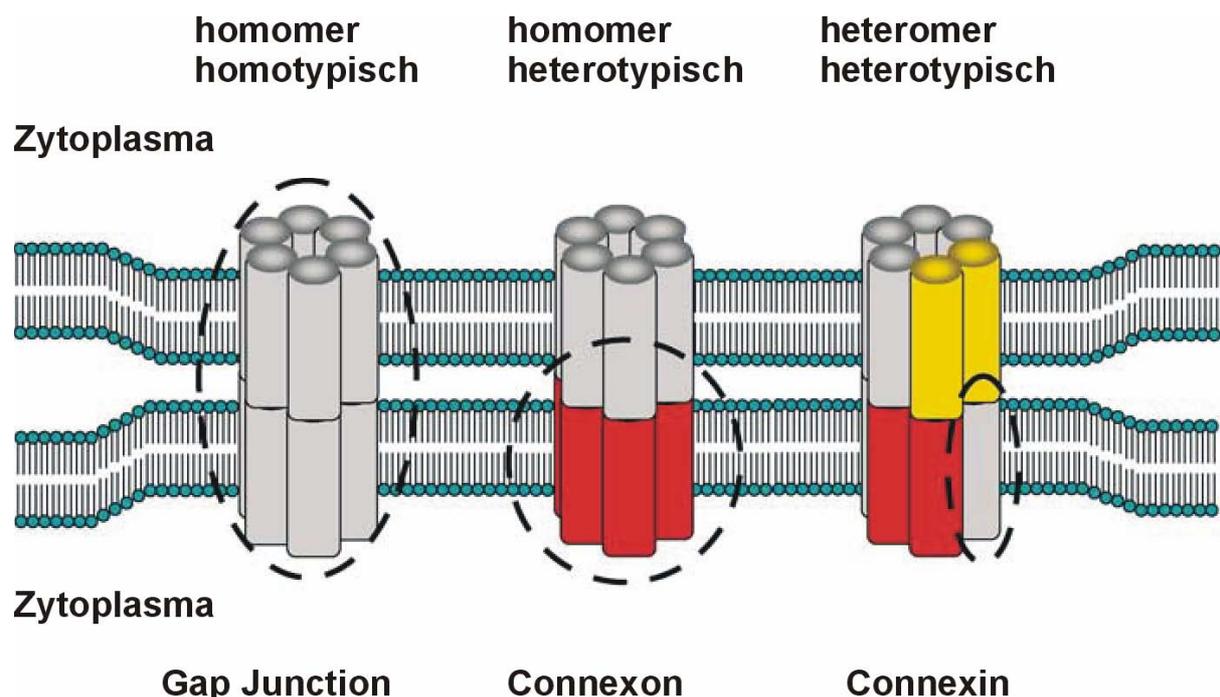


Abb.1.1: Schematische Darstellung verschiedener Gap Junction Kanäle (verändert nach Wagner, 2008)

Zwei Halbkanäle (Connexone) benachbarter Zellen können einen Gap Junction Kanal ausbilden, die aufgrund ihrer Zusammensetzung homomer homotypisch, homomer heterotypisch oder heteromer heterotypisch aufgebaut sein können.

Im Genom des Menschen wurden bislang 21 Connexingene identifiziert, bei Nagern 20, wobei sie mit Ausnahme des Connexin33 (Cx33) und Connexin25 (Cx25) orthologe Paare bilden (Willecke et al., 2005). Die Bezeichnung der Connexine

erfolgt für die Proteine nach ihrer theoretischen molekularen Masse in Kilodalton (kDa), dem eine Abkürzung für die entsprechende Spezies (z.B. „h“ für „human“, „m“ für „mouse“ oder „r“ für „rat“) vorangestellt sein kann. Die Connexingene werden in Gruppen unterteilt, wobei die Gruppenmitglieder unter Voranstellung der Abkürzung „GJ“ in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert werden (<http://www.genenames.org/genefamily/gj.php>). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Connexin Proteine Cx39, Cx43 und Cx45 werden von den Genen Gjd4, Gja1 und Gjc1 kodiert.

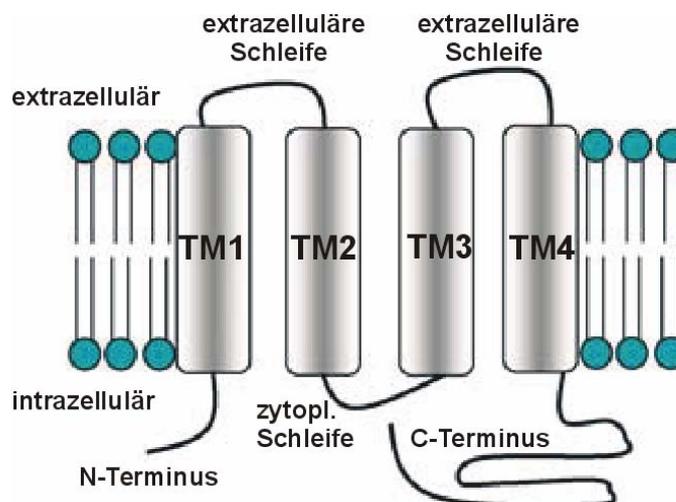


Abb.1.2: Schematische Darstellung eines Connexins (verändert nach Wagner, 2008)

Ein Connexin-Protein setzt sich aus vier α -helikalen Transmembranregionen (TM), zwei extrazellulären und einer zytoplasmatischen Schleife sowie einem zytoplasmatisch gelegenen Carboxy-Terminus (C-Terminus) und einem Amino-Terminus (N-Terminus) zusammen. Jeweils drei konservierte Cystein-Reste befinden sich in den extrazellulären Schleifen und dienen über die Bildung intramolekularer Disulfid-Bindungen vermutlich der Stabilisierung der Connexone, so dass das Andocken zweier Halbkanäle ermöglicht wird.

Die deutlichsten Unterschiede zwischen den Connexin-Proteinen finden sich in der zytoplasmatischen Schleife sowie im C-Terminus (Saez et al., 2003), die für die Regulation der Kanaleigenschaften von besonderer Bedeutung sind. Die meisten Interaktionen mit anderen Proteinen erfolgen über den C-terminalen Bereich, so z.B. die Interaktion des Cx43 mit ZO-1 (Giepmans et al., 2001). Die Oligomerisierung der meisten Connexine erfolgt im Golgi-Apparat (Laird, 2006), sie gelangen als Halbkanäle in die Zytoplasmamembran, bis sie am Rand in bereits bestehenden Gap Junction Plaques eingebaut und stabilisiert werden (Gaietta et al., 2002). Der Abbau der Connexine geschieht über annuläre Gap Junctions sowie lysosomalen oder proteasomalen Abbau (Jordan et al., 2001; Musil et al., 2000).

1.1.2 Funktion der Gap Junction Kanäle

Durch Gap Junction Kanäle wird eine elektrische sowie metabolische Kopplung zwischen benachbarten Zellen ermöglicht. Die von den Connexinen gebildete Pore erlaubt die passive Diffusion von Ionen, Zweitbotenstoffen wie z.B. Ca^{2+} oder cAMP (Bedner et al., 2006) und kleinen Metaboliten mit einer Größe von bis zu 1,8 kDa (Nicholson et al., 2000; Neijssen et al., 2005). Kürzlich wurde auch die Diffusion kurzer siRNS Moleküle durch Gap Junction Kanäle nachgewiesen (Valiunas et al., 2005). Die Kanäle unterscheiden sich entsprechend ihrer Zusammensetzung aus den verschiedenen Connexin-Isoformen sowohl in ihrer Permeabilität wie auch in ihrer Einzelkanalleitfähigkeit (Goldberg et al., 2004; Mese et al., 2007). Fast alle eukaryontischen Zellen sind miteinander über Gap Junction Vollkanäle verbunden, Ausnahmen bilden Spermien, adulte Skelettmuskelfasern sowie Erythrozyten (Willecke et al., 2002). Neben den Gap Junction Vollkanälen existieren auch funktionale Halbkanäle, die zu einer ATP-Ausschüttung führen können (Stout et al., 2004; Locovei et al., 2006; Dobrowolski et al., 2006).

In neuronalen Geweben dienen die Gap Junction Kanäle der schnellen Reizweiterleitung (Zoidl und Dermietzel, 2002) sowie der Synchronisation der Neuronen (Landisman et al. 2002). Im Arbeitsmyokard fungieren die Gap Junctions als „elektrische Synapsen“ und gewährleisten so die synchrone Kontraktion (Severs et al., 2004). Der Verlust eines Connexingens kann zu Störungen der Embryonalentwicklung führen wie durch gezielte Ausschaltung des Gjc1 Gens (Cx45) im Mausmodellsystem gezeigt werden konnte (Krüger et al., 2000). Mutationen in humanen Connexingenen können zu Erkrankungen führen, beispielsweise. können Mutationen im Gja1 Gen (Cx43) die Erkrankung ODDD (Oculodentodigitale Dysplasie) beim Menschen auslösen (Paznekas et al., 2003). Die unterschiedlichen Eigenschaften der Connexingene haben auch zur Folge, dass der Ersatz eines Connexingens durch ein anderes dessen Funktion nicht vollständig übernehmen kann (Winterhager et al., 2007; Plum et al., 2000). In bestimmten Geweben wird den Connexinen auch eine Funktion als Tumorsuppressoren zugeschrieben (Zhang et al., 2003; Krysko et al., 2005).

1.1.3 Regulation der Gap Junction Kanäle

Der Öffnungs- und Schließmechanismus der Gap Junction Kanäle wird auf unterschiedliche Weise gesteuert. Zum einen kann die Öffnungswahrscheinlichkeit durch Phosphorylierung reguliert werden (Lampe und Lau, 2000; Saez et al., 2003; King und Lampe, 2005), zum anderen bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über eine physiologische Konzentration hinaus einen Verschluss der Gap Junction Kanäle (Peracchia 2004). Des Weiteren kann das Schließen der Kanalpore in Abhängigkeit von der Spannung (van Veen et al., 2001) oder dem pH-Wert (Peracchia 2004) erfolgen. Eine Reduktion des intra- oder extrazellulären pH-Werts kann bei einer Ischämie des Herzens auftreten. Auch dies führt zum Verschluss der Gap Junction Kanäle (Spray und Burt, 1990; Francis et al., 1999).

Für Connexone, die aus Cx43 gebildet werden, wurde das „Ball an der Kette“-Modell postuliert (Delmar et al., 2004), bei dem ein Teil des C-Terminus als „Ball“ die hydrophile Kanalpore verschließt. Das „Irisblenden-Modell“ hingegen geht von einer Drehung der Connexone aus, die eine Änderung des Neigungswinkels der Connexine zueinander bewirkt, welche zu einem Verschluss des Kanals führt (Unwin und Ennis, 1983; Perkins et al., 1998).

Neben der Regulation des Öffnungszustands der Gap Junction Kanäle erfolgt die Regulation über die Degradation der Connexin Proteine. Dieser Mechanismus ist ebenfalls phosphorylierungsabhängig (Musil et al., 2000); die Connexine weisen eine sehr kurze Halbwertszeit von ein bis fünf Stunden auf (Saffitz et al., 2000).

1.2 Ausprägungsmuster des murinen Connexin39

Das Gjd4 Gen (Cx39) ist auf Chromosom 18 der Maus lokalisiert; das menschliche orthologe GJD4 Gen (Cx40.1) wurde durch Datenbankanalysen von Eiberger et al. (2001) gefunden. Diese beiden Connexine weisen eine Sequenzidentität von 61% auf DNS-Ebene bzw. von 56% auf Proteinebene auf (von Maltzahn, Diplomarbeit 2003). Die kodierende Region des Gjd4 Gens (Cx39) liegt – wie auch bei GJD4 – auf Exon1 und Exon2 verteilt vor.

Während der Embryogenese konnte die Expression des murinen Connexin39 (Cx39) auf Transkript- und Proteinebene nachgewiesen werden (von Maltzahn et al., 2004). In adulten Geweben der Maus konnten weder das Cx39 Transkript noch das Cx39

Protein nachgewiesen werden (von Maltzahn, Diplomarbeit, 2003). In der Ratte wurde das rCx39 Transkript während der Skelettmuskelentwicklung im Embryo wie auch während des Muskelregenerationsprozesses im adulten Tier in Myogenin-positiven Zellen gezeigt (Belluardo et al. 2005). Allerdings wurde die Lokalisation des Cx39 Proteins weder im Embryo noch während des Muskelregenerationsprozesses bestimmt.

1.3 Transgene Mäuse und Reportergene

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung eines Gens *in vivo* werden häufig transgene Mäuse eingesetzt, bei denen entweder die kodierende Region eines Gens entfernt oder durch ein anderes Gen ersetzt wurde (Bradley et al., 1998; Shashikant und Ruddle, 2003). Hierzu können verschiedene Techniken angewandt werden (Nagy et al., 2003), von denen die in dieser Arbeit eingesetzten kurz erläutert werden.

1.3.1 Erzeugung Gen-defizienter Mäuse durch homologe Rekombination

Durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen wird der Austausch eines Gens mit Hilfe eines Austauschvektors erreicht (Nagy et al., 2003). Durch doppeltes Überkreuzen („crossing over“) der flankierenden homologen Bereiche mit den endogenen Homologiebereichen wird die Zielsequenz durch die transgene Sequenz im Genom der embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) ersetzt. Da die Rekombinationsfrequenz relativ gering ist ($1:10^6$ bis $1:10^7$) erfolgt die Anreicherung homolog rekombinierter ES-Zellen durch Selektion mittels eingebrachter Resistenzgene. Die *in vitro* veränderten ES-Zellen behalten ihre Totipotenz (Martin, 1981; Evans und Kaufman, 1981) und können nach erfolgreicher homologer Rekombination in Blastozysten eingebracht werden. Diese werden dann in scheinchwangere Mäuse implantiert. Die daraus hervorgegangenen Chimären können zur Erzeugung heterozygot transgener Tiere eingesetzt werden (Nagy et al., 2003).

Soll das Zielgen nur in bestimmten Zelltypen oder induzierbar ausgeschaltet werden, bedient man sich häufig des Cre-loxP oder des Flp-frt Systems (Lewandoski, 2001; Kühn und Schwenk, 1997).

1.3.2 Das Cre-loxP/Flp-frt System zur Gendeletion

Sowohl das Cre-loxP wie auch das Flp-frt System beruhen auf Rekombinasen (Cre bzw. Flp), die zwei 34 bp lange das Zielgen flankierende DNS-Erkennungssequenzen (loxP bzw. frt) erkennen und binden können (Abb.1.3A). Die Erkennungssequenzen loxP („locus of X-crossing over P1“) bzw. frt („flp-recombinase recombination target“) bestehen aus zwei 13 bp langen invertierten Sequenzwiederholungen, die eine 8 bp lange Kernsequenz („core sequence“) beinhalten, welche die Orientierung der Erkennungssequenz bestimmt (Lewandoski, 2001). Bei gleicher Orientierung der Erkennungssequenzen kommt es nach Cre- bzw. Flp-vermittelter Rekombination zur Deletion der markierten DNS-Sequenz (Abb.1.3B). Zu einer Inversion der markierten DNS-Sequenz führt eine Rekombination bei gegenläufiger Orientierung der Erkennungsstellen (Nagy, 2000; Tronche et al., 2002). Die Cre-Rekombinase („causes recombination“) stammt aus dem Bakteriophagen P1 (Hoess und Abremski, 1984), während die Flp-Rekombinase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert wurde (Buchholz et al., 1998). Beide Rekombinasen sind als Dimere aktiv, die keine Hilfsproteine benötigen (Lewandoski, 2001).

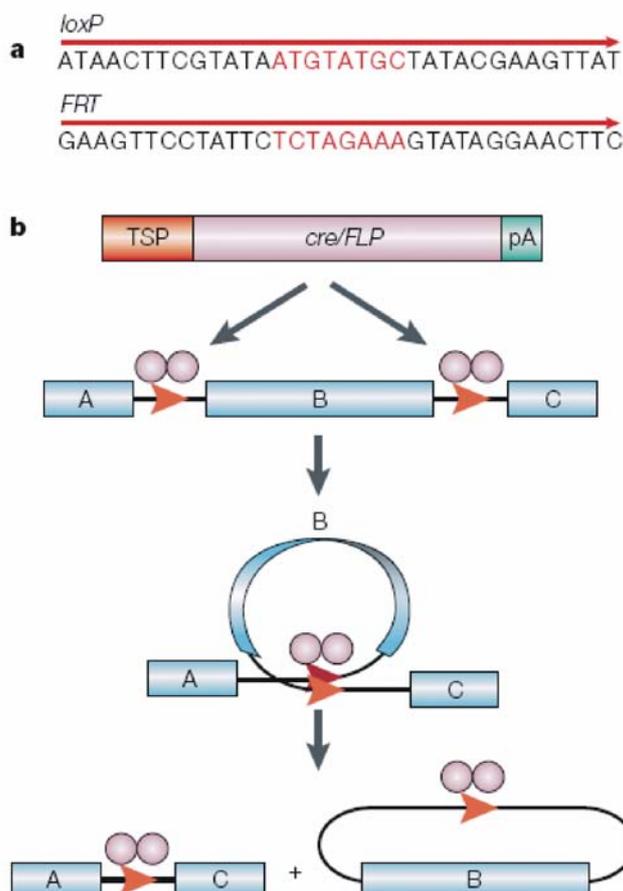


Abb.1.3: Schematische Darstellung des Cre/loxP und Flp/frt Rekombinationssystems (Lewandoski, 2001). (A) Die 34 bp großen loxP und frt Stellen bestehen aus zwei invertierten 13 bp langen Wiederholungen und einer 8 bp langen Kernsequenz (rot), die die Orientierung bestimmt. (B) Die Dimere der Cre oder Flp Rekombinase binden an ihre Erkennungsstellen und vermitteln das Ausschneiden der Zielsequenz zwischen den beiden loxP bzw. frt Stellen wenn beide in die gleiche Richtung orientiert sind.

1.3.3 Erzeugung transgener Mäuse mit Hilfe bakterieller artifizieller Chromosomen (BAC)

Zur funktionellen Analyse eines Gens *in vivo* wird häufig modifizierte genomische DNS in die Keimbahn transferiert, um so transgene Tiere zu erzeugen (Jaenisch, 1988). Hierbei spielt die Größe der inserierten Sequenz eine entscheidende Rolle wie Experimente an *Drosophila* und Mäusen gezeigt haben (Dillon et al., 1993; Kennison, 1993). Es wurde nachgewiesen, dass die höchstmögliche Gewebespezifität unabhängig vom Integrationsort dann erreicht wird, wenn auch Verstärker und Kontrollregionen (bis zu 50 kb entfernt) des Transgens inseriert werden (Heintz, 2001).

Soll ein Transgen mit seinen gesamten regulativen Sequenzen in ein Genom inseriert werden, kann man sog. BACs („bacterial artificial chromosome“) verwenden. BACs sind Derivate der Fertilitätsplasmide aus *E.coli* (Shizuya et al., 1992; Ioannou et al., 1994; Zimmer et al., 1997) und können bis zu 300 kb genomische DNS beinhalten. Mit Hilfe der BACs kann eine zelltypspezifische Expression eines Transgens in Mäusen erreicht werden (Yang et al., 1997).

Zur Modifikation der BACs kann man ein System der homologen Rekombination in *E.coli* einsetzen, welches auf der Verwendung eines sog. „Shuttlevektors“ mit einem temperatursensitiven Replikationsursprung beruht (Abb.1.4; O'Connor et al., 1989; Hamilton et al., 1989). Der Vektor kann fast ausschließlich in Bakterien repliziert werden, die bei 30°C wachsen, er geht in den Bakterienzellen verloren, wenn die Temperatur auf 42-44°C – die sog. „Restriktionstemperatur – erhöht wird. Die eingesetzten Bakterien sind für das Rekombinationsprotein RecA defizient. Zur Überwindung dieser Rekombinationsdefizienz beinhaltet der „Shuttlevektor“ die Sequenz für das RecA Gen, so dass es fast ausschließlich in den transformierten Bakterien zur homologen Rekombination kommt. Des Weiteren befindet sich in dem „Shuttlevektor“ neben einem Antibiotika-Resistenzgen (Tetrazyklin-Resistenzgen) eine Rekombinationskassette, die aus der zu inserierenden DNS-Sequenz sowie zwei flankierenden DNS-Sequenzstücken (jeweils ca. 500 bp) besteht.

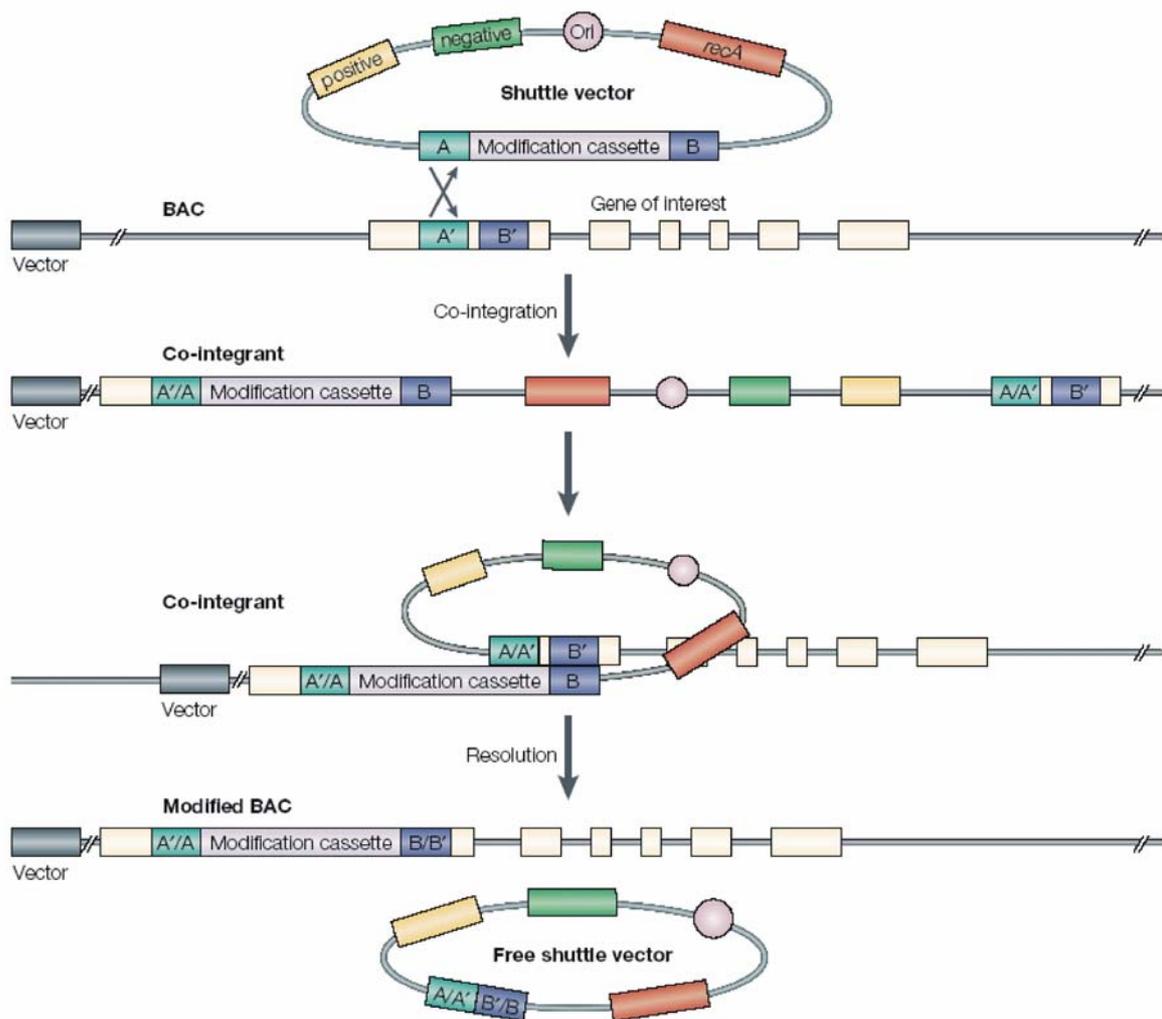


Abb.1.4: Veränderung eines BACs durch homologe Rekombination (Heintz, 2001).

Die Eigenschaften des „Shuttlevektors“ beinhalten: *recA*, *Ori* (einen konditionalen Replikationsursprung), einen positiven Selektionsmarker (Tetrazyklin), einen negativen Selektionsmarker; die Homologien A und B sind identisch zu den Sequenzen A' und B' im BAC, die Modifikationskassette enthält die funktionellen Elemente, die in den BAC inseriert werden sollen. Der BAC enthält ein Resistenzgen (Chloramphenicol). Der erste Schritt der homologen Rekombination wird als Cointegration bezeichnet, der zweite als Freisetzung („resolution“). Hierdurch entsteht der modifizierte BAC.

Für die Transformation mit dem „Shuttlevektor“ werden *E.coli* Bakterien eingesetzt, die schon den zu modifizierenden BAC enthalten, der neben der genomischen Sequenz ebenfalls ein Resistenzgen (Chloramphenicol-Resistenzgen) enthält. Nach der Transformation werden die Bakterien bei 30°C auf Agarplatten inkubiert, die beide Antibiotika (Chloramphenicol, Tetrazyklin) enthalten. Aufgrund des nun exprimierten *RecA* Proteins kann die homologe Rekombination zwischen dem „Shuttlevektor“ und dem BAC erfolgen. Die hieraus entstehenden rekombinanten DNS-Moleküle werden als Cointegrate bezeichnet. Durch Erhöhung der Temperatur

auf 43°C erfolgt eine Selektion auf die Cointegrate. Auch hier finden wieder Rekombinationsereignisse statt, die in der Erzeugung des gewünschten veränderten BACs enden können. Dieser BAC beinhaltet dann nur die Zielsequenz aus dem „Shuttlevektor“. Das Tetrazyklin-Resistenzgen sowie das RecA Gen und das restliche Rückgrat des „Shuttlevektors“ liegen als zirkuläres Plasmid in der Zelle vor und werden abgebaut. Allerdings können bei diesem Rekombinationsschritt auch wieder der ursprüngliche BAC und der „Shuttlevektor“ entstehen. Durch die Zugabe von Fusarinsäure in das Wachstumsmedium erfolgt eine Selektion auf die Bakterien, die kein Tetrazyklin-Resistenzgen mehr exprimieren. Im letzten Schritt der homologen Rekombination verlieren die Bakterien auch das RecA Gen und damit die Fähigkeit zur homologen Rekombination, wodurch die entstandenen BACs sehr stabil sind. Dieses System der Modifikation von BACs durch homologe Rekombination unter Verwendung eines „Shuttlevektors“ wurde 1997 erstmals von Yang et al. beschrieben. Der modifizierte BAC wird in befruchtete Oozyten der Maus injiziert, hier findet eine zufällige Integration in das Genom der Oozyte statt (Gordon und Ruddle, 1981).

1.3.4 eGFP als Reporter gen

Häufig soll neben der Ausschaltung eines Kandidatengens ein Reporter gen unter der Kontrolle seines Promotors exprimiert werden. Das eGFP („enhanced green fluorescent protein“) aus der Qualle *Aequoria victoria* ist hierzu besonders gut geeignet (Chalfie et al., 1994). Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm wird Licht der Wellenlänge 509 nm emittiert. Dies ermöglicht den Nachweis des eGFP *in vivo*. Außerdem können Fusionsproteine mit eGFP erzeugt werden, um die Lokalisation eines Proteins in der Zelle *in vivo* nachzuweisen. Für Connexine wurden zahlreiche Fusionsproteine mit eGFP oder seinen durch Mutagenese entstandenen Varianten (Tsien, 1998) in HeLa Zellen exprimiert (Martin et al., 2001; Falk und Lauf, 2001). Befindet sich das eGFP am C-Terminus des Connexins, gelangt das Fusionsprotein an die Plasmamembran. In den meisten Fällen können auch keine Unterschiede im Transfer von Farbstoffen sowie in den elektrophysiologischen Eigenschaften der hieraus entstandenen Gap Junction Kanäle festgestellt werden. Es wurde außerdem eine transgene Mauslinie erzeugt, die ein Fusionsprotein aus Cx36 und eGFP unter Kontrolle des Cx36 Promotors exprimiert (Feigen span et al., 2004).

1.4 Phänotypische Veränderungen Connexin-defizienter Mäuse

Zur Untersuchung der Funktion bestimmter Connexine bei der Ausbildung der Gap Junction Kanäle können transgene Mäuse eingesetzt werden, bei denen gezielte Veränderungen in das zu untersuchende Connexin-Gen eingebracht wurden.

Die Cx43^{Cx26/Cx26} Mauslinie

Bei dieser Mauslinie wurde zur Untersuchung der funktionellen Redundanz der Connexine die kodierende Region des Gja1 Gens (Cx43) durch das offene Leseraster des Gjb2 Gens (Cx26) ersetzt (Winterhager et al., 2007). Die Cx43^{Cx26/Cx26} Tiere weisen eine verlangsamte ventrikuläre Reizweiterleitung im Herzen auf. Sowohl männliche wie weibliche Tiere sind infertil; sie sind durch hypertrophische Gonaden gekennzeichnet, die sich in einer beeinträchtigten Gametogenese auswirken.

Die Cx43^{Cx32/Cx32} Mauslinie

Auch bei dieser Mauslinie wurde die kodierende Region des Cx43 durch die eines anderen Connexins – hier Cx32 – ersetzt (Plum et al., 2000). Im Herzen dieser Tiere wurden Abnormalien am Ventrikel des Herzens nachgewiesen; die homozygoten Tiere sind ebenfalls infertil.

Die Cx43^{TetOeGFP}:MCKtTA Mauslinie

Zur Untersuchung der Expression des Cx43 Proteins in adulten Muskelfasern wurden Cx43TetOeGFP Mäuse (Döring Dissertation, 2005) mit MCKtTA Mäusen (Ahmad et al., 2000) verpaart. Mit Hilfe des TetOFF Systems wird in allen Zellen, die die Muskel-Kreatin-Kinase (MCK) exprimieren – Myotuben und adulte Muskelfasern – das Cx43 Protein wie auch das eGFP Reporter gen exprimiert. Die doppelt transgenen Mäuse zeigen in isometrischen Kontraktionsstudien eine erhöhte relative Kraft im Vergleich zu den einfach transgenen Tieren (D. Wenzel, persönliche Mitteilung).

1.5 Der Skelettmuskel

Der Skelettmuskel dient im Gegensatz zur glatten Muskulatur oder der Herzmuskulatur der willkürlichen, aktiven Körperbewegung. Er ist von einer Bindegewebsschicht, der Faszie, umgeben. Die einzelnen Sekundärbündel (Fleischfasern) sind ebenfalls von Bindegewebe, dem Epimysium und dem Perimysium umschlossen, welches von Nerven und Blutgefäßen durchsetzt und mit der Faszie verbunden ist (Abb.1.5). Ein Sekundärbündel setzt sich aus mehreren Faserbündeln zusammen, welche gegeneinander verschiebbar sind und vom Endomysium umgeben werden. Jede Muskelfaser ist aus Myofibrillen aufgebaut, welche sich wiederum aus den Myofilamenten zusammensetzen.

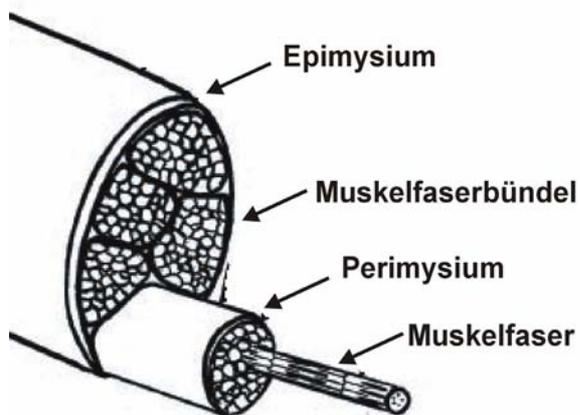


Abb.1.5: Aufbau des Skelettmuskels (verändert nach Chargé und Rudnicki, 2004).

Der Skelettmuskel lässt sich in einzelne Muskelfaserbündel unterteilen, die wiederum aus den Muskelfasern bestehen.

Die Muskelfasern lassen sich anhand verschiedener Kriterien einteilen. Zum einen wird aufgrund der enzymatischen Ausstattung zwischen langsamen (Typ I) und schnellen (Typ II) Fasern unterschieden. Zum anderen teilt man die Muskelfasern ihren Kontraktionseigenschaften nach in langsam („slow twitch“) und schnell zuckende („fast twitch“) Fasern ein. Eine dritte Einteilung erfolgt nach der Färbung der Muskelfasern, rote Fasern entsprechen den langsam zuckenden Fasern, weiße Fasern den schnell zuckenden.

1.5.1 Aufbau des Skelettmuskels

Der Skelettmuskel setzt sich aus zwei Haupttypen an Zellen zusammen, den Muskelfasern und den Satellitenzellen. Die Muskelfasern bilden ein funktionelles Synzytium mit in der Peripherie gelagerten Zellkernen, denen die Satellitenzellen –

eine heterogene Population undifferenzierter mononukleärer Zellen - aufgelagert sind (Chargé und Rudnicki, 2004). Im unverletzten Muskel liegen die Satellitenzellen unter der Basalmembran in einer Art Ruhezustand. Die Satellitenzellen stellen keine homogene Population dar, doch ist ihnen die Expression von Pax3 und Pax7 gemeinsam (Buckingham et al., 2003). Für die Entstehung der Satellitenzellen gibt es zwei Hypothesen. Zum einen wird ein somatischer Ursprung, zum anderen ein endothelialer Ursprung diskutiert (De Angelis et al., 1999; Chargé und Rudnicki, 2004).

Nach einer Muskelverletzung werden die Satellitenzellen aktiviert, sie verlassen ihren Ruhezustand und proliferieren bevor sie migrieren und mit den verletzten Muskelfasern verschmelzen (Hawke and Garry, 2001). Bei der Teilung der Satellitenzellen entstehen zwei Zellen, die eine Zelle differenziert weiter, die andere dient der Erneuerung der Satellitenzell-Population (Cossu and Tajbakhsh, 2007).

1.5.2 Entwicklung des Skelettmuskels

Die Entwicklung des Skelettmuskels ist durch eine Sequenz zellulärer Ereignisse gekennzeichnet, die mit der myogenen Linie der multipotenten Vorläuferzellen aus dem paraxialen Mesoderm verbunden sind (Pourquie, 2001). Diese somitischen Zellen differenzieren entlang der dorso-ventralen Achse, wodurch das dorsal gelegene Dermomyotom (Abb.1.6) und das Sklerotom gebildet werden (Parker et al., 2003). Aus dem Dermomyotom entsteht zum einen die Haut, zum anderen die Skelettmuskeln der Extremitäten und des Rumpfes, während das Sklerotom die Knochen bildet (Asakura et al, 2001). Die myogenen Vorläuferzellen des Dermomyotoms sind durch die Expression der Transkriptionsfaktoren Pax3, Pax7 und Myf5 gekennzeichnet (Parker et al., 2003).

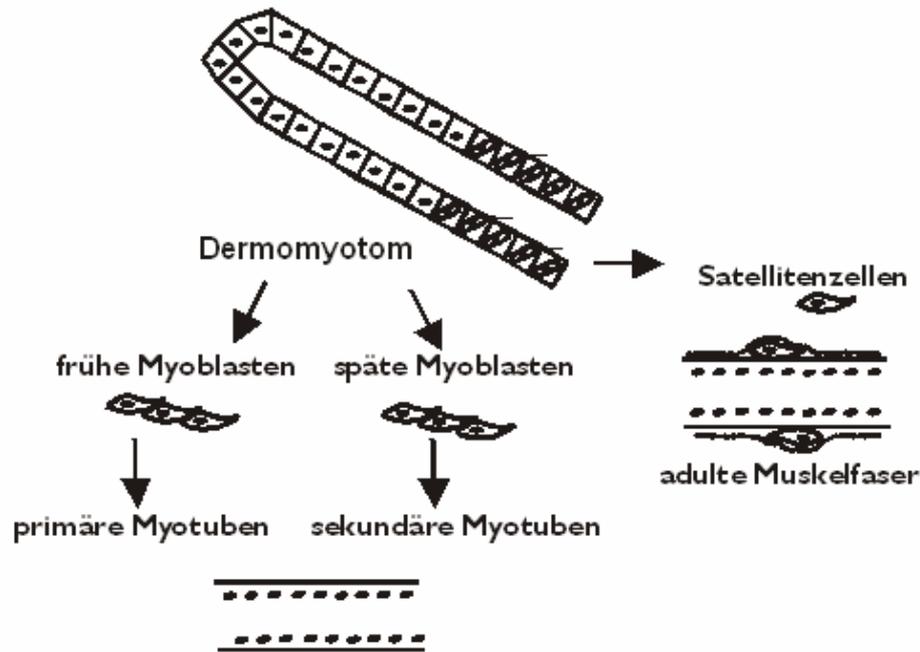


Abb.1.6: Schematische Darstellung der Skelettmuskelentwicklung in Vertebraten (verändert nach von Maltzahn und Willecke, 2005)

Während der Embryonalentwicklung entstehen aus dem Dermomyotom sowohl die frühen und späten Myoblasten wie auch die Satellitenzellen, die unter der Basallamina, welche die adulten Muskelfasern umgibt, lokalisiert sind.

Die Determinierung der myogenen Vorläuferzellen resultiert in der Entwicklung der replikativen Myoblasten. Die terminale Differenzierung dieser replikativen Myoblasten ist durch die Expression von MyoD und Myf5 sowie durch Zellfusion gekennzeichnet, die zu den multinukleären Myotuben führt (Ordahl et al., 2000). Für die Transkriptionsfaktoren MyoD und Myf5 wird eine Funktion in der Determinierung der Myoblasten postuliert, während für Myogenin und MRF4 eine Funktion bei der terminalen Differenzierung (Abb.1.7), welche mit einem Austritt aus dem Zellzyklus einhergeht, vermutet wird (Andrès und Walsh, 1996; Hawke und Garry, 2001).

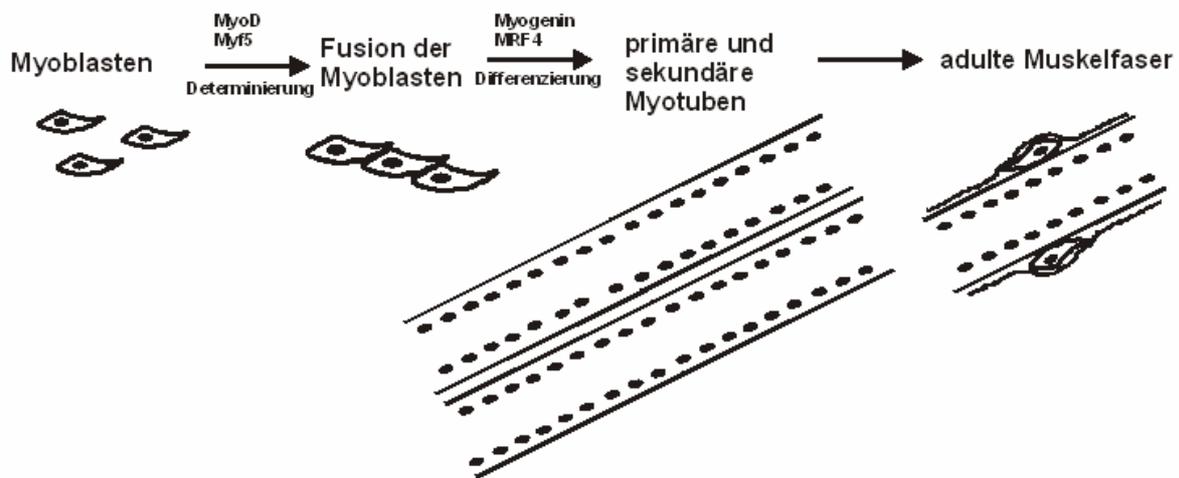


Abb.1.7: Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren während der Myogenese der Maus (verändert nach von Maltzahn und Willecke, 2005)

Durch die Fusion der Myoblasten entstehen die primären Myotuben (frühe Myotuben), welche durch Fusion mit weiteren Myoblasten zu den sekundären Myotuben werden. Ca^{2+} -abhängige Proteasen wie Calpaine (Dedieu et al., 2002) sind während des Fusionsprozesses aktiv, vermutlich dienen sie der Spaltung der Proteine der extrazellulären Matrix oder Proteinen des Zytoskeletts wie Fibronectin oder Desmin (Dourdin et al., 1999). Die Myoblasten lagern sich bei geringen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen aneinander, fusionieren aber erst, wenn die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt (Friday et al., 2000; Przybylski et al., 1994). Kurz vor der Fusion der Myoblasten erhöht sich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (Seigneurin-Venin et al., 1996), wodurch die Fusion der Myoblasten ausgelöst wird (Horsley und Pavlath, 2004). Die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bleibt auch in den neu gebildeten Myotuben erhalten (Constantin, 1996). Bei vielen Prozessen, die mit der Fusion der Myoblasten einhergehen, scheinen Ca^{2+} -Ionen beteiligt zu sein, so z.B. bei Oberflächeninteraktionen über M-Cadherin oder an Protease-Aktivitäten (Constantin und Cronier, 2000). Die Fusion der Myoblasten ist weiterhin von der Beteiligung der Na^+/K^+ -Pumpe, der Acetylcholin-geregelten Nikotin-Rezeptor-Kanäle wie auch der Expression des Cx43 abhängig (Constantin und Cronier, 2000; von Maltzahn und Willecke, 2005).

1.5.3 Regeneration des Skelettmuskels

Der Skelettmuskel ist eines der regenerationsfähigsten Organe des Körpers der Säugetiere. Die degenerative Phase der Muskelregeneration beginnt mit der Nekrose der verletzten Muskelfasern. Die Zerstörung des Sarcolemmas der Muskelfasern resultiert in einer gesteigerten Permeabilität der Muskelfasern (Chargé und Rudnicki, 2004). Dies wiederum führt zu einem gesteigerten Ca^{2+} -Influx, wodurch die Ca^{2+} -Homeostase gestört wird. Eine Hypothese geht davon aus, dass Ca^{2+} -abhängige Proteolyse, z.B. durch Calpaine, die Degeneration des Gewebes vorantreibt (Belcastro et al., 1998; Alderton und Steinhardt, 2000).

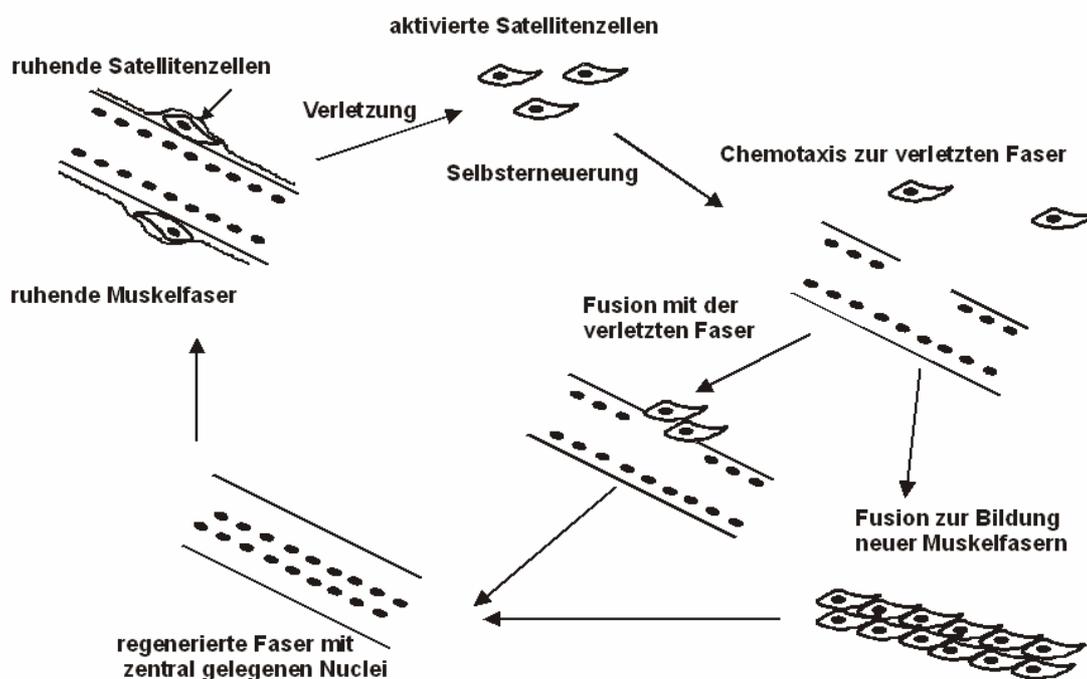


Abb.1.8: Prozess der Muskelregeneration (verändert nach von Maltzahn und Willecke, 2005)

Als Antwort auf eine Verletzung der Muskelfaser werden die Satellitenzellen an der Basalmembran aktiviert und beginnen mit der Proliferation. Durch den Prozess der Selbsterneuerung erfolgt die Erneuerung der ruhenden Satellitenzell-Population. Andere Satellitenzellen migrieren durch Chemotaxis stimuliert zur verletzten Faser oder fusionieren miteinander, so dass neue Muskelfasern entstehen.

Dem Prozess der Muskeldegeneration folgt der Regenerationsprozess (Abb.1.8). Die erhöhte Anzahl myogener Zellen (Satellitenzellen) bietet ein ausreichendes Reservoir für die Muskelreparatur (Grounds, 2002). Diese myogenen Zellen proliferieren und fusionieren nach der Differenzierung entweder mit verletzten Muskelfasern (Hypertrophie) oder bilden neue Muskelfasern (Hyperplasie) aus (Hawke und Garry, 2001). Die neu gebildeten Muskelfasern unterscheiden sich

morphologisch von unverletzten Fasern durch ihren geringeren Durchmesser und die zentral gelegenen Zellkerne (Chargé und Rudnicki, 2004). Die Fusion der myogenen Zellen erfolgt fokussiert an den Stellen, an denen die Verletzung aufgetreten ist (Blaveri et al., 1999). Allerdings ist die Aktivierung der Satellitenzellen nicht auf den Bereich beschränkt, der verletzt wurde. Es wurde auch die Rekrutierung von Satellitenzellen benachbarter Muskeln beobachtet, allerdings nur, wenn auch das Bindegewebe zwischen den einzelnen Muskeln beschädigt war (Chargé und Rudnicki, 2004). Der Prozess der Aktivierung der Satellitenzellen zeigt deutliche Parallelen zur embryonalen Muskelentwicklung. In beiden Fällen spielen MyoD, Myogenin sowie Myf5 eine wichtige Rolle (Chargé und Rudnicki, 2004; Hawke und Garry, 2001). Nach der Fusion der myogenen Zellen vergrößert sich der Umfang der neu gebildeten Muskelfasern. Die Zellkerne wandern in die Peripherie der Muskelfaser, wodurch sich die neu gebildeten Muskelfasern nun nicht mehr von den unverletzten Muskelfasern unterscheiden.

1.5.4 Connexine während der Skelettmuskelentwicklung und –regeneration

Gap Junctions wurden sowohl zwischen interagierenden Myoblasten wie auch zwischen Myoblasten und Myotuben und zwischen den Myotuben in sich entwickelnden Hühnchen- und Rattenmuskeln durch Elektronenmikroskopie nachgewiesen (Ling et al. 1992; von Maltzahn und Willecke, 2005). Dies legte den Schluss nahe, dass während der gesamten Skelettmuskelentwicklung Gap Junctions ausgebildet werden. Bisher wurden die Connexine Cx39, Cx40 sowie Cx43 während der Myogenese nachgewiesen (von Maltzahn et al., 2004; Belluardo et al., 2005; Dahl et al., 1995; Araya et al., 2003). Die durch *in situ* Hybridisierungsexperimente nachgewiesene Expression des Cx40 in sich entwickelnden Myoblasten und Myotuben (Dahl et al., 1995) konnte durch weitere Analysen nicht bestätigt werden (von Maltzahn et al., 2006).

Das Expressionsmaximum des Cx43 Proteins liegt kurz vor der Fusion der Myoblasten (von Maltzahn und Willecke, 2005) wenn die Zellen in die terminale Differenzierung übergehen (Constantin und Cronier, 2000). Diese Untersuchungen wurden sowohl mit L6 Myoblasten wie auch mit C₂C₁₂ Zellen, einer etablierten aus Satellitenzellen entstandenen Zelllinie, durchgeführt (Constantin und Cronier 2000; Araya et al., 2003). Durch Farbstoffkopplungsexperimente mit Lucifer Yellow

zwischen L6 Myoblasten konnte gezeigt werden, dass sich funktionelle Gap Junction Kanäle zwischen den Myoblasten ausbilden (Constantin und Cronier, 2000). Die Verwendung des Gap Junction Blockers Heptanol führte zur reversiblen Blockierung dieses Farbstofftransfers. In Primärzellkulturen konfluenter Ratten-Myoblasten sowie primärer Maus-Myoblasten wurde der gleiche Effekt bei Verwendung des Gap Junction Blockers β -Glycyrrhetinsäure beobachtet (Constantin et al., 1997; Araya et al., 2003). Die Myoblasten fusionieren nicht mehr, so dass sich keine Myotuben ausbilden (Araya et al., 2003), dies konnte auch an Primärzellkulturen aus Cx43^{fl/fl}: Mx-Cre Mäusen nach Induktion der Cre-Rekombinase gezeigt werden (Araya et al., 2005). Auch Farbstoffkopplung zwischen Myoblasten und Myotuben konnte in Zellkultur an L6 Myoblasten sowie an Primärzellkulturen aus Ratten und Mäusen nachgewiesen werden (von Maltzahn und Willecke, 2005). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Gap Junctions transient am Austausch kleiner Moleküle sowie an der elektrischen Kopplung während der lag Phase, die der Fusion der Myoblasten vorangeht, beteiligt sind. Die Gap Junction Kanäle könnten durch Vermittlung elektrischer Kopplung zwischen den Myoblasten zur Koordinierung der Membranpotentiale beitragen und anschließend den Austausch von Zweitbotenstoffen vermitteln, welche für den zeitlichen Ablauf des Fusionsprozesses und die terminale Differenzierung verantwortlich sind (von Maltzahn und Willecke, 2005). Vermutlich diffundieren Ca^{2+} , IP_3 und cAMP durch die Gap Junction Kanäle, da Ca^{2+} und cAMP an der Erlangung der Fusionskompetenz beteiligt sind (Constantin und Cronier, 2000).

Wird Cx43 allerdings in kultivierten murinen Myoblasten (MM14 Myoblasten) unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven viralen Promotors exprimiert, kommt es zum Zelltod im Anschluss an die Differenzierung (Reinecke et al., 2004). Wurden allerdings differenzierte Myotuben transfiziert, konnte kein Zelltod festgestellt werden. Bei Verwendung des Muskel-Kreatin-Kinase Promotors, welcher spezifisch nach der Myozyten Differenzierung aktiv ist, wurde eine starke Expression des Cx43 in differenzierten Myotuben nachgewiesen. Im Gegensatz zu diesen Befunden stehen die Resultate von Suzuki et al. (2001), die die schnellere Fusion und Differenzierung von L6 Myoblasten nach Transfektion mit Cx43 cDNS beschreiben. Erst kürzlich wurde die Regulation des Cx43 durch Sphingosin-1-Phosphat, einen Regulator der Skelettmuskelentwicklung, in C₂C₁₂ Zellen nachgewiesen (Squecco et al., 2006).

Auch während des Regenerationsprozesses sind Gap Junction Kanäle von entscheidender Bedeutung. Die Expression des Cx43 wird bei Verletzung des Tibialis anterior Muskels und anschließender Regeneration hochreguliert (Araya et al., 2005). Das Expressionsmaximum ist an Tag 5 bis 7 nach Verletzung des Muskels zu finden. Das Cx43 Protein konnte sowohl in Satellitenzellen wie auch in endothelialen Zellen nachgewiesen werden. An Tag 7 der Regeneration wurde das Cx43 Protein auch zwischen regenerierten Muskelfasern und neu gebildeten Muskelfasern gefunden. Führt man die gleichen Experimente mit Cx43^{fl/fl}: Mx-Cre Mäusen nach Induktion der Cre-Rekombinase durch, verlängert sich die Dauer des Regenerationsprozesses (Araya et al., 2005). Dies legt nahe, dass Cx43 für den normalen zeitlichen Verlauf des Regenerationsprozesses erforderlich ist.

Neben Cx43 wurde auch die Expression des Cx45 während des Regenerationsprozesses adulter Skelettmuskeln nachgewiesen (Araya et al., 2005). An Tag 3 nach Verletzung ist das Expressionsmaximum des Cx45 Proteins in endothelialen Zellen sowie aktivierten Satellitenzellen zu finden. Nach 5 Tagen konnte Cx45 in verschiedenen Muskelfasern nachgewiesen werden. Auch Cx39 wird im adulten Skelettmuskel nach Verletzung exprimiert wie von Belluardo et al. (2005) an Ratten gezeigt werden konnte.

1.6 Das zentrale Nervensystem

Das Nervensystem der Säugetiere dient der Kommunikation eines Lebewesens mit der ihn umgebenden Umwelt. Die Hauptaufgabe hierbei ist die Erkennung sensorischer Stimuli sowie deren Prozessierung und Interpretation. Das Nervensystem lässt sich in zwei Teile gliedern, das zentrale Nervensystem (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS). Zu dem zentralen Nervensystem gehören das Gehirn und das Rückenmark, welches die Informationen verarbeitet und an das PNS weiterleitet, das sowohl als Rezeptor wie auch als Effektor des ZNS arbeitet.

1.6.1 Zelltypen des zentralen Nervensystems

Im zentralen Nervensystem können zwei unterschiedliche Typen von Zellen unterschieden werden, die Neurone und die Gliazellen. Zu den Gliazellen gehören die Astrozyten, Oligodendrozyten und die Microglia, deren Aufgabe die Vermittlung

der mechanischen Stabilität, die Versorgung der Neurone mit Nährstoffen und die Aufnahme und Wiederverwendung ausgeschütteter Neurotransmitter darstellt (Kandel et al., 1998; Hanssen et al., 2000).

Die Neurone dienen der Informationsaufnahme sowie deren Verarbeitung und Weiterleitung, wobei die Information durch die Frequenz elektrischer Impulse (Aktionspotentiale) kodiert wird. Allerdings wird die Erregbarkeit der Neurone nur durch ein Ionengefälle entlang der Plasmamembran gewährleistet, das durch chemo- und spannungssensitive Ionenkanäle sowie Ionenpumpen verändert wird.

Die Gap Junction Kanäle zwischen Neuronen werden auch als elektrische Synapsen bezeichnet. Im Gegensatz zu den chemischen Synapsen, bei denen ein elektrisches Signal durch Freisetzung eines Neurotransmitters in ein chemisches Signal umgewandelt wird, sind bei den elektrischen Synapsen die Zytoplasmata der benachbarten Neurone miteinander verbunden (Bennett und Zukin, 2004). Die elektrischen Synapsen ergänzen nicht nur die über chemische Synapsen verlaufende Kommunikation zwischen den Neuronen (Bruzzone und Ressot, 1997), sondern führen zur Bildung neuronaler quasi Synzytien. Hier agieren die miteinander gekoppelten Neurone als synchronisierte Einheit, wodurch die nachgeschalteten Nervenzellen präzisere Informationen erhalten (Hormuzdi et al., 2004). Bei Goldfischen wurden auch gemischte Synapsen („mixed synapses“) beschrieben, bei denen sich Gap Junction Kanäle in direkter räumlicher Nähe zu chemischen Synapsen befinden (Pereda et al., 2003). Dies konnte für Cx36 und Cx45 auch in Nagern nachgewiesen werden (Rash et al., 2005; Cachope et al., 2007).

1.6.2 Adulte Neurogenese

Die größte Stammzell-Region im adulten Gehirn ist die Subventrikularzone (Abb.1.9), die zwischen dem lateralen Ventrikel und dem Parenchym des Striatums lokalisiert ist (Vescovi et al., 2006). Eine Untergruppe der Zellen dieser Region exprimiert den astroglialen Marker GFAP („glial fibrillary acidic protein“) und wurde als die putative adulte neuronale Stammzellpopulation dieser Region identifiziert (Doetsch et al., 1999). Diese Zellen werden auch als B-Zellen bezeichnet und stellen die kleinste Untergruppe der Astrozyten-Population dieser Region dar. Aus den adulten neuronalen Stammzellen entwickeln sich die transient teilenden Vorläuferzellen („transient amplifying cells“), auch C-Zellen genannt. Sie behalten ihre Multipotenz

und teilen sich in Vorläufer (A-Zellen), die sich zu Neuronen weiterdifferenzieren. Diese A-Zellen wandern dann in Bündeln durch die rostralen Verlängerungen („rostral migratory stream“) der Subventrikularzone in den Bulbus olfactorius, hier integrieren sie als neue Interneurone in die corticalen Schichten (Vescovi et al., 2006). Neben den oben genannten Zellen befinden sich noch ependymale und endotheliale Zellen im Bereich der Subventrikularzone. Die ependymalen Zellen stellen die Verbindung der Subventrikularzone zum Lumen des Ventrikels dar (Ninkovic und Götz, 2007).

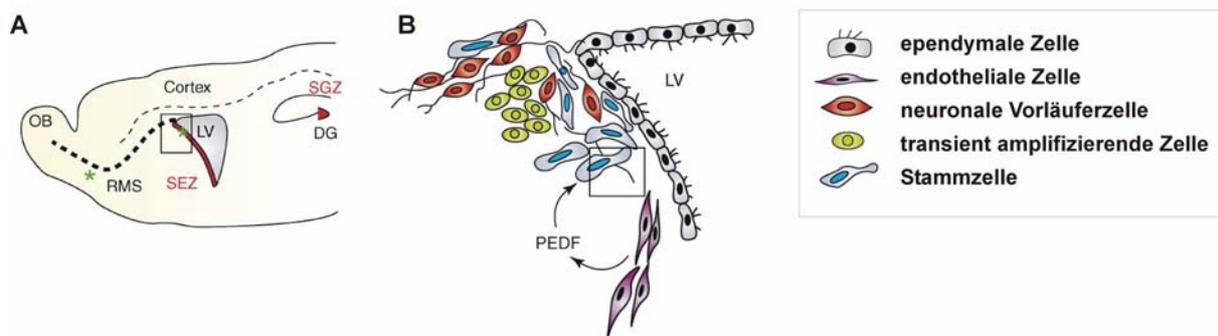


Abb.1.9: Lage (A) und Zelltypen (B) der Subventrikularzone im adulten Gehirn (verändert nach Ninkovic und Götz, 2007). DG: Gyrus dentatus, LV: Lumen des Ventrikels, OB: Bulbus olfactorius, RMS: rostraler Migrationsstrom, SEZ: subependymale Zone, SGZ: subgranuläre Zone.

1.6.3 Connexine im zentralen Nervensystem

In Neuronen des zentralen Nervensystems der Maus konnten bislang vier Connexine, Cx30.2, Cx36, Cx45 und Cx57 nachgewiesen werden (Söhl et al., 2005; Kreuzberg et al., 2008). Das Cx30.2 wird in Somatostatin-positiven GABAergen Interneuronen des Hippocampus und des Cortex sowie im Rückenmark und in der Retina exprimiert (Kreuzberg et al., 2008). Cx36 wird im ganzen adulten Maushirn, im Rückenmark und der Retina ausgebildet (Söhl et al., 1998; Degen et al., 2004; Söhl et al., 2005). Durch die Verwendung transgener Mäuse wurde die Funktion des Cx36 in der inferioren Olive, dem Cerebellum, dem thalamischen retikularen Nucleus und den GABAergen Interneuronen des Cortex und Hippocampus weiter untersucht (Christie et al., 2005; Söhl et al., 2005; Wellershaus et al., 2008). Die stärkste Cx45 Expression im Gehirn der Maus ist während der Embryonalentwicklung zu finden (Cina et al., 2007), sie wird postnatal herunterreguliert, bis sie im adulten Gehirn nur noch in distinkten Bereichen nachweisbar ist (Maxeiner et al., 2003). Im adulten Gehirn wird Cx45 in Korb- und Sternzellen des Cerebellums sowie in Neuronen des

cerebralen Cortex, des Hippocampus und des Thalamus exprimiert (Maxeiner et al., 2003). Cx57 ist das Connexin im zentralen Nervensystem mit der spezialisiertesten Ausprägung, es konnte nur in Horizontalzellen der Retina nachgewiesen werden (Hombach et al., 2004).

Zusätzlich zu den Connexinen wurden Pannexin1 und Pannexin2 in Neuronen des zentralen Nervensystems nachgewiesen (Bruzzone et al., 2003; Vogt et al., 2005; Litvin et al., 2006; Zappalà et al., 2006; Zappalà et al., 2007).

Auch in Gliazellen konnte die Expression verschiedener Connexine analysiert werden. In Astrozyten wird neben Cx43 auch Cx30 exprimiert (Theis et al., 2005). Über die Expression des Cx26 in Astrozyten gibt es widersprüchliche Angaben in der Literatur (Altevogt et al., 2004; Filippov et al., 2003). Die Oligodendrozyten hingegen sind durch die Expression des Cx29, Cx32 und Cx47 gekennzeichnet (Scherer et al., 1995; Odermatt et al., 2003; Altevogt et al., 2002).

1.7 Das Herz – Aufbau und Connexinexpression

1.7.1 Anatomie und Erregungsausbreitung im adulten Herzen

Das aus vier Kammern bestehende Herz der Säugetiere pumpt durch koordinierte Kontraktion sauerstoffreiches Blut aus der Lunge in den Körper und das sauerstoffarme Blut aus dem Körper zur Lunge. Durch Kontraktion des rechten Ventrikels wird das Blut über die Lungenarterien in die Lunge gepumpt. Nach Anreicherung mit Sauerstoff erreicht das Blut über die Lungenvenen das linke Atrium, wo es dann in den linken Ventrikel gepumpt wird (Abb.1.10).

Durch elektrische Aktivierung der Kardiomyozyten wird eine koordinierte Kontraktion des Herzens erreicht. Die gerichtete schnelle Erregungsausbreitung wird dabei vom reizleitenden System bedingt. Der Stimulus zur Erregungsausbreitung geht von den Schrittmacherzentren, dem Sinusknoten und dem AV-Knoten (Atrioventrikular-Knoten) aus. Das primäre Schrittmacherzentrum ist der Sinusknoten, die Erregungswelle breitet sich über die Atrien aus, wo sie im AV-Knoten, dem sekundären Schrittmacherzentrum, abgebremst wird. Die Erregungswelle verläuft weiter über das His'sche Bündel und die Tawara-Schenkel und erreicht schließlich die Oberfläche des Septums zwischen den beiden Ventrikeln. Hier verästelt sich das

reizleitende System in die Purkinje-Fasern, welche das Arbeitsmyokard vollständig durchspannen und so eine optimale Erregungsausbreitung ermöglichen (Abb.1.10).

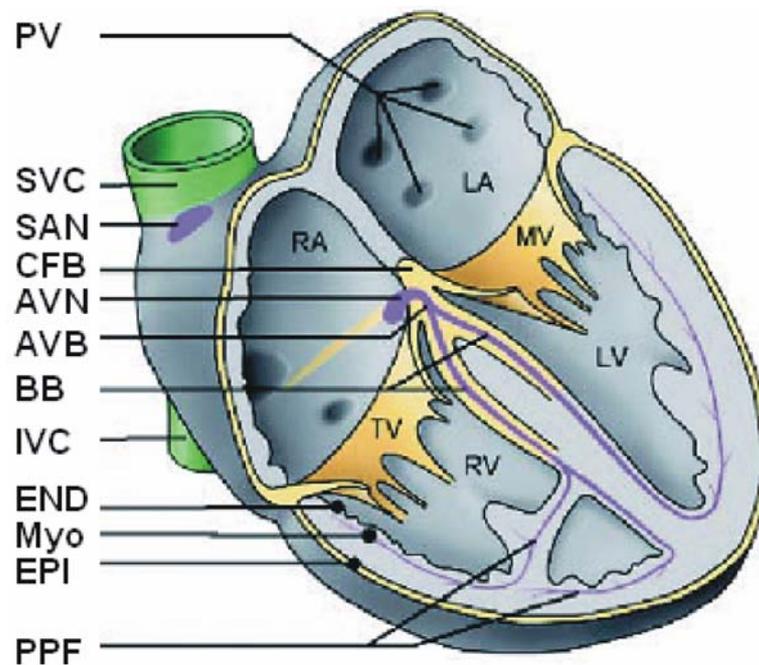


Abb.1.10 Schematische Darstellung des adulten Herzens (verändert nach Moorman und Christoffels, 2003)

Zum atrioventrikulären Reizleitungssystem gehören der AV-Knoten (AVN), die atrioventrikulären Bündel (AVB) und das atrioventrikuläre Ringbündel. A: Atrium, BB: bundle branches (His'sche Bündel), CFB: zentraler fibröser Körper, END: Endokard, EPI: Epikard, IVC: inferiore Vena cava, LA: linkes Atrium, LV: linker Ventrikel, MYO: Arbeitsmyokard, MV: Mitralklappe, PPF: periphere Purkinje-Fasern, PV: Pulmonarvenen, RA: rechtes Atrium, RV: rechter Ventrikel, SAN: Sinus-Knoten, SVC: superiore Vena cava, TV: Trikuspidalklappe.

1.7.2 Connexin-Expression im adulten Herzen

Im Herzen adulter Mäuse konnten vier verschiedene Connexine nachgewiesen werden, welche an der Erregungsausbreitung im Herzen beteiligt sind (Abb.1.11). Das Cx30.2 Protein wird ausschließlich im atrioventrikulären Bündel exprimiert (Kreuzberg et al., 2005), während Cx40 in den Atrien sowie dem reizleitenden System der Ventrikel – His'sche Bündel, Tawara-Schenkel und Purkinje-Fasern – exprimiert wird (Kirchhoff et al., 1998; Coppen et al., 1999). Weiterhin wurde Cx40 in der zentralen Region des AV-Knotens nachgewiesen (Coppen et al., 1999).

Das Cx43 Protein – das am stärksten exprimierte Connexin im Mausherzen – wird in Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards der Atrien und Ventrikel sowie in den distalen

Bereichen der Purkinje-Fasern ausgeprägt (Beyer et al., 1989; Gourdie et al., 1993; Coppen et al., 1999).

In den beiden Schrittmacherzentren des Herzens (Sinus-Knoten und AV-Knoten) sowie in seinen posterioren Ausläufern (His'sche Bündel, Purkinje-Fasern) ist die stärkste Expression des Cx45 zu finden (Coppen et al., 1999; Dobrzynski et al., 2003). Die Expression des Cx45 in Atrien und im Arbeitsmyokard ist umstritten (van Veen et al., 2001).

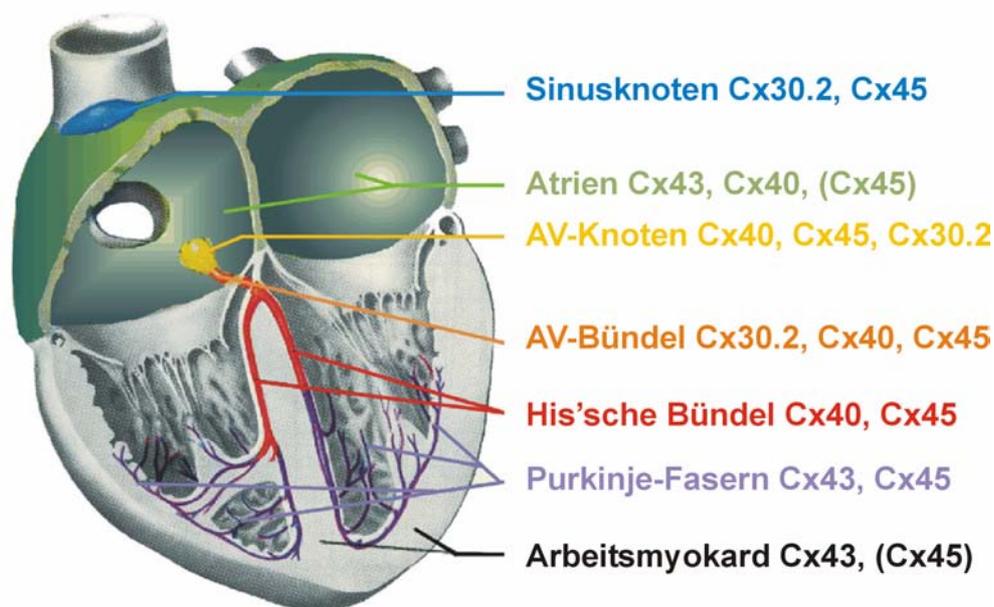


Abb.1.11: Connexin-Expression im adulten Herzen (Schema des humanen Herzens verändert nach Netter, 1993)

Im adulten Herzen der Maus werden vier Connexine exprimiert: Cx30.2, Cx40, Cx43 und Cx45. Widersprüchliche Angaben über die Expression des Cx45 sind in Klammern gesetzt.

1.7.3 Zelltransplantation zur Behandlung ischämischer Herzerkrankungen

Die Zelltransplantation stellt eine potentielle Behandlungsmethode akuter oder chronischer ischämischer Herzerkrankungen dar (Laflamme und Murry, 2005). In klinischen Studien an Patienten werden zur Zeit Knochenmarksstammzellen und Skelettmuskelzellen zur Transplantation eingesetzt (Murry et al., 2005). Die Transplantation der Knochenmarkszellen sowie der Skelettmuskelzellen brachten nur geringfügige Verbesserungen der Herzkontraktion, da keine elektrische Kopplung dieser Zellen mit dem Myokard des Empfängers vorhanden ist (Murry et al., 2004; Leobon et al., 2003) und diese Zellen keine Herzmuskelzell-Eigenschaften aufweisen (Reinecke et al., 2002; Nygren et al., 2004).

Wurden im Tiermodell embryonale Kardiomyozyten transplantiert, resultierte dies im Einfügen der Zellen in das Myokard des Empfängers sowie der Expression verschiedener Gap Junction Proteine, aber nur einer geringen Verbesserung der Herzfunktion (Roell et al., 2002).

1.8 Ausprägungsmuster und Funktion des murinen Connexin45

1.8.1 Eigenschaften des Gjc1 Gens und Cx45 Proteins

Das Gjc1 Gen ist auf im Mausgenom auf Chromosom 11 lokalisiert (Schwarz et al., 1992) und setzt sich aus fünf Exonen zusammen (Anderson et al., 2005). Die kodierende Region befindet sich ausschließlich auf Exon3, es scheint allerdings drei alternative Exon1 zu geben, von denen Exon1a und Exon1b etwa 18 bzw. 17 kb stromaufwärts der kodierenden Region liegen, wohingegen Exon1c nur 3,5 kb und Exon2 nur 1,5 kb entfernt sind. Durch Farbstoffkopplungsexperimente an stabil transfizierten HeLa Zellen konnte gezeigt werden, dass eine geringfügige, ladungsunabhängige Kopplung mit wenigen Nachbarzellen auftritt, welche allerdings mit zunehmender Größe des Farbstoffs abnimmt (Elfgang et al., 1995; Rackauskas et al., 2007). Bei Untersuchungen der heterotypischen Kopplungseigenschaften Cx43/Cx45 doppelt transfizierter HeLa Zellen wurde nachgewiesen, dass eine Asymmetrie bezüglich der Farbstoffausbreitung besteht (Martinez et al., 2002; Desplantéz et al., 2004). Die Farbstoffausbreitung ist in die Richtung der Zelle begünstigt, die einen Cx43 Halbkanal beisteuert. Des Weiteren wurde das Vorhandensein von Cx45 Halbkanälen in HeLa Zellen durch Valiunas (2002) gezeigt. Bei Untersuchungen der elektrophysiologischen Eigenschaften der Cx45 Kanäle wurde eine geringe Kanalleitfähigkeit („conductance“) sowie ein Verschluss des Gap Junction Kanals schon bei geringen Spannungsunterschieden (± 14 mV) nachgewiesen (Moreno et al., 1995), wobei die Geschwindigkeit des Kanalverschlusses relativ gering ist (Barrio et al., 1997).

Für das Cx45 Protein konnten Interaktionen mit ZO-1 (Laing et al., 2001) sowie TSG101 (T. Auth, persönliche Mitteilung) gezeigt werden.

1.8.2 Expressionsorte des Cx45

Die meisten Untersuchungen zur Expression des Cx45 wurden mittels Reportergermäusen durchgeführt, da keine hochspezifischen Antikörper gegen das Cx45 Protein vorhanden waren. Hierfür wurden zumeist Cx45^{lacZ/+} Mäuse (Krüger et al., 2000) eingesetzt, bei denen die kodierende Region des Gjc1 Gens (Cx45) durch das lacZ Gen ersetzt wurde.

Die Expression des Cx45 Proteins beginnt bereits in den embryonalen Stammzellen wie durch Immunoblot- und Immunfluoreszenz-Analysen gezeigt werden konnte (Wörsdörfer et al., 2008). Während der weiteren Embryonalentwicklung wird Cx45 stark exprimiert (Krüger et al., 2000), die Expression nimmt mit voranschreitender Entwicklung ab. Dies wurde z.B. für die Entwicklung des Gehirns untersucht (Maxeiner et al., 2003; Cina et al., 2007). Während der Embryonalentwicklung ist eine starke Expression des lacZ Reportergens in den Gehirnanlagen und während der ersten zwei Wochen nach der Geburt beinahe ubiquitär nachweisbar, während im adulten Tier die Expression auf ein niedrigeres Niveau absinkt (Maxeiner et al., 2003). Das lacZ Reportergen kann dann auch nicht mehr ubiquitär im Gehirn, sondern fast ausschließlich in Neuronen und cerebralen Arterien nachgewiesen werden (Maxeiner et al., 2003; Li und Simard, 2001). Die lacZ Expression findet sich im adulten Tier beispielsweise in der CA3 Region des Hippocampus sowie in verschiedenen thalamischen Nuklei und in den Korb- und Sternzellen des Cerebellums (Maxeiner et al., 2003). Auch in der adulten Retina wurde Cx45 nachgewiesen. Das Cx45 Protein kolokalisiert partiell mit Cx36 in der inneren plexiformen Schicht (Dedek et al., 2006), des Weiteren ist Cx45 in der äußeren plexiformen Schicht und der Ganglienzellschicht zu finden (Dedek et al., 2006).

Im adulten Herzen wurde die Expression des Cx45 in Kardiomyozyten sowohl im Sinusknoten wie auch im AV-Knoten und den His-Bündeln nachgewiesen (Coppen et al., 1998). Ob Cx45 auch in den Atrien und im Arbeitsmyokard exprimiert wird, ist umstritten (Gros et al., 2005). Während der Entwicklung des Herzens ist Cx45 bereits im primitiven Herzschlauch an Tag 8,5 der Embryonalentwicklung zu finden (Alcolea et al., 1999).

Neben der Expression des Cx45 in neuronalen Geweben und im Herzen konnte eine Expression in der glatten Muskulatur des Darms und des Uterus gezeigt werden (Döring et al., 2006; Döring et al., 2007). Außerdem wird Cx45 eine Bedeutung bei

der Knochenentwicklung beigemessen wie Untersuchungen an Osteoblasten-Zelllinien gezeigt haben (Minkoff et al., 1999).

In vielen Organen ist die genaue Lokalisation des Cx45 Proteins noch nicht bestimmt. Zu diesen Organen zählen die adulte Niere und die Gefäße. In vaskulären Zellen der Blutgefäße wird ebenfalls Cx45 exprimiert, allerdings ist hier die genaue Lokalisation des Cx45 Proteins nicht bekannt (Wagner, 2008).

Auch die Expressionsorte in der adulten Niere (Krüger et al., 2000; Wagner, 2008) sind für Cx45 noch nicht eindeutig bestimmt. Durch Reporteranalysen an Cx45^{lacZ/+} Tieren wurden lacZ Signale in den Glomeruli sowie in der Henle'schen Schleife nachgewiesen (Krüger et al., 2000).

1.8.3 Analyse Cx45 defizienter Mäuse

Zur Untersuchung der Effekte eines Verlusts von Cx45 wurden Mäuse erzeugt, bei denen die kodierende Region des Cx45 (Exon 3) durch ein lacZ Reporter gen ersetzt wurde (Krüger et al., 2000). Homozygot deletierte Tiere versterben während der Embryonalentwicklung an Tag 10.5. Die Cx45 defizienten Embryonen weisen zwar primitive vaskuläre Strukturen auf, allerdings ist die Modellierung eines verzweigten Netzwerks (Angiogenese) nicht möglich (Krüger et al., 2000). Vermutlich entsteht hierdurch eine Unterversorgung des Embryos mit Nährstoffen, die letztlich zum Tode führt.

Kumai et al. (2000) erzeugten ebenfalls eine Maus, bei der das Cx45 Gen durch ein lacZ Reporter gen ersetzt wurde. Auch hier verstarben die Embryonen an Tag 10.5 der Embryonalentwicklung. Als Ursache hierfür wurde allerdings ein Herzdefekt angeführt. Es konnten zwar Kontraktionen im primitiven Herzschlauch nachgewiesen werden, allerdings war die Reizweiterleitung über den atrioventrikulären Kanal nicht koordiniert. Weiterhin wurde ein Defekt im Endokardkissen postuliert („endocardial cushion defect“). Das Endokardkissen ist eine amorphe Zellmasse - lokalisiert zwischen Endothel und Myokard - in dem Kissenzellen („cushion cells“) vorkommen, welche über Gap Junctions miteinander verbunden sind.

Wird Cx45 nur in α -kardialen Aktin-positiven Zellen durch Verwendung von α -cardiac actin-Cre Mäusen und konditionalen Cx45 Defektmäusen ausgeschaltet, versterben die Embryonen ebenfalls an Tag 10.5 der Embryonalentwicklung (Nishii et al., 2003). Zu diesem Zeitpunkt wird die Cre-Rekombinase nur in Myozyten exprimiert, also

nicht in den Gefäßen oder Kissenzellen. Hier konnte im Gegensatz zur ubiquitären Ausschaltung des Cx45 keine Fehlentwicklung des Herzkissens beobachtet werden.

1.9 RNS-Interferenz

Der Mechanismus der RNS-Interferenz, auch als post-transkriptionale Gen-Stillegung bezeichnet, wurde zuerst in Pflanzen entdeckt, ist aber in einem Großteil der Eukaryonten zu finden (Fire et al., 1998; Tijsterman et al., 2002). Doppelsträngige RNS-Vorläufermoleküle (dsRNS) werden zu kurzen RNS Duplexen mit einer Länge von 21-28 bp gespalten, welche dann für die Erkennung und Spaltung oder translationale Repression der einzelsträngigen komplementären RNS sorgen (Meister und Tuschl, 2004). Es werden drei Typen natürlich vorkommender kleiner RNS-Moleküle unterschieden: siRNS („short interfering RNS“), rasiRNS („repeat-associated short interfering RNS“) und miRNS (micro-RNS).

Die Reifung der kleinen RNS-Moleküle erfolgt schrittweise über dsRNS-spezifische RNaseIII-Endonukleasen, welche eine katalytische RNaseIII sowie eine dsRNS-Bindedomäne enthalten (Abb.1.12). An der Prozessierung der miRNS sind die Endonukleasen Drosha und Dicer beteiligt (Lee et al., 2003; Hutvágner et al., 2001), während zur Prozessierung der siRNS nur die Endonuklease Dicer benötigt wird (Meister und Tuschl, 2004). Die Prozessierung der dsRNS durch Dicer führt zu RNS-Duplexen von ca. 21 Nukleotiden, welche in den RISC-Komplex („RNA-induced silencing complex“) bzw. in den miRNP-Komplex („ribonucleoprotein particles“) eingebaut werden. Jeder RISC-Komplex wie auch jeder miRNP-Komplex enthält einen Vertreter der Argonaut-Proteinfamilie (Ago), welcher vermutlich direkt an die RNS im Komplex bindet (Hutvágner und Zamore, 2002). Die einzelsträngige siRNS im RISC-Komplex steuert den Sequenz-spezifischen Abbau der Ziel-RNS (Meister und Tuschl, 2004). Die Ziel-mRNS wird dann durch den RISC-Komplex in der Mitte gespalten. Nach der ATP-abhängigen Ablösung der geschnittenen mRNS aus dem RISC-Komplex kann das Ago-Protein des RISC-Komplexes eventuell weitere mRNS-Moleküle spalten (Hutvágner und Zamore, 2002).

Für Cx43 wurden im 3'UTR zwei Bindestellen für die miRNS miR-206 nachgewiesen, die an der Steuerung der Skelettmuskelentwicklung beteiligt ist (Anderson et al., 2006).

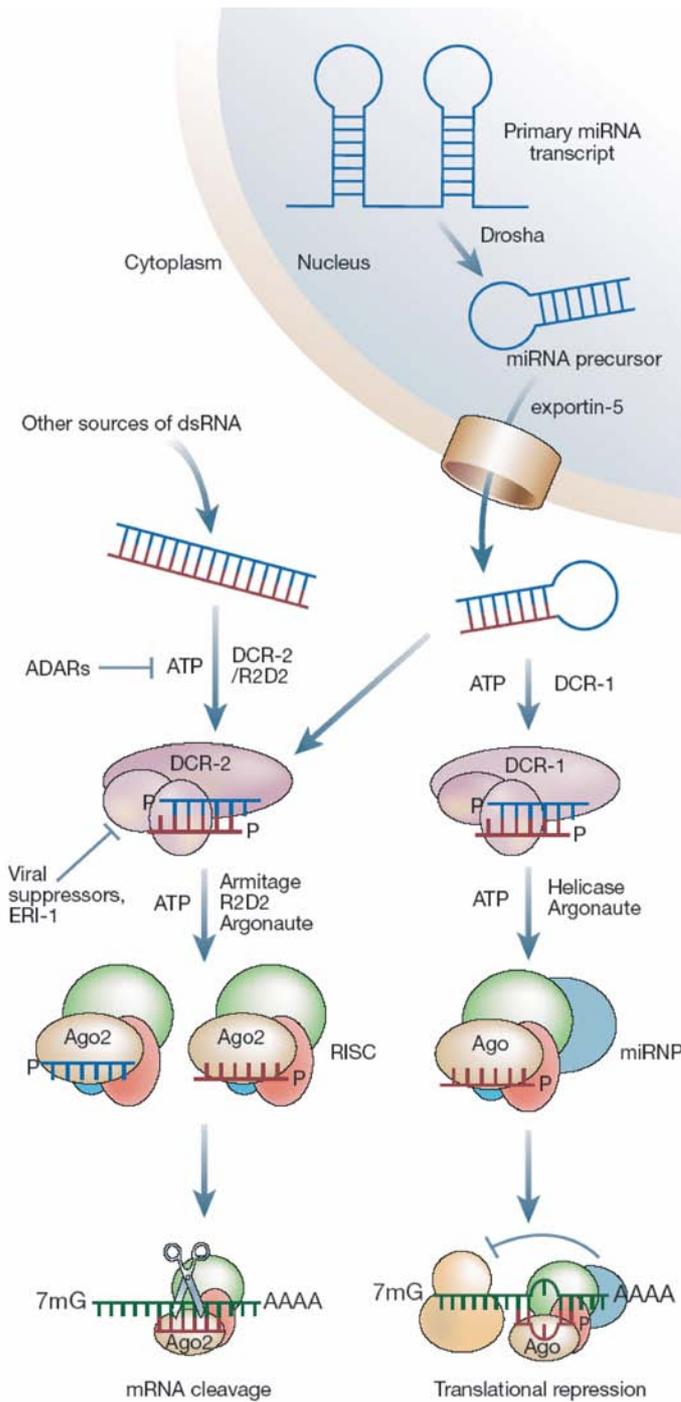


Abb.1.12: Modell der post-transkriptionellen Genregulation durch kleine RNS-Moleküle (Meister und Tuschl, 2004).

Das primäre miRNS Transkript wird im Nukleus durch Drosha in miRNS Vorläufer gespalten und in das Zytoplasma transportiert. Der miRNS Vorläufer wird durch Dicer in siRNS Duplex-ähnliche Intermediate gespalten. Dieser Duplex wird während er in den miRNP/RISC Komplex integriert wird. Die reife miRNS bindet an ein Argonaut (Ago) Protein, welches die translationale Repression oder Spaltung der Ziel-mRNS bewirkt.

1.10 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde die in der Diplomarbeit begonnene Charakterisierung der Expression des Cx39 fortgesetzt und die zeitliche Abfolge der Connexin Expression während der Myogenese bestimmt. Zur weiteren Untersuchung der Funktion des Cx39 während der Myogenese sollte durch homologe Rekombination eine Cx39 defiziente Mauslinie erzeugt werden, die anstelle der kodierenden Region des Gjd4 Gens (Cx39) das eGFP Reporter gen exprimiert.

Ferner sollte die Funktion des Cx43 während der Fusion der Myoblasten durch Verwendung spezifischer siRNS und verschiedener Gap Junction Blocker in C₂C₁₂ Zellen untersucht werden. Experimente zum Verlauf der Muskelregeneration an Cx43^{Cx26/Cx26} und Cx43^{Cx32/Cx32} Tieren sollten Aufschluss über die funktionale Redundanz der Connexine während des Regenerationsprozesses *in vivo* geben.

Eine Möglichkeit der Behandlung des geschädigten Herzens nach einer Ischämie besteht in der Transplantation von Myoblasten. Hierbei kommt es allerdings häufig infolge fehlender interzellulärer Kopplung zu ventrikulären Tachykardien. Durch Transplantation transgener Myoblasten (Cx43^{tet^OeGFP}:MCKtTA), die auch nach ihrer Differenzierung zu Myotuben und Muskelfasern Cx43 exprimieren, sollte eine Kopplung der transplantierten Zellen mit dem Empfängermyokard erreicht werden, in deren Folge das Auftreten ventrikulärer Tachykardien vermieden wird.

Zur Charakterisierung der Expression des Cx45 sollten transgene Mäuse mit Hilfe der BAC-Technik erzeugt werden, die unter der Kontrolle des Gjc1 (Cx45) Promotors ein Cx45eGFP Fusionsprotein exprimieren. Die Bestimmung der Lokalisation des Cx45 Proteins durch Immunfluoreszenz-Analyse ist in vielen Geweben, vor allem im adulten Gehirn und in Blutgefäßen, aufgrund der Qualität der gegen Cx45 gerichteten Antikörper nicht möglich. Nach einer Charakterisierung der verschiedenen entstandenen transgenen Linien sollte vor allem die Expression des Cx45eGFP im adulten Herzen sowie im adulten Gehirn analysiert werden. Des Weiteren sollten Experimente zur funktionellen Ersetzbarkeit des Cx45 durch Cx45eGFP mit diesen Mäusen durchgeführt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien und Medienzusätze wurden – sofern nicht anders vermerkt – von den Firmen DifCo, Fluka, GibcoBRL, Merck, PAA, Roche, Roth, Serva und Sigma in Analysequalität bezogen. Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech unter Berücksichtigung des Kalibrierungsdatums und der Halbwertszeit des jeweiligen Isotops verwendet. Enzyme sowie Nukleotide stammten von Roche, New England Biolabs und Promega.

2.2 Allgemeine Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders beschrieben wurden Lösungen und Puffer in doppelt destilliertem Wasser (A. bidest) angesetzt, die pH-Werte durch Verwendung von 1 N HCl oder 1 N NaOH eingestellt und bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

2.3 Lösungen für die Nukleinsäureanalytik

2.3.1 Lösungen zur Präparation genomischer DNS und der Gesamt-RNA

DEPC-H ₂ O	A. bidest mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat versetzen, 1 h autoklavieren
ES-Lysis-Puffer	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 3 µl Proteinase K-Lsg.
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml Proteinase K bei -20°C lagern

Puffer für Pronukleus-Injektion	10 mM Tris-HCl 0,1 mM EDTA pH 7,5
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0 ; 20 min autoklavieren

2.3.2 Lösungen zur Präparation von Plasmid-DNS

Alkali Lösung 1	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 1 % RNase 2000
Alkali Lösung 2	0,2 M NaOH 1% SDS (w/v)
Alkali Lösung 3	3 M Kaliumacetat 5 M Eisessig

2.3.3 Lösungen zur Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

deion. Formamid	Formamid mit 5 % (w/v) Ionenaustauscherharz (Biorad) 30 min bei RT rühren, durch Faltenfilter aufreinigen und bei – 20°C aliquotiert lagern
DNS-Ladepuffer (6 x)	0,25 % (v/v) Bromphenolblau 0,25 % (v/v) Xylencyanol 30 % (v/v) Glyzerin
TBE-Puffer (10x)	1 M Tris-Base 0,83 M Borsäure 10 mM EDTA pH 8,3

2.3.4 Lösungen zur Southern Blot Analyse

Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 0,5 M NaCl
Depurinierungslösung	0,25 M HCl

Glaswolle (silikonisiert)	Silikonisierer 1:60 in A. bidest verdünnen, Glaswolle darin eintauchen und 1 h autoklavieren
Neutralisierungslösung	1 M Tris 1,5 M NaCl pH 7,4
Sephadex G50	Sephadex G50 (Pharmacia) ÜN in TE-Puffer quellen lassen, 20 min autoklavieren
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat pH 7,5

2.4 Lösungen für die Proteinanalytik

2.4.1 Lösungen für die Immunoblotanalyse

APS (10 %)	10 % APS (Ammoniumpersulfat)
Blockpuffer	5 % Magermilchpulver (Sucofin) in Waschpuffer
Complete TM -Stammlösung (25 x)	1 Tablette Complete TM (Roche) in 2 ml A. bidest lösen, bei -20°C lagern
CoomassieBrillantBlue TM -Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 10 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Methanol Lösung durch Faltenfilter filtrieren, lichtgeschützt lagern
Coomassie-Entfärber	10 % (v/v) Essigsäure 30 % (v/v) Methanol
Elektrophoresepuffer (10x)	0,25 M Tris-Base 1,92 M Glyzin 1 % (w/v) SDS pH 8,3
Laemmli-Probenpuffer (4x)	250 mM Tris 12 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glyzerin 0,04 % (w/v) Bromphenolblau 20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol pH 6,8

Ponceau-Färbelösung	0,2 % (w/v) Ponceau S 1 % (v/v) Essigsäure lichtgeschützt lagern
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
Transferpuffer	20 mM Tris-HCl 150 mM Glyzin 20 % (v/v) Methanol pH 8,3
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8; Lagerung bei 4°C
Waschpuffer	8,5 mM Tris-HCl 1,7 mM Tris-Base 50 mM NaCl 0,1 % Tween20 50 %

2.4.2 Lösungen für die Affinitätsaufreinigung von Antikörpern

Elutionspuffer	3 M KSCN in PBS ⁻ pH 6,8
Glyzin-HCl	2 M Glyzin mit HCl auf pH 2,0
Kopplungspuffer	0,2 M NaHCO ₃ 0,5 M NaCl pH 8,3
Lagerungspuffer (Affinitätssäule)	0,05 M Na ₂ HPO ₄ 0,1 % (w/v) NaN ₃ pH 7,0
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
PBS ⁻ (0,5 M NaCl total)	0,5 M NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2

Puffer A	0,5 M Ethanolamin 0,5 M NaCl pH 8,3
Puffer B	0,1 M Natriumacetat 0,5 M NaCl pH 4,0

2.4.3 Lösungen für die Immunpräzipitation

Bisindolylmaleinid (PKC-Hemmer)	6 mM 3-(N-(Dimethylamino)propyl-3-indolyl)-4-(3-indolyl)maleinid in DMSO lösen
cAMP	100 mM in 0,9 M NaCl-Lsg
RIPA-Puffer	10 mM Phosphatpuffer pH7,2 0,1 % SDS (w/v) 1 % Triton-X-100 (v/v) 0,1 % Natriumdesoxycholat (w/v) 40 mM NaF vor Verwendung Complete™-Stammlsg. hinzugeben
RIPA-Waschpuffer	10 mM Phosphatpuffer 1 M NaCl 40 mM NaF 10 mM EDTA 0,2% (v/v) Triton X-100 pH 7,0, 1h autoklavieren,
Sepharose 4B-Gel	500 µl Sepharose 4B-Gel 1:1 mit TBS-Puffer überschichten; Lagerung bei 4°C
Sepharose-ProteinA-Gel	150 mg ProteinA Sepharose CL-4B ad 500 µl TBS-Puffer; 2 h quellen bei 4°C; zentrifugieren (5 min, 4000 upm, 4°C); Überstand abnehmen; mit gleichem Volumen TBS-Puffer überschichten
TBS-Puffer (pH 7,5)	10 mM Tris 150 mM NaCl
TPA (12-O-tetradecanoyl-1- phorbol-13-acetate)	1 µg/ml

2.4.4 Lösungen für die Immunfluoreszenz-Analyse

Blockierungsreagenz	5 % (v/v) NGS 0,1 % Triton-X-100 in PBS ⁻
IF-Waschpuffer	50 mM Tris 1,5 % (w/v) NaCl 0,3 % (v/v) Triton-X-100 pH 7,6
PFA	4 % Paraformaldehyd Zugabe von 430 ml A.bidest, erhitzen auf 60°C; Zugabe von 1-2 Tropfen 1 M NaOH bis Lösung klar wird, nach Abkühlen Zugabe von 50 ml 10x PBS ⁻ ; pH 7,4 einstellen; ad 500 ml A.bidest; Lagerung bei 4°C
Propidiumiodid-Lösung	10 mg/ml in PBS ⁻

2.5 Medien und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien

Die Medien werden durch Autoklavieren bei 120°C für 20 min sterilisiert, hitzelabile Zusatzstoffe sterilfiltriert und den Medien nach Abkühlen auf 50-55°C zugegeben. Zur Herstellung von Agarplatten wird dem Medium vor dem Sterilisieren 1,5 % (w/v) Agar zugegeben und die Platten unter sterilen Bedingungen gegossen, Selektionsantibiotika werden nach Abkühlen des Agars auf 50-55°C hinzugegeben.

2.5.1 Medien und Lösungen zur Herstellung kompetenter Bakterien

TB-Medium	10 mM Pipes 55 mM MgCl ₂ 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl pH 6,7
TFB I	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl ₂ 100 mM RbCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glyzerin pH 5,8 ; sterilfiltrieren und bei 4°C lagern

TFB II	10 mM NaMOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin pH 7,0 ; sterilfiltrieren und bei 4°C lagern
YT ⁺⁺ -Medium	8 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 970 ml mit A. bidest; 20 min autoklavieren und nach dem Abkühlen 20 ml MgSO ₄ (1 M, 1 h autoklaviert) und 10 ml KCl (1 M, 1 h autoklaviert) hinzufügen pH 7,5

2.5.2 Medien und Lösungen zur Transformation und Kultivierung von Bakterien

Ampizillin (50 mg/ml)	0,5 g Ampizillin in 10 ml A. bidest lösen, sterilfiltrieren und bei -20°C lagern. Die Endkonzentration im Medium beträgt 50 µg/ml, in Platten 100 µg/ml
Chloramphenicol-Stammlsg.	12,5 mg/ml in 50% Ethanol, Lagerung bei -20°C
Fusarinsäure-Platten	10 g Bacto-Trypton 1 g Hefeextrakt 1 g Glukose 8 g NaCl 0,5 ml ZnCl ₂ (0,1 M) 8 ml Chlorotetrazyklin-Stammlsg. (6,3 mg/ml) 15 g Agar ad 1 l Leitungswasser autoklavieren, dann Zugabe von: 72 ml NaH ₂ PO ₄ (1M) 6 ml Fusarinsäure-Stammlsg. (2 mg/ml) 1 ml Chloramphenicol-Stammlsg. (12,5 mg/ml)
Fusarinsäure-Stammlsg.	2 mg/ml
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l mit A. bidest pH 7,4
Tetrazyklin-Stammlsg.	10 mg/ml in 50% Ethanol. Lagerung bei -20°C

2.6 Medien für die Kultivierung eukaryontischer Zellen

2.6.1 Medien und Lösungen zur Kultivierung embryonaler Stammzellen

ES-EDTA-Lösung	5 mM in ES-PBS ⁻
ES-Einfriermedium (2x)	20 % DMSO 10 % FCS in ES-Normalmedium, Lagerung bei -20°C
ES-Gelatine	1% Schweinehaut TypI-Gelatine, 2x 1h autoklavieren, Lagerung bei 4°C
ES-Normalmedium	500 ml Glasgow MEM 1 mM Na-Pyruvat 1x nicht-essentielle Aminosäuren 5 % FCS 5 % NCS 1x Penicillin/Streptomycin 0,007 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,1 % (v/v) LIF Lagerung bei 4°C
ES-Selektionsmedium	350 µg/ml aktive G418-Stammlösung in ES-Normalmedium, Lagerung bei 4°C
ES-Trypsin	20 % ES-EDTA-Lösung 1 % Chicken-Serum 1 % Trypsin (2,5%) in ES-PBS ⁻ , Lagerung bei -20°C
G418-Stammlösung	50 mg/ml aktives G418 Sulfat 100 mM PIPES, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C
HBS-Puffer	0,02 M Hepes 2,5 M Glukose in ES-PBS ⁻ , Lagerung bei -20°C

2.6.2 Medien und Lösungen zur Kultivierung von HeLa Zellen

D10-Medium	500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (pH 6,9) 10 % (v/v) fötales Kälberserum (zuvor bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert) 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung
D10-Puromycin-Medium	D10-Medium 0,5 µg/ml Puromycin-Stammlösung
PBS ⁻	8,0 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ pH 7,2
Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (100x)	0,6 % (w/v) Penicillin G 1 % (w/v) Streptomyzinsulfat in Puck'scher Saline ansetzen und bei -20°C lagern pH 8,2
Puck'sche Saline	137 mM NaCl 5,4 mM KCl 5,5 mM D(+)-Glukose 4,5 mM NaHCO ₃ bei -20°C lagern
Puromycin-Stammlösung	0,5 mg/ml bei -20°C lagern
Versine-Trypsin-Lösung	8,0 g NaCl 0,4 g KCl 1,0 g D(+)-Glukose 0,2 g EDTA 16 ml Trypsin-Lösung (2,5 % in PBS ⁻) ad 1 l; pH 7,8

2.6.3 Medien und Lösungen zur Kultivierung von C₂C₁₂ Zellen

Differenzierungsmedium	500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (pH 6,9) 2 % Pferdeserum 10 µg/ml Insulin 5 µg/ml Transferrin 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung
Kultivierungsmedium	500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (pH 6,9) 20 % (v/v) fötales Kälberserum (zuvor bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert) 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung

2.7 Lösungen für histologische Färbungen

Trichrom-Färbelsg.	0,5% (w/v) Phosphorwolframsäure 1% (w/v) Orange G 0,5% (w/v) Anilinblau 1,5% (w/v) Säurefuchsin
Acetylcholinesterase-Färbelösung	65 mM Natriumacetat (pH 5,0) 1,73 mM Acetylcholinchlorid 15 mM Natriumcitrat 3 mM CuSO ₄ 5 mM isoOMPA 5 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] 1% Triton-X-100
Eosin-Lösung	0,1 % Eosin Y, vor Gebrauch filtrieren
Hämatoxylin-Lösung	0,1 % Mayers Hämalaunlösung, vor Gebrauch filtrieren

2.8 Lösungen für die Mikroinjektion (in das neonatale Zwerchfell)

Alexa488-Lsg.	5% Alexa Fluor 488 Hydrazin in A.bidest
KCl-Lsg.	100 mM KCl in A.bidest
Krebs-Henseleit-Puffer	118,2 mM NaCl 4,6 mM KCl 1,2 mM KH ₂ PO ₄ 1,3 mM MgSO ₄ 25 mM NaHCO ₃ 2,5 mM CaCl ₂ 10 mM Glukose
Rhodamin-Dextran	1% Rhodamin-Dextran in A.bidest

2.9 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
-----------------	---

2.10 Kommerzielle Reagenziensätze

Amplify	Amersham
Bichinonic Acid Kit for Protein Determination	Sigma
DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II	Roche
Jetstar Plasmid Midi Kit 50	JETstar
Megaprime-DNA labeling system	Amersham
Nucleobond AX-500	Macherey-Nagel
Perfectprep [®] Gel Cleanup Kit	Eppendorf
pGEM-T Easy Vector System I	Promega
Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Restore [™] Western Blot Stripping	Pierce
SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce

2.11 Nukleinsäuren

Name	Eigenschaften	Referenz
Cosmid 12645 MPMGc121F12645Q2	Kanamycin-Resistenz; kodierende und 5' und 3' flankierende Regionen des Gjd4 Gens (Cx39)	RZPD
pBluescript II SK(+/-) (3,0 kb)	Blau-Weiss-Selektion; Ampizillin-Resistenz; T3/T7-Promotoren	Stratagene
pGEM-T Easy (3,0 kb)	Blau-Weiss-Selektion; Ampizillin-Resistenz; T3/T7-Promotoren	Promega
pGemTeasy	Blau-Weiss-Selektion; Ampizillin-Resistenz; T7/SP6-Promotoren	Promega
pMJGreen (6,2 kb)	Ampizillin-Resistenz; CMV- Promotor; kodierende Region des eGFP; SV40p(A); Puromycin- Resistenzgen	J. Degen, Doktorarbeit 2003
pSV-RecA-Cx45GFP	Tetrazyklin-Resistenzgen; temperatursensitiver Replikationsursprung, Teil des Exon3 des Gjc1 Gens (Cx45) fusioniert mit eGFP, 5'UTR und 3'UTR des Gjc1 Gens	Euwens, Dissertation 2007

2.12 Oligonukleotide

2.12.1 Primer für die RT-PCR Analyse

Name	Basensequenz (5'→3')
Cx26 USP	5'-CGGAAGTTCATGAAGGGAGAGAT-3'
Cx26 DSP	5'-GGTCTTTTGGACTTTCCTGAGCA-3'
Cx29USP	5'-GGGGTACCGACCACCATGTGCGGCAGGTTCC-3'
Cx29 DSP	5'-GCAGGATCCTCAAATGGCTCTTTTGC-3'
Cx30 USP	5'-GTCATCGGTGGCGTGAACAAGCAC-3'
Cx30 DSP	5'-GAGCAGCATGCAAATCACGGATGC-3'
Cx30.2 USP	5'-CCGCTCGAGCGGCCACCATGGGGGAGTGGGC-3'
Cx30.2 DSP	5'-GGAATTCCCTAGATGGCCAGGTCCTGGCG-3'
Cx30.3 USP	5'-TCAAACATGGGCCCAATG-3'
Cx30.3 DSP	5'-GGGAGTCACAGAGCAAGC-3'
Cx31 USP	5'-AGAAGCACGGGGAGCAAT-3'
Cx31 DSP	5'-TACTATGCTGGCGCACTG-3'
Cx31.1 USP	5'-ATATACCCTCCCTTCTATGGT-3'
Cx31.1 DSP	5'-TCACAGAATGGTTTTCTTCAC-3'
Cx32 USP	5'-CTGCTCTACCCCGGCTATGC-3'
Cx32 DSP	5'-CAGGCTGAGCATCGGTCGCTCTT-3'
Cx33 USP	5'-CTAGAAAAGGTTCAACCCTAC-3'
Cx33 DSP	5'-TAGAACAGCTGGATGACATTC-3'
Cx36 USP	5'-TGCAGCAGCACTCCACTATGATTG-3'
Cx36 DSP	5'-CATAGGCGGAGTCACTGGACTGAG-3'
Cx37 USP	5'-GGCTGGACCATGGAGCCGGT-3'
Cx37 DSP	5'-TTTCGGCCACCCTGGGGAGC-3'
Cx40 USP	5'-CTGTCCCCACCCAGTCAACT-3'
Cx40 DSP	5'-CCGTTTGTCACTATGGTAGC-3'
Cx39kX _{hol}	5'-CCGCTCGAGCGGCCACCATGGAGAAGTTGAACTTGTG-3'
Cx39EcoSTOP	5'-GGA-ATT-CCT-CAT-CAC-ACC-CAC-TCA-GAT-TTG-G-3'
Cx43 USP	5'-TACCACGCCACCACCGGCCCA-3'
Cx43 DSP	5'-GGCATTTTGGCTGTGTCGTCAGGGAA-3'
Cx45 USP	5'-TTCCAAGTCCACCCATTTTAT-3'
Cx45 DSP	5'-ATCGTTCCTGAGCCATTCTGA-3'
Cx46 USP	5'-GGAAAGGCCACAGGGTTTCCTGG-3'
Cx46 DSP	5'-GGGTCCAGGAGGACCAACGG-3'
Cx47 USP	5'-AAGACGGTGGTCACTCCTGG-3'
Cx47 DSP	5'-GCACAGCATCCTGCGCACTG-3'
Cx50 USP	5'-CATCCTGCCCTCTATC-3'
Cx50 DSP	5'-CTCTTCCCGCTCCACTT-3'
Cx57 USP	5'-TTCCATTCAACAACTACTCAGG-3'
Cx57 DSP	5'-ATACACATATACATATGTCTCATG-3'
β-actin USP	5'-CGTGGGCCCGCCCTAGGCACCAG-3'
β-actin DSP	5'-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'
mPanx1-USP	5'-TTGACCATGGCCATCGCCCACTTGG-3'
mPanx1-DSP2	5'-CTACAGATCCAACAGGGGTGCGTC-3'
mPanx2-USP	5'-AGTCGGCGGACATGGCGACC-3'
mPanx2-DSP1	5'-TCCGGCTCAGGATGGTGAGAGGG-3'
mPanx3-USP	5'-ATTCTCAGCAGCATCATGTCCG-3'
mPanx3-DSP1	5'-TTCAAAGTACCGTTTCCCTCC-3'
eGFP-USP	5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3'
eGFP-DSP	5'-CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC-3'

2.12.2 Primer zur Genotypisierung

Name	Basensequenz (5'→3')
EGFP-3B	5'-GAA GAA GTC GTG CTG CTT CAT GTG-3'
Cx43-rev2	5'-GCT GGC TTG CTT GTT GTA ATT GCG-3'
Tet23	5'-GCG GAC CCA CTT TCA CAT TTA AG-3'
Tet27	5'-CGC TGT GGG GCA TTT TAC TTT AG-3'
Cx45GFP-for	5'-ATG GCT CAG GAA CGC TTG-3'
Cx45GFP-rev	5'-CAG CTC CAC CTT CAG AGT CC-3'
Cx43-RO4	5'-CGC CTC ATT ACT GAG GTT GTT GAG-3'
Cx43-HO2	5'-CGC AAT TAC AAC AAG CAA GCC AGC-3'
Cx32-HO2	5'-CGT CTT CAC TGT CTT TAT GCT CGC-3'
Ki26Cx26	5'-GGT GGA CCT ACA CCA CCA GCA TC-3'
Cx39konvUSP	5'-TAA AGC GCA TGC TCC AGA CTG C-3'
Cx39konvDSP	5'-GAG GTA TGA GCC ATG GGC ATT GC-3'
Cx40-neo	5'-ATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGG-3'
Cx45DS	5'-GACGGAGGTCTTCCCATCCC-3'
Cx45-5P	5'-GTATGGCTTCCAAGTCCACCC-3'
Cx39 for	5'-TGG GTG AAT GGA GAG GCT AG-3'
Neo for	5'-AAT AGC CTC TCC ACC CAA GC-3'
GFP for	5'-GCG ATC ACA TGG TCC TGC-3'
3HR rev	5'-GAC CGT CTT GAC CTC AGG TTC-3'

2.13 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
DH5α	FΦ80dlacZ; ΔM15; Δ(lacZYA-argFI); U129; deoR; recA1; hsdR17(r _k -, m _k +); phA; supE44; λ-thi; gyrA96; relA1	Plasmidvermehrung	Invitrogen
TOP10/DH10B	F'mcrA (mrr- hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74 recA1 deoR araD139 (ara- leu)7697galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Plasmidvermehrung	Invitrogen
XL1-blue	recA1; endA1; gyrA96; thi-1; Δ(mcr)A183; Δ(mcrCB-hsdSMR- mrr); supE44; relA1; lac[F'proAB lacI ^q ΔM15; Tn10; (Tet ^r 12,5 μg/ml)]	Plasmidvermehrung	Bullock et al., 1987; Stratagene

2.14 Größenstandards

Bezeichnung	Fragmentgrößen
DNS 100 bp-Leiter (Gibco BRL)	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 2.072 bp
DNS 1 kb-Leiter (Gibco BRL)	134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1.018, 1.639, 2.036, 3.054, 4.072, 5.090, 6.108, 7.126, 8.144, 9.162, 10.180, 11.198, 12.216 bp
MidRangell PFG Marker (NEB)	24,5; 48,5; 73,0; 145,5; 170; 194; 218; 242,5; 267; 291 kb
Prestained Precision Protein Standard (Bio-Rad)	10, 15, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa

2.15 Eukaryontische Zelllinien

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
C ₂ C ₁₂	Myoblasten-Zelllinie der Maus	Yaffe und Saxel, 1977
HeLa	Aneuploide, epitheloide Cervixkarzinom Linie aus menschlichem Gewebe	Jones et al., 1971
HeLa-Cx39	HeLa-Linie, die konstitutiv das Protein Cx39 exprimiert	von Maltzahn, Diplomarbeit 2003
HM1	Embryonale Stammzellen der Maus, gewonnen aus dem Mausstamm Sv129P2/OlaHsd	Magin et al., 1992

2.16 Mauslinien

Bezeichnung	Kurzbeschreibung	Referenz
C57BL/6	Inzuchtstamm, schwarz	Charles River; eigene Zucht
NMRI	Inzuchtstamm, albino	Charles River; eigene Zucht
FVBN	Inzuchtstamm	Charles River
Cx43 ²⁶	Mauslinie zur Expression des Gjb2 Gens (Cx26) unter der Kontrolle des Gja1 (Cx43) Promotors	Winterhager et al., 2007
Cx43 ³²	Mauslinie zur Expression des Gjb1 Gens (Cx32) unter der Kontrolle des Gja1 (Cx43) Promotors	Plum et al., 2000
Cx43 ^{tetOeGFP}	Mauslinie zur Überexpression des Cx43 und eGFP über das TetOFF System	Döring, Dissertation, 2005
Cx45 ^{lacZ}	Mauslinie zur Expression des lacZ Gens unter der Kontrolle des Gjc1(Cx45) Promotors, Deletion des Gjc1 Gens	Krüger et al., 2000

deleter-Flp	Mauslinie zur ubiquitären Expression der Flp-Rekombinase unter der Kontrolle des menschlichen β -Aktin Promotors	Rodríguez et al., 2000
MCKtTA	Mauslinie zur Expression des Transaktivators des Tet-Systems unter der Kontrolle des MCK Promotors	Ahmad et al., 2000

2.17 Antikörper

2.17.1 Primärantikörper

Antigen	Antikörper-Typ	Herkunft des Antikörpers	Verdünnung	Referenz
Aktin	monoklonal	Maus	1:500 (IB)	Sigma
Calbindin	monoklonal	Maus	1:200	Swant
CamKII	monoklonal	Maus	1:100 (IF)	Chemikon
Cx26	monoklonal	Maus	1:400 (IB)	Zymed
Cx30.2	polyklonal	Kaninchen	1:200	Kreuzberg et al., 2005
Cx32	monoklonal	Maus	1:400 (IB)	Zymed
Cx37	polyklonal	Kaninchen	1:500	Traub et al., 1998
Cx39	polyklonal	Kaninchen	1:100 (IF) 1:100 (IB)	von Maltzahn et al, 2004
Cx40	polyklonal	Kaninchen	1:200 (IF)	BioTrend
Cx43	polyklonal	Kaninchen	1:1000 (IF) 1:1000 (IB)	C. Schlieker, Diplomarbeit 2000
Cx45	polyklonal	Kaninchen	1:500 (IF) 1:1000 (IB)	U.Janssen-Bienhold, Oldenburg
eGFP	polyklonal	Kaninchen	1:1000 (IF) 1:1000 (IB)	Invitrogen
eGFP	polyklonal	Hühnchen	1:2000 (IF)	AbCam
GFAP	monoklonal	Maus	1:400 (IF)	Sigma
Myogenin	monoklonal	Maus	1:500 (IB)	Sigma
Nestin	monoklonal	Maus	1:200 (IF)	Sigma
NeuN	monoklonal	Maus	1:100 (IF)	Chemicon
Parvalbumin	Monoklonal	Maus	1:1000 (IF)	Sigma
S100 β	monoklonal	Maus	1:200 (IF)	Sigma
Smooth-Muscle Actin	monoklonal	Maus	1:400 (IF)	Sigma
SynapsinII	monoklonal	Maus	1:800 (IF)	Sigma
ZO-1	polyklonal	Ratte	1:250	Invitrogen

2.17.2 Sekundärantikörper

	Antigen	Herkunft des Antikörpers	Verdünnung	Referenz
Alexa488	Kaninchen	Ziege	1:1000 (IF)	MoBiTec
Alexa594	Kaninchen	Ziege	1:1000 (IF)	MoBiTec
Cy2	Hühnchen	Ziege	1:200 (IF)	Dianova
Cy3	Kaninchen	Ziege	1:1000 (IF)	Dianova
Cy5	Kaninchen	Ziege	1:1000 (IF)	Dianova
Cy5	Maus	Ziege	1:1000 (IF)	Dianova
Peroxidase	Kaninchen	Ziege	1:20000 (IB)	Dianova
Peroxidase	Maus	Ziege	1:20000 (IB)	Dianova

2.18 Geräte

Gerätebezeichnung

Blotting-Chamber Mighty-Small II
 Chef-DR™ II Electrophoresis Cell
 Elektrophoresekammer Mighty-Small II SE250/SE260 mit SE245
 Elektrophoresekammer Perfect blue™
 Feinwaage Navigator
 Fraktionssammler 2211 SUPERRAC
 Gelrockner M583 Gel Dryer
 Heizblock DRI-Block DB3
 Heizgerät TRZ 3700 (Mikroinjektion)
 Image Master® VDS
 Inkubator 6000
 Kolbenhubpipette Pipetman (20, 200, 1000 µl)
 Kühlzentrifuge 5415R
 Kühlzentrifuge J2-21 mit Rotor JA20
 Kühlzentrifuge Multifuge primoR
 LSM 510 Meta
 Magnetrührer MR 2002
 Mikromanipulator
 Mikroskop IM 35
 Mikroskop mit Epifluoreszenz, Axiophot
 Mikrowelle MW 800
 Paraffin-Gewebeinfiltrationsautomat TP1020
 PCR-Maschine PTC-100
 Peristaltische Pumpe P-1
 Pipettierhilfe vac-petus
 Polytron-Homogenisatorstab
 Schüttler G25
 Schüttler MSI Minischaker
 Schüttler Vibrax VXR basic
 Spannungsgerät Bio-Rad 1000/500
 Spannungsgerät LKB GPS 200/400

Firma

Bio-Rad
 Bio-Rad
 Hoefer

 PeqLab
 Ohaus
 LKB Bromma
 Bio-Rad
 Techne
 Zeiss
 Pharmacia Biotech
 Heraeus
 Gilson
 Eppendorf
 Beckman
 Heraeus
 Zeiss
 Heidolph
 Eppendorf
 Zeiss
 Zeiss
 Continent
 Leica
 Biozym
 Amersham
 Faust
 Kinematica
 Heraeus
 IKA
 IKA
 Bio-Rad
 Pharmacia

Spektralphotometer DU 640	Beckmann
Strudelmixer Reax 2000	Heidolph
Szintillationszähler LS 1801	Beckman
Ultraschallbad Transonic T460	Elma
UV Stratalinker 2400	Stratagene
UV-Detektor 2138 UVICORD S	LKB Bromma
Vakuumpumpe AF 4-8	Leybold-Heraeus
Wasserbad 012T	Lauda
Wasserbad Shake Temp SW22	Julabo
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge Universal 2S	Hettich

2.19 Sonstige Materialien

15/50 ml Röhrchen	Sarstedt
Centricon Centrifugal Filter, Ausschlussgröße 50 kDa	Millipore
Dialyseschläuche, Ausschlussgröße 10 kDa	Roth
Faltenfilter	Schleicher & Schuell
HiTrap [®] affinity columns	Amersham
Hybond N Nitrozellulose Membran	Amersham
Hybond-ECL Nitrozellulose Membran	Amersham
Mikroreaktionsgefäße 0,25 - 2,0 ml	Sarstedt
Nylon Membrane, positively charged	Roche
Parafilm „M“	American National Can
Pipettierspitzen	Sarstedt
Röntgenfilme X-OMAT AR	Kodak
Sterilfilter 0,4 µm und 0,2 µm	Schleicher & Schuell
Whatman 3mm-Papier GB 002	Schleicher & Schuell
Zellkultur-Schalen	Becton Dickinson
Chloroform	Merck
Permafluor Mounting Medium	Beckman Coulter
DMSO	Merck
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma
Entellan [®]	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
FCS	Gibco BRL
Formaldehyd 37 %	Merck
Glyzerin	Sigma
Isopropanol	Merck
Mayers Hämalaun	Merck
Methanol	Riedel-de-Häen
Mineralöl	Sigma
SDS, 10 %	Fluka
Tissue-Tek [®] O.C.T. [™] Compound	Sakura
Quickhyb [™]	Ambion

3 Methoden

3.1 DNS-Arbeiten

3.1.1 Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präparation)

Die analytische Plasmidisolierung ermöglicht die schnelle Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien. Mit der gewonnenen DNS können Testspaltungen unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen durchgeführt werden, um rekombinante Klone zu identifizieren.

Eine Einzelkolonie transformierter Bakterien wird in 3 ml LB-Selektions-Medium überführt und ÜN bei 37°C und 225 Upm inkubiert. Von dieser Kultur werden 1,5 ml in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und die Bakterien durch Zentrifugation (5 min, 6000 Upm, RT) sedimentiert. Nach Dekantieren des Überstands werden die Bakterien in 100 µl Alkali-Lösung 1 resuspendiert und 2 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit werden die Zellwände der Bakterien zerstört und die RNS durch die zugegebene RNase abgebaut. Durch die Zugabe von 200 µl Alkali-Lösung 2 erfolgt die Denaturierung der DNS. Nach mehrmaligem Invertieren werden 150 µl Alkali-Lösung 3 hinzugegeben und der Ansatz nach Invertieren bei 13.000 Upm für 5 min zentrifugiert, wodurch es zu einer Sedimentation der Zelltrümmer und daran haftender genomischer Bakterien-DNS kommt. Der die DNS enthaltende Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNS durch Zugabe von 500 µl Ethanol (absolut) ausgefällt. Durch Zentrifugation bei 13.000 Upm für 7 min präzipitiert die DNS, der Überstand wird verworfen und die DNS nach Trocknung des Pellets in 50 µl TE-Puffer gelöst.

3.1.2 Präparative Plasmid-Isolierung (Midi-Präparation)

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNS mit hohem Reinheitsgrad wird der Reagenziensatz der Firma JETstar verwandt. Die Plasmid-Präparation erfolgt durch alkalische Lyse und anschließende Ionenaustausch-Chromatographie; die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben.

3.1.3 Endotoxin-freie Plasmidisolierung (Maxi-Präparation)

Zur Isolierung großer, Endotoxin-freier DNS-Mengen für die Transfektion embryonaler Stammzellen wird das Qiagen EndoFree MaxiKit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben eingesetzt. Die aufgereinigte Plasmid-DNS wird in 200 µl Endotoxin-freiem TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.1.4 Aufreinigung der BAC-DNS zur Oozyteninjektion

Zur Aufreinigung der BAC-DNS für die Injektion in befruchtete Maus-Oozyten wird das Nucleobond AX-500 Kit der Firma Machery Nagel nach Herstellerangaben eingesetzt. Die gewonnene BAC-DNS wird in Pronukleus-Injektions Puffer gelöst und bei 4°C gelagert.

3.1.5 Isolierung genomischer DNS aus embryonalen Stammzellen

In T25 Kolben konfluent gewachsene embryonale Stammzell-Kulturen werden nach Entfernung des Mediums zweimal mit PBS⁻ gewaschen, mit einer Mischung aus 1 ml ES-Lysis-Puffer und 5 µl Proteinase K-Stammlösung versetzt und für 30 min bei RT schwenkend inkubiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation bei 56°C über Nacht. Zur Fällung der DNS wird den Ansätzen das gleiche Volumen an Isopropanol zugesetzt, und für 30 min schwenkend bei RT inkubiert. Die DNS-Flocke wird mit einer blauen Pipettenspitze aus der Lösung entnommen, zweimal in Ethanol (70%) gewaschen und an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wird die DNS mit 200 µl TE-Puffer versetzt und zum Lösen für 1 bis 2 Tage bei 56°C inkubiert. Die auf diese Weise gewonnene DNS kann für Southern Blot und PCR-Analysen eingesetzt werden.

3.1.6 Isolierung genomischer DNS aus Mausschwanzspitzen

Zur Isolierung genomischer DNS aus Maus-Schwanzspitzen werden Schwanzbiopsien (etwa 0,5 cm) in 0,5 ml Laird- Puffer (Laird et al., 1991) mit 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) bei 56°C über Nacht lysiert. Haare und unlösliche Zellrückstände werden durch Zentrifugation (13000 Upm, 10 min, RT) abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 0,5 ml

Isopropanol und mehrmaliges Invertieren wird die DNS präzipitiert und durch erneute Zentrifugation (13000 Upm, 15 min, RT) sedimentiert. Nach Entfernung des Überstandes wird die DNS an der Luft getrocknet, in 50-100 µl TE-Puffer aufgenommen und ÜN bei 56°C im Wasserbad gelöst. Diese DNS-Lösung kann für Genotypisierungen mittels PCR eingesetzt werden.

3.1.7 Isolierung genomischer DNS aus der Leber von Mäusen

Die Lebern werden direkt nach der Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Gewebeproben (bis zu 1 g) werden in vorgekühlten Schraubzylindern mit Metallstäben und einem Hammer zu Pulver zerkleinert, welches in 13 ml-Zentrifugationsröhrchen gesammelt wird. Anschließend wird das Gewebepulver mit 1,2 ml Laird- Puffer und 6 µl Proteinase K je 100 mg Gewebe versetzt und 2-3 Tage im Wasserbad bei 56°C inkubiert, bis keine Gewebeklumpen mehr erkennbar sind. Diesen Organlysaten wird das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (1:1:24) zugegeben, anschließend für 30 sec durch Invertieren durchmischt und 10 min zentrifugiert (2500 Upm, 4°C). Die obere wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem 0,5-fachen Volumen Ammoniumacetatlösung (7,5 M) und dem 2-fachen Volumen Ethanol (100%) vorsichtig geschwenkt, bis die DNS präzipitiert. Nach Sedimentation der DNS (8000 Upm, 10 min, 4°C) wird der Überstand verworfen, das DNS-Sediment mit 5 ml Ethanol (70%) gewaschen und erneut zentrifugiert (8000 Upm, 10 min, 4°C). Nach Entfernung des Überstands wird das DNS-Sediment für 5-10 Minuten bei RT getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen TE-Puffer ÜN bei 56°C gelöst. Die DNS kann bei 4°C gelagert werden und für Southern Blot oder PCR-Analysen eingesetzt werden.

3.1.8 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit, selbst sehr große DNS-Fragmente (>30 kb) wie BACs aufzutrennen. Hierfür wird die CHEF-DR II Anlage der Firma Bio-Rad mit einem 1%igen Agarose Gel (0,5x TBE) verwendet. Die Proben werden mit 6x DNS-Ladepuffer versetzt, als Größenstandard dient der MidRangell PFG Marker der Firma NEB. Die Spannung der Stromquelle (Modell 200/2.0 von Bio-

Rad) wird auf 200 V mit einer Laufzeit von 12-16 Stunden eingestellt. Anschließend erfolgt die Einstellung des Pulsgenerators. Der Pulsparameter wird auf 4-5 Sekunden eingestellt, die Laufzeit auf 12-16 Stunden. Es folgt die Anschaltung der Kühlung (14°C). Weitere technische Details zur Anlage können der Gerätebeschreibung (Modell 200/2.0 von Bio-Rad) entnommen werden.

3.1.9 DNS-Sequenzierung

Alle durchgeführten Sequenzierungen werden als Auftragssequenzierungen bei der Firma AGOWA durchgeführt; hierzu wird die DNS (20 µg) in A. bidest gelöst versandt.

3.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: „Polymerase Chain Reaction“; Mullis und Faloona, 1987) ist ein Verfahren zur gezielten exponentiellen Amplifikation von DNS-Fragmenten. Hierzu werden aus einem bekannten DNS-Bereich zwei Oligonukleotid-Startermoleküle abgeleitet, die gegenläufig an die denaturierten komplementären DNS-Stränge binden, deren Sequenzen bekannt sind und die den gewünschten Bereich flankieren. Durch die hitzestabile DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) werden die 3'-Enden der Startermoleküle so verlängert, dass zwei komplementäre DNS-Stränge entstehen, die ihrerseits nach der Denaturierung wieder als Matrize dienen. Das Resultat der Wiederholungen (35-40fach) aus Denaturierung, Starter-Anlagerung und DNS-Synthese ist die selektive Amplifikation des durch die Startermoleküle flankierten Bereichs der DNS. Die abschließende verlängerte Synthesephase ermöglicht die Verlängerung unvollständig vervielfältigter DNS-Stränge. Eine Analyse der amplifizierten DNS-Sequenz erfolgt durch Agarose-Gelelektrophorese.

3.1.10.1 PCR-Analyse zum Nachweis der homologen Rekombination des Cx39KO Vektors in ES-Zellen

Reaktionsansatz:

DNS (Kulturüberstand)	12,5 µl
PCR-Puffer (5x)	2,5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	2,5 µl
dNTP's [10mM]	0,5 µl
Cx39konv-USP [10 µM]	1,0 µl
Cx39konv-DSP [10 µM]	1,0 µl
A.bidest	4,5 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl

Reaktionsprogramm:

94°C	3 min	1x
94°C	1 min	30x
58°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	7 min	1x
8°C	forever	

Die PCR liefert den Nachweis der erfolgreichen homologen Rekombination des Austauschvektors Cx39KO im 3'Bereich, wodurch ein Fragment von 1,9 kb entsteht.

3.1.10.2 PCR-Analysen transgener Mäuse

3.1.10.2.1 PCR zum Nachweis des Cx45eGFP Transgens

Reaktionsansatz:

DNS	1,0 µl
PCR-Puffer (5x)	5,0 µl
MgCl ₂ [25 mM]	1,5 µl
dNTP's [10mM]	1,0 µl
Cx45GFPfor [10 µM]	1,0 µl
Cx45GFPprev [10 µM]	1,0 µl
A.bidest	13,0 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl

Reaktionsprogramm:

94°C	5 min	1x
94°C	1 min	30x
58°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	7 min	1x
8°C	forever	

Ein Amplikon von 1,0 kb zeigt die Anwesenheit des Cx45eGFP Transgens im Genom der untersuchten Mäuse an, ein Amplikon von 300 bp die Anwesenheit des Cx45wt Lokus.

3.1.10.2.2 PCR zum Nachweis der Deletion der Cx39 kodierenden Region

Zum Nachweis der Deletion der kodierenden Region des Gjd4 Gens (Cx39) wird die folgende PCR-Analyse eingesetzt.

Reaktionsansatz:

DNS	1,0 µl
PCR-Puffer (5x)	5,0 µl
MgCl ₂ [25 mM]	1,5 µl
dNTP's [10 mM]	0,5 µl
Cx39for [10 µM]	0,5 µl
neofor [10 µM]	0,5 µl
3'HRrev [10 µM]	1,0 µl
A.bidest	14,8 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

Reaktionsprogramm:

95°C	5 min	1x
95°C	1 min	30x
60°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	7 min	1x
8°C	forever	

Bei Anwesenheit eines Cx39wt Allels entsteht ein Amplikon von 670 bp, im Falle des Cx39^{GFPneo} Allels ein PCR-Amplikon von 870 bp.

Zum Nachweis der Deletion der Neomycin-Resistenzkassette wird die folgende PCR-Analyse eingesetzt.

Reaktionsansatz:

DNS	1,0 µl
PCR-Puffer (5x)	5,0 µl
MgCl ₂ [25 mM]	1,5 µl
dNTP's [10mM]	0,5 µl
Cx39for [10 µM]	0,5 µl
GFPfor [10 µM]	0,5 µl
3'HRrev [10 µM]	1,0 µl
A.bidest	14,8 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

Reaktionsprogramm:

95°C	5 min	1x
94°C	30 sec	40x
62°C	45 sec	
72°C	90 sec	
72°C	10 min	1x
8°C	forever	

Bei Anwesenheit eines Cx39wt Allels entsteht ein Amplikon von 381 bp, im Falle des Cx39^{GFP} Allels ein PCR-Amplikon von 529 bp.

3.1.10.2.3 PCR zum Nachweis der Deletion der Cx45 kodierenden Region

Reaktionsansatz:

DNS	1,0 µl
PCR-Puffer (5x)	2,5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	2,0 µl
dNTP's [10mM]	0,1 µl
Cx45-DS [100 µM]	0,4 µl
Cx45-5P [100 µM]	0,2 µl
Cx40neo [100 µM]	0,8 µl
A.bidest	6,5 µl

Startansatz:

PCR-Puffer (5x)	2,5 µl
A.bidest	9,7 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl

Reaktionsprogramm:

94°C	15 min	1x
Zugabe des Startansatzes		
94°C	30 sec	35x
67°C	45 sec	
72°C	1 min	
72°C	8 min	1x
8°C	forever	

Diese PCR erfolgt als „Hotstart“-PCR, bei Vorliegen des Cx45wt Allels entsteht ein PCR-Amplikon von 600 bp, bei Vorliegen des Cx45^{lacZ} Allels ein Amplikon von 900 bp.

3.1.10.2.4 PCR zum Nachweis des Ersatzes der kodierenden Region des Cx43 durch Cx26

Reaktionsansatz:

DNS	1,0 µl
PCR-Puffer (5x)	5,0 µl
MgCl ₂ [25 mM]	1,75 µl
dNTP's [2,5mM]	0,5 µl
Cx43-RO4 [10 µM]	1,0 µl
KI26Cx26 [10 µM]	1,0 µl
Cx43-HO2 [10 µM]	2,0 µl
A.bidest	12,55 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

Reaktionsprogramm:

95°C	5 min	1x
94°C	30 sec	40x
62°C	45 sec	
72°C	90 sec	
72°C	10 min	1x
8°C	forever	

Bei Anwesenheit eines Cx43wt Allels entsteht ein Amplikon von 381 bp, im Falle des Cx43²⁶ Allels ein PCR-Amplikon von 529 bp.

3.1.10.2.5 PCR zum Nachweis des Ersatzes von Cx43 durch Cx32

Reaktionsansatz:

DNS	1,0 µl
PCR-Puffer (5x)	5,0 µl
MgCl ₂ [25 mM]	1,75 µl
dNTP's [2,5mM]	0,5 µl
Cx43-RO4 [100 µM]	0,2 µl
Cx32-HO2 [100 µM]	0,2 µl
Cx43-HO2 [100 µM]	0,1 µl
A.bidest	16,1 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

Reaktionsprogramm:

95°C	5 min	1x
94°C	30 sec	40x
62°C	45 sec	
72°C	90 sec	
72°C	10 min	1x
8°C	forever	

Bei Anwesenheit eines Cx43wt Allels entsteht ein Amplikon von 381 bp, im Falle des Cx43³² Allels ein PCR-Amplikon von 564 bp.

3.1.10.2.6 PCR zum Nachweis des Cx43^{tetOeGFP} Transgens

Reaktionsansatz:

DNS	1,0 µl
PCR-Puffer (5x)	5,0 µl
MgCl ₂ [25 mM]	2,0 µl
dNTP's [2mM]	2,0 µl
Cx43rev2 [25 µM]	1,0 µl
eGFP-3B [25 µM]	1,0 µl
A.bidest	12,8 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

Reaktionsprogramm:

95°C	5 min	1x
95°C	30 sec	35x
69°C	2 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1x
8°C	Forever	

Bei Anwesenheit des Cx43^{tetOeGFP} Transgens wird ein Fragment von 1,9 kb amplifiziert.

3.1.10.2.7 PCR zum Nachweis des MCKtTA Transgens

Reaktionsansatz:

DNS	1,0 µl
PCR-Puffer (5x)	5,0 µl
MgCl ₂ [25 mM]	2,0 µl
dNTP's [2mM]	2,0 µl
Tet23 [25 µM]	1,0 µl
Tet27 [25 µM]	1,0 µl
A.bidest	12,8 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

Reaktionsprogramm:

94°C	3 min	1x
94°C	30 sec	35x
63°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1x
8°C	forever	

Liegt das MCKtTA Transgen im Genom der Mäuse vor, wird ein PCR-Fragment von 220 bp amplifiziert.

3.2 RNS-Arbeiten

Zur Verhinderung des Abbaus der RNS durch endogene und exogene RNasen ist es notwendig, Lösungen zu verwenden, in denen die RNasen durch Behandlung mit DEPC, einem Reagenz, welches zur Methylierung der Proteine führt, inaktiviert wurden.

3.2.1 RNS-Isolierung aus Zellen und Geweben

Die Isolierung von Gesamt-RNS (rRNS, tRNS, hnRNS und mRNS) aus Geweben und Kulturzellen mittels TRIzol[®] Reagent beruht auf der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Das TRIzol[®] Reagent ist eine homogene Lösung hauptsächlich bestehend aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat.

Den durch zervikale Dislokation getöteten Mäusen werden die verschiedenen Organe entnommen und in PBS⁻ gewaschen, um Verunreinigungen durch Blut, Haare etc. zu entfernen. Anschließend werden die Gewebe in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sie können so bei -70°C gelagert werden.

Jeweils 500 mg des eingefrorenen Gewebes werden in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt und 5 ml TRIzol[®] Reagent unter dem Abzug hinzugegeben. Das Gewebe wird mit einem Polytron-Homogenisatorstab zerkleinert (Stufe 5, 30 sec). Nach jeder Homogenisierung wird der Polytron-Homogenisatorstab mit DEPC-H₂O von Geweberesten befreit. Die Gewebelysate werden in ein steriles 13 ml Röhrchen überführt, mit 1 ml Chloroform versetzt und kurz geschüttelt, es erfolgt eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Zur Phasentrennung werden die Proben zentrifugiert (12000 Upm, 4°C, 15 min), die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues 13 ml Röhrchen überführt. Hierzu werden zur Fällung der RNS 2,5 ml Isopropanol zugegeben, die Proben kurz invertiert und die RNS durch Zentrifugation (12.000 Upm, 4°C, 15 min) sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstands wird das Pellet mit 80%-igem Ethanol gewaschen (12000 Upm, 4°C, 15 min) und die RNS bei RT an der Luft getrocknet. Die getrocknete RNS wird in DEPC-H₂O aufgenommen und bei 65°C im Wasserbad für 10 min gelöst. Die RNS kann bei -70°C gelagert werden.

3.2.2 RT-PCR Analysen

Mit der Technik der RT-PCR ist es möglich, geringe Transkriptmengen in Geweben und Zellen nachzuweisen. Hierzu wird die im Reaktionsansatz vorhandene mRNA durch die MMLV Reverse Transkriptase (isoliert aus Moloney Murine Leukemia Virus) und ein oligo-dT₁₅ Startermolekül in cDNS umgeschrieben, welche in der folgenden PCR-Reaktion als Matrize verwendet wird. Mit spezifischen Startermolekülen entsteht somit ein PCR-Produkt, das zum Nachweis des gesuchten mRNA-Transkripts dient.

3.2.2.1 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription werden 2 µg Gesamt-RNS eingesetzt (1,0 - 1,5 µl). Diese werden mit 1 µl Oligo-dT₁₅ [0,5 µg/µl] versetzt und das Volumen des Reaktionsansatzes auf 12 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Die RNS wird bei 70°C für 10 min denaturiert und zur Anlagerung der Startermoleküle auf Eis für 2 min abgekühlt. Zum Start der Reversen Transkription werden die folgenden Komponenten beigefügt: 1 µl dNTP's [je 10 mM], 4 µl 5 x 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 cDNS ist bei -70°C lagerbar. Für die darauffolgenden PCR-Reaktionen wird jeweils 1 µl cDNS eingesetzt.

3.2.2.2 PCR-Analyse zum Nachweis verschiedener cDNS-Moleküle

Reaktionsansatz:

cDNS	1 µl
PCR-Puffer (5x)	10 µl
MgCl ₂ [25 mM]	3 µl
dNTP's [2,5mM]	2 µl
Primer USP [10 µM]	2 µl
Primer DSP [10 µM]	2 µl
A.bidest	29 µl
Taq-Polymerase	1 µl

Reaktionsprogramm:

94°C	3 min	1x
94°C	1 min	10x
65→55°C	1 min	
72°C	2 min	
94°C	1 min	25x
55°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	7 min	1x
8°C	forever	

Mit dieser PCR-Reaktion ist die Amplifikation verschiedener cDNS-Fragmente mit den unter Abschnitt 2.12.1 genannten Primer-Kombinationen möglich.

3.3 Enzymatische Modifikation, homologe Rekombination in *E.coli* und Transformation von DNS

3.3.1 Restriktion der DNS

Für die Restriktion der DNS werden Restriktionsendonukleasen des Typ II verwendet. Sie erkennen doppelsträngige, palindromische DNS-Abschnitte von 4 bis 8 Basenpaaren Länge und schneiden fast immer innerhalb der Erkennungssequenz. In Folge der Restriktion entstehen entweder glatte Doppelstrangenden oder Einzelstrangenden mit einem 3'- oder einem 5'-Überhang (kohäsive Enden).

Für die vollständige Spaltung der DNS werden 2 U Restriktionsendonuklease pro µg DNS bei der vom Hersteller angegebenen Reaktionstemperatur eingesetzt, es wird ein Reaktionsvolumen von 20 µl gewählt; die Inkubationszeit beträgt mindestens 30 min.

3.3.2 Auffüllen klebriger Enden

Durch Restriktionsspaltung entstandene überhängende DNS-Enden werden entweder durch die Klenow-DNS-Polymerase I aus *E.coli* oder die T4-DNS-Polymerase aus dem Phagen T4 geglättet. Um ein 5'-überhängendes Ende aufzufüllen, wird das Klenow-Fragment verwendet, zum Abbau 3'-überhängender Enden die T4-DNS-Polymerase.

Das Glätten wird im Falle der Klenow-DNS-Polymerase I in einem Restriktionsansatz von 20 µl mit 1 µl dNTP's sowie 1 µl Enzym in Puffer H (Roche) für 45 min bei 37°C durchgeführt. Bei Einsatz der T4-DNS-Polymerase werden zu 20 µl Restriktionsansatz 2 µl dNTP's, 2 µl T4-DNS-Polymerase und 2,5 µl Puffer (10x) hinzugegeben. Der Ansatz wird bei RT für 5 min inkubiert. In beiden Ansätzen wird das Enzym anschließend hitzeinaktiviert (20 min bei 65°C) und die DNS präzipitiert oder durch Gelelution aufgereinigt.

3.3.3 Dephosphorylierung von Vektorenden

Die Dephosphorylierung von Vektorenden wird eingesetzt, um die Religation des linearisierten Vektorrückgrates zu verhindern. Hierzu werden die durch die Restriktion entstandenen freien 5'-Phosphatgruppen mit der alkalischen Phosphatase aus Krabben (SAP = shrimp alkaline phosphatase) entfernt. Der Restriktionsansatz bzw. das Geleluat wird mit 1,5 µl SAP und 1/10 Vol. 10 x Phosphatasepuffer versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach werden weitere 1,5 µl SAP hinzugegeben und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgt eine Hitzeinaktivierung der SAP bei 65°C für 20 min.

3.3.4 Ligation der DNS-Fragmente

Die Ligation von DNS-Fragmenten wird mit Hilfe der T4-DNS-Ligase durchgeführt. Sie verknüpft ATP-abhängig freie 5'-Phosphatgruppen mit freien 3'-Hydroxylgruppen von DNS-Molekülen durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen. Die Ligation kann zwischen glatten oder kohäsiven Enden stattfinden.

Vektor- und Passagier-DNS werden im molaren Verhältnis von eins zu drei eingesetzt und mit 1 µl T4-Ligase sowie 1 µl Ligase-Puffer (10x) versetzt, das Reaktionsvolumen beträgt 10 µl. Die Ligation erfolgt entweder bei RT für 2 h oder ÜN bei 4°C.

3.3.5 Transformation

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme freier Fremd-DNS durch Prokaryoten. Die Bakterienzellwand wird bei dem Verfahren nach Hanahan (1983) durch Behandlung mit Ca_2Cl porös gemacht, so dass die Aufnahme der DNS ermöglicht wird.

3.3.5.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Mit einer Einzelkolonie werden 2,5 ml YT^{++} -Medium inokuliert und ÜN auf dem Thermoschüttler bei 225 Upm und 37°C inkubiert. Hiervon werden 50 μl abgenommen, in 5 ml YT^{++} -Medium überführt und bei 37°C für 90 min bei 37°C (Schüttler, 225 Upm) kultiviert. Sie werden als Vorkultur zu 100 ml vorgewärmtem YT^{++} -Medium gegeben. Die Kultur wird bis zu einer OD_{600} von 0,45 bis 0,55 bei 37°C geschüttelt (225 Upm). Anschließend wird die Kultur auf zwei 50 ml Röhren aufgeteilt und die Bakterien sedimentiert (5000 Upm, 4°C , 5 min). Der Überstand wird dekantiert und das Sediment bei 4°C in 10 ml TFB I resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis schließt sich eine erneute Sedimentation (5000 Upm, 4°C , 5 min) an, der Überstand wird verworfen. Die Sedimente werden bei 4°C in je 2 ml TFB II aufgenommen und Aliquots von 100 μl Bakteriensuspension in Mikroreaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Bakterien sind bei -70°C über mehrere Monate lagerbar.

3.3.5.2 Durchführung der Transformation

Pro Transformationsansatz wird ein Aliquot (100 μl) transformationskompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und dem Ligationsansatz beigefügt. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit adsorbiert die DNS an die Bakterienzellwand. Zur Transformation wird ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sec durchgeführt und der Ansatz sofort auf Eis gekühlt. Durch den Hitzeschock wird die DNS in die Bakterienzelle aufgenommen. Zum Transformationsansatz werden 400 μl LB-Medium gegeben und der Ansatz bei 37°C auf dem Schüttler (225 Upm) für 90 min inkubiert. In dieser Zeit prägt sich die auf dem Plasmid kodierte Antibiotika-Resistenz

aus. Es werden je 100 µl und 400 µl der Bakteriensuspension auf LB-Platten mit einem geeigneten Antibiotikum ausgestrichen und die Platten bei 37°C ÜN inkubiert.

3.3.6 Homologe Rekombination in *E.coli*

Zur Erzeugung des Cx45eGFP BAC wird das System der homologen Rekombination in *E.coli* eingesetzt (vgl. Abschnitt 1.3.3).

3.3.6.1 Erzeugung transformationskompetenter Bakterien für die homologe Rekombination in *E.coli*

Mit einer Einzelkolonie der den BAC (Cx45-BAC) enthaltenden Bakterien werden 3 ml LB-Medium mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol inokuliert und die Kultur ÜN bei 37°C im Schüttler bei 225 Upm kultiviert. Von dieser Übernachtskultur werden 0,5 ml in 50 ml LB-Medium mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol bei 37°C im Schüttler bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Nach Abkühlen der Kultur für 10 min auf Eis erfolgt eine Zentrifugation bei 3.000 Upm und 4°C. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in eiskaltem TB-Medium resuspendiert und mit 7% DMSO versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis können Aliquots von 0,5 ml in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Die Lagerung erfolgt bei -70°C.

3.3.6.2 Erzeugung der Co-Integrate

Die kompetenten, den BAC enthaltenden, Bakterien werden wie unter Abschnitt 3.3.5.2 beschrieben mit dem Shuttlevektor transformiert. Bei der Transformation wird der Hitzeschock allerdings bei 37°C durchgeführt und die Bakterien nach erfolgter Transformation auf LB-Platten mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml) und Tetrazyklin (10 µg/ml) ausgestrichen. Die Bebrütung der Platten erfolgt bei 30°C ÜN.

Zur Isolierung der Co-Integrate werden entstandene Einzelkolonien in 1 ml LB-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml) und Tetrazyklin (10 µg/ml) ausgestrichen und bei 43°C ÜN bebrütet. Auf der Platte ist am nächsten Tag ein dünner Bakterienrasen mit vereinzelt größeren Kolonien zu

sehen. Diese werden in 3 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml) und Tetrazyklin (10 µg/ml) überführt und eine Plasmidisolierung (vgl. Abschnitt 3.1.1) mit anschließender Southern Blot Hybridisierung (vgl. Abschnitt 3.4.1) durchgeführt.

3.3.6.3 Selektion auf die Entstehung des Cx45eGFP BACs

Zur Selektion auf die Entstehung des Cx45eGFP BACs werden die positiv getesteten Bakterienkolonien jeweils auf einer LB-Platte mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml) ausgestrichen und bei 43°C inkubiert. Während dieser Zeit ist die Auflösung des Cointegrats möglich, so dass der gewünschte BAC entstehen kann. Anschließend wird auf die Abwesenheit der Tetrazyklin-Resistenz selektioniert, indem Einzelkolonien der auf den LB-Platten mit Chloramphenicol (12,5 µg/ml) gewachsenen Bakterien auf Fusarinsäure-Platten ausgestrichen werden. Die Platten werden bei 37°C für 2-3 Tage inkubiert. Es wird eine Plasmidpräparation (vgl. Abschnitt 3.1.1) mit anschließender Southern-Blot Hybridisierung (vgl. Abschnitt 3.4.1) durchgeführt. Zur Oozyteninjektion wird der entstandene BAC wie unter 3.1.4 beschrieben aufgereinigt.

3.4 Nukleinsäuretransfer

Die zu untersuchenden Nukleinsäuren werden auf einer Nitrozellulose- oder Nylonmembran immobilisiert, so dass eine Detektion spezifischer Nukleinsäuremoleküle durch Anlagerung einer radioaktiv oder DIG-markierten Sonde möglich ist.

3.4.1 Transfer von DNS (Southern Blot)

Beim Southern-Blot (Southern, 1975) wird die DNS von einem Agarosegel durch Kapillarsog auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Die vollständig gespaltene genomische DNS, BAC-DNS oder Cosmid-DNS wird über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit einem fluoreszierenden Lineal unter dem UV-Transilluminator dokumentiert. Durch 15-minütige Inkubation mit Depurinierungslösung bei RT wird die DNS im Agarosegel depurinisiert und anschließend für 30 min bei RT denaturiert (Denaturierungslösung). Das Gel wird kurz in A. bidest gewaschen und für 20 min bei RT neutralisiert (Neutralisierungslösung).

Für den Aufbau des Kapillarblots wird eine Melaminschale mit 20 x SSC gefüllt und eine Glasplatte quer darüber gelegt. Auf die Glasplatte wird ein in 20 x SSC getränktes 3MM-Papier (Brücke) gelegt, welches mit beiden Enden in den Puffer eintaucht. Das Gel wird nun invertiert auf das 3MM-Papier gelegt, darüber wird die angefeuchtete Membran luftblasenfrei ausgebreitet und mit zwei feuchten 3MM-Papieren in Gelgröße abgedeckt. Mit Haushaltsfolie werden die freie Glasplatte und die Brücke abgedichtet, so dass der Kapillarsog nur durch das Gel erfolgen kann. Der Aufbau des Blots wird mit einem ca. 15 cm hohen Stapel Handtuchpapier (Tork) abgeschlossen, der mit einer Glasplatte und einem Gewicht von ca. 1 kg beschwert wird. Der Transfer der DNS findet über 24 h statt. Nach Beendigung des DNS-Transfers wird die Position der Geltaschen auf der Membran vermerkt, die DNS auf der Membran UV-vernetzt und die Membran anschließend bei RT getrocknet. Der Nachweis der Vollständigkeit des DNS-Transfers erfolgt durch Betrachten der Membran und des Gels unter der UV-Handlampe.

3.5 Erzeugung markierter Sonden

3.5.1 Erzeugung radioaktiv markierter Sonden

Zur Herstellung radioaktiv markierter DNS wird ein Reagenziensatz (Megaprime DNS Labelling System, Amersham) eingesetzt. Es wird ein Gemisch hexamerer Startermoleküle zufälliger Sequenz verwendet, welche mit der einzelsträngigen DNS hybridisieren und vom Klenow-Fragment der DNS-Polymerase in Anwesenheit von [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) verlängert werden. Die Sonde erhält man durch Restriktionsspaltung der entsprechenden Plasmid-DNS mit anschließender Auftrennung über ein Agarosegel und Elution aus dem Gel; die Konzentration des Eluats wird bestimmt, 50 ng DNS werden auf ein Volumen von 31 μl mit A. bidest aufgefüllt und 5 μl hexamere Startermoleküle zugegeben. Der Ansatz wird 5 min bei 100°C erhitzt, für 5 min auf Eis abgekühlt und mit 10 μl Markierungspuffer – enthält nicht radioaktives dATP, dGTP und dTTP – versetzt. Zusätzlich werden dem Reaktionsansatz 2 μl [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) und 2 μl Klenow-Polymerase (1 U/ μl) beigemischt und der Ansatz bei 37°C für 45 min inkubiert.

Um freie, radioaktive Nukleotide abzutrennen, wird eine Sephadex G50 Säule eingesetzt. Zur Herstellung dieser Säule wird eine 1 ml Spritze mit autoklavierter,

silikonisierter Glaswolle abgedichtet und mit Sephadex G50 überschichtet. Die Säule wird in ein 13 ml Röhrchen gehängt und das Säulenmaterial durch Zentrifugation (1 min, 1000 Upm, RT) verdichtet; der Durchfluss wird verworfen.

Der gesamte Syntheseansatz wird mit 150 µl TE-Puffer verdünnt und auf die Säule gegeben, es folgt ein erneuter Zentrifugationsschritt (2 min, 1000 Upm, RT). Im Durchfluss ist die radioaktiv markierte Sonde enthalten, er wird in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß aufgefangen, hiervon wird 1 µl im Szintillationszähler vermessen.

3.5.2 Erzeugung DIG-markierter Sonden

Zur Herstellung DIG-markierter Sonden wird der Reagenziensatz DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II der Firma Roche nach Herstellerangaben eingesetzt.

3.6 Nukleinsäure-Hybridisierung

3.6.1 Nukleinsäure-Hybridisierung mit QuickHyb[®]

3.6.1.1 Vorhybridisierung der Membran

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird die Membran in der Hybridisierungslösung vorinkubiert. Hierzu wird die angefeuchtete Membran luftblasenfrei in die Hybridisierungsröhre überführt und nach Herstellerangaben für eine Stunde bei 68°C im Rollinkubator inkubiert. Die Hybridisierungslösung wurde zuvor auf 68°C erhitzt und soviel Hybridisierungslösung in die Röhre gegeben, dass die Membran vollständig benetzt ist.

3.6.1.2 Hybridisierung der Membran

Die Hybridisierung erfolgt nach Zugabe der denaturierten radioaktiv markierten Sonde (5 min, 100°C) nach Herstellerangaben bei 68°C für 1 h im Rollinkubator.

3.6.1.3 Waschen der Membran

Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde wird die Membran aus der Hybridisierungsröhre in eine Kunststoffschale überführt und mit Waschlösung (2x SSC/0,1 % SDS) abgespült. Es folgen zwei Waschschrte bei 68°C mit 2x SSC/0,1 % SDS für je 15 min und zwei Waschschrte bei 68°C mit 0,1x SSC/0,1 % SDS für je 15 min. Die Abnahme der Radioaktivität auf der Membran wird nach jedem Waschschrte mit einem Handmessgerät kontrolliert.

3.6.1.4 Autoradiographie

Nach dem letzten Waschschrte wird die Membran feucht in Haushaltsfolie eingeschweißt, in eine Röntgenfilmkassette eingelegt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionszeit des Films variiert zwischen einem Tag und drei Wochen bei -70°C abhängig von der Signalstärke. Der Film wird in einer Entwicklermaschine entwickelt.

3.6.2 Nukleinsäure-Hybridisierung mit DIG Easy Hyb

Die nicht-radioaktive Nukleinsäure-Hybridisierung wird mit dem DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit Reagenziensatz nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.7 Kultivierung adhärent wachsender Säugerzellen

Alle Arbeiten zur Kultivierung eukaryontischer Zellen werden in Sterilbänken mit Laminar-Luftstrom (BDK) unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.7.1 Kultivierung von C₂C₁₂ Zellen

Die Zellen werden in Inkubatoren und wassergesättigter Atmosphäre in D10-Medium bei 37°C und 10 % CO₂ kultiviert. Nach ca. zwei bis drei Tagen ist ein Wechsel des Mediums und/oder Passagieren der Zellen notwendig.

3.7.1.1 Passagieren von C₂C₁₂ Zellen

C₂C₁₂ Zellen werden bei einer Konfluenz von ca. 50 % im Verhältnis eins zu zehn bis eins zu fünfzig aufgeteilt. Hierfür wird das Medium abgesaugt, die Zellen werden mit PBS⁻ gewaschen und 1/10 des Kulturvolumens an Trypsin hinzugegeben. Nach 3-minütiger Inkubation bei 37°C werden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden der Kulturschale abgelöst und das Trypsin durch Zugabe von Medium inaktiviert. Die Zellen werden in den gewünschten Verdünnungen neu ausplattiert.

3.7.1.2 Differenzierung von C₂C₁₂ Zellen

C₂C₁₂ Zellen können zu Myotuben differenziert werden. Hierzu wachsen die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% in Kulturmedium. Durch Wechsel des Mediums zu Differenzierungsmedium erfolgt die Induktion des Differenzierungsprozesses.

3.7.1.3 Einfrieren und Auftauen von C₂C₁₂ Zellen

Durch Behandlung mit Trypsin werden die C₂C₁₂-Zellen einer 10 cm-Schale mit 50 % Konfluenz vom Schalenboden abgelöst. Sie werden sedimentiert (5 min, 800 Upm, RT), in 900 µl Kulturmedium-Medium aufgenommen und in eine Einfrierampulle überführt, in die zuvor 100 µl DMSO vorgelegt wurden. Die befüllte Einfrierampulle wird 5 min auf Eis und anschließend 20 min bei -20°C gelagert, um ein schonendes Einfrieren zu gewährleisten. Es schließt sich eine Lagerung der Zellen bei -70°C für mindestens 24 h an, bevor die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt werden können.

3.7.1.4 Transfektion von C₂C₁₂ Zellen

Die C₂C₁₂ Zellen werden in 96-Loch Schalen mit siRNS gegen Cx43 (siRNA smart pool, Dharmacon) nach Herstellerangaben durch Lipofektion mit DharmaFECT1 (Dharmacon) transfiziert.

3.7.2 Kultivierung von HeLa Zellen

Die Zellen werden in Inkubatoren (Heraeus) und wassergesättigter Atmosphäre in D10-Medium bei 37°C und 10 % CO₂ kultiviert. Nach ca. zwei bis drei Tagen ist ein Wechsel des Mediums und/oder Passagieren der Zellen notwendig.

3.7.2.1 Passagieren von HeLa Zellen

HeLa-Zellen werden bei einer Konfluenz von ca. 90 % im Verhältnis eins zu zwei bis eins zu zehn aufgeteilt. Hierfür wird das Medium abgesaugt, die Zellen werden mit PBS⁻ gewaschen und 1/10 des Kulturvolumens an Trypsin hinzugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei 37°C werden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden der Kulturschale abgelöst und das Trypsin durch Zugabe von Medium inaktiviert. Die Zellen werden in den gewünschten Verdünnungen neu ausplattiert.

3.7.2.2 Einfrieren und Auftauen von HeLa Zellen

Durch Behandlung mit Trypsin werden die HeLa-Zellen einer 10 cm-Schale mit 90 % Konfluenz vom Schalenboden abgelöst. Sie werden sedimentiert (5 min, 800 Upm, RT), in 900 µl D10-Medium aufgenommen und in eine Einfrierampulle überführt. In die Einfrierampulle wurden zuvor 100 µl DMSO vorgelegt. Die befüllte Einfrierampulle wird 5 min auf Eis und anschließend 20 min bei -20°C gelagert, um ein schonendes Einfrieren zu gewährleisten. Es schließt sich eine Lagerung der Zellen bei -70°C für mindestens 24 h an, bevor die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt werden können.

3.7.3 Kultivierung embryonaler Stammzellen der Maus

3.7.3.1 Kulturbedingungen von ES-Zellen der Maus

HM-1 embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden aus agouti-farbenen, männlichen Blastozysten des Mausstamms Sv129P2/OlaHsd isoliert (Magin et al., 1992). Sie wachsen auf gelatinisierten Kulturschalen in Gegenwart von löslichem LIF. Die Kultivierung embryonaler Stammzellen erfolgt in Inkubatoren in einer

wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt. Angaben über Kultur, Transfektion und Analyseverfahren finden sich auch in Theis et al., 2000.

3.7.3.2 Passagieren von ES-Zellen der Maus

Nach vollständiger Abnahme des Kulturmediums wird der Zellrasen zur Entfernung aller Mediumreste und toter Zellen zweimal mit PBS⁻ (37°C) gewaschen. Anschließend wird mit 1/6 Kulturvolumen ES-Trypsin gewaschen, um PBS⁻-Reste zu entfernen. Durch Zugabe von 1/7 Kulturvolumen ES-Trypsin werden die adhären wachsenden Zellen in einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C vom Kulturgefäßboden abgelöst und durch Klopfen an die Kulturgefäßwand vereinzelt. Die Reaktion wird durch Zugabe von einem Volumen Kulturmedium abgestoppt und die Zellen anschließend sedimentiert (7 min, 800 UpM, RT). Das Sediment wird in einem geeigneten Volumen frischen Mediums resuspendiert und in gewünschter Dichte auf gelatinisierte Kulturgefäße ausgesät.

3.7.3.3 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen der Maus

HM-1 Zellen werden in ES-WT-Medium kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 90-100 % trypsiniert. Die in ES-WT-Medium resuspendierten Zellen werden mit ES-Einfriermedium versetzt, in einem mit Isopropanol befüllten Einfrierbehälter bei -70°C eingefroren und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Die in Einfrierröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden schnell in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut. Anschließend wird die Zellsuspension in 9 ml ES-Normalmedium überführt, durchmischt und zentrifugiert (7 min, 800 UpM, RT). Nach dem Entfernen des Überstands wird das Zellsediment in einem gewünschten Volumen Medium resuspendiert und auf eine gelatinisierte Kulturschale gewählter Größe ausgesät.

3.7.3.4 Elektroporation der ES-Zellen

Die stabile Transfektion von HM-1 ES-Zellen erfolgt mit Hilfe der Elektroporation. Der Austauschvektor (200–350 µg) wird über den Reagenziensatz Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kits aufgereinigt, linearisiert und in Endotoxin-freiem TE-Puffer resuspendiert. Die ES-Zellen werden unter Standardbedingungen bis zur Konfluenz (T75) kultiviert. Nach Bestimmung der Zellzahl werden 3×10^7 Zellen in HBS-Puffer aufgenommen und mit dem linearisierten Austauschvektor zur Elektroporation eingesetzt. Die elektroporierten Zellen werden in unterschiedlicher Verdünnung ausplattiert.

3.7.3.5 Selektion auf stabile Integration und homologe Rekombination

Die Selektion wird auf Anwesenheit eines Selektionsmarkergens (Neomycin) durchgeführt. Das Selektionsmedium wird alle 2-3 Tage gewechselt. Resistente Klone werden unter Selektionsdruck ausgewählt, vereinzelt und mit ES-WT-Medium kultiviert.

Nach Erreichen der Konfluenz werden zwei Drittel der Zellsuspension weiterkultiviert und ein Drittel zur Gewinnung genomischer DNS verwendet, die zur PCR eingesetzt wird (vgl. Abschnitt 3.1.10.1). Nach Expansion der potentiell positiven Klone wird ein Teil der Zellen zu weiteren Verwendungszwecken (z.B. Blastozysteninjektion) eingefroren (vgl. Abschnitt 3.7.3.3). Die verbleibenden Zellen werden zur genomischen DNS-Gewinnung und anschließender Southern-Blot Hybridisierung (vgl. Abschnitt 3.4.1) sowie zur Karyotyp Analyse (vgl. Abschnitt 3.7.3.6) eingesetzt.

3.7.3.6 Karyotypanalyse

Die Zellen werden durch Inkubation mit Colzimid in der Metaphase der Mitose arretiert. Durch die Behandlung mit isotonischer KCl-Lösung schwellen die Zellen osmotisch an. Die Fixierung der Zellen erfolgt durch Zugabe von eiskaltem, frisch angesetztem Methanol-Eisessig nach Sedimentation der Zellen. Nach der letzten Sedimentation werden die Zellen mit einer Pasteurpipette aus 20–30 cm Höhe auf saubere Objektträger aufgetropft. Die Chromosomen werden mit der Giemsa

Färbelösung angefärbt und durch Waschen mit Leitungswasser differenziert. Die Objektträger werden nach dem Trocknen mit Entellan versehen und mit einem Deckglas verschlossen.

3.8 Zucht und Haltung von Mäusen

Die Mäuse werden in offenen Tierställen bei einem konstanten Licht-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden mit Futter und Wasser *ad libidum* gehalten. Für die Bestimmung des embryonalen Entwicklungsstadiums wird von einer Kopulation zur Mitte der Dunkelphase ausgegangen. Verpaarungen werden durch die gemeinsame Haltung eines Männchens mit 1-2 Weibchen in einem Käfig angesetzt. Erfolgreiche Verpaarungen werden zu Beginn der nächsten Lichtphase anhand eines als Vaginalpfropf in der Vagina des Weibchens verbliebenen Ejakulats erkannt. Die Mitte der Lichtphase nach der Kopulation wird als 0,5 dpc (dies post coitum) definiert.

3.8.1 Blastozysteninjektion und Uterustransfer

3.8.1.1 Superovulation

Durch diese Hormonbehandlung wird eine vermehrte Follikelreifung und ein koordinierter Eisprung induziert und es können bis zu 20 Blastozysten aus einem stimulierten Weibchen isoliert werden. Hierzu werden Weibchen vor Einsetzen des natürlichen Zyklus im Alter von 4 Wochen verwendet. Zur Mitte des Lichtzyklus wird je Weibchen 100 µl FSH-Lösung (5 U) intraperitoneal injiziert. Etwa 47 Stunden später wird der Eisprung durch eine intraperitoneale Injektion von 100 µl hCG-Lösung (5 U) synchron ausgelöst. Anschließend werden die so behandelten Weibchen für eine Verpaarung eingesetzt und der Verpaarungserfolg am nächsten Morgen bestimmt.

3.8.1.2 Blastozysteninjektion und Uterustransfer

Eine detaillierte methodische Beschreibung zur Erzeugung chimärer Mäuse findet sich bei Nagy et al. (2003). Die Injektionen embryonaler Stammzellen mit dem Genotyp $Cx39^{GFPneo/+}$ in Blastozysten sowie der Transfer der manipulierten Blastozysten in die Uteri scheinschwangerer Weibchen wurden von Christine Siegmund (Universität Bonn) durchgeführt.

Zur Identifizierung genetisch veränderter Mäuse nach Blastozysteninjektion homolog rekombinierter embryonaler Stammzellen wird häufig die Fellfarbe als genetischer Marker genutzt (Nagy et al., 2003). Wildtyp-ES-Zellen der Linie HM1 (Magin et al., 1992) aus dem Mausstamm 129P2/OlaHsd sind die Ausgangszellen zur Erzeugung der $Cx39^{GFPneo/+}$ -ES-Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit zur Erzeugung einer $Cx39^{GFP}$ -Mauslinie verwendet wurden. Mäuse des entsprechenden Stammhintergrundes prägen aufgrund einer Inhibition der Melaninproduktion in den Haarfollikeln die Fellfarbe agouti dominant aus. Die $Cx39^{GFPneo/+}$ -ES-Zellen werden in Blastozysten von C57BL/6-Weibchen (Fellfarbe: schwarz) transferiert. Der Beitrag der transferierten ES-Zellen zur Entwicklung der Nachkommen kann anhand des Fellfarbenschimärismus abgeschätzt werden (Anteil agouti an schwarz). Der Beitrag der manipulierten ES-Zellen zur Bildung von Keimzellen wird durch Verpaarung dieser Chimären mit C57BL/6-Mäusen überprüft. Das Auftreten vollständig agoutifarbener Nachkommen weist die Keimbahntransmission nach. Diese Nachkommen werden nach Genotypisierung und Verpaarung mit C57BL/6-Mäusen zur Expansion der neuen Mauslinie eingesetzt.

3.8.2 Erzeugung der Cx45eGFP Mauslinie durch Oozyteninjektion

Cx45eGFP Mäuse wurden durch Injektion des Cx45eGFP BAC in Oozyten aus FVB/N x C57BL/6 Verpaarungen erzeugt. Hierzu wurde der Cx45eGFP-BAC mit PISceI linearisiert. Die Injektionen wurden von Charlotte Schick und Jürgen Schmidt (Haus für experimentelle Therapie, Universität Bonn) durchgeführt. Für die Injektion wurde der Cx45eGFP in einer Konzentration von 1 -3 ng/ μ l eingesetzt.

3.9 Mikroinjektion in das neonatale Zwerchfell der Maus

3.9.1 Isolierung des neonatalen Zwerchfells

Die neugeborenen Mäuse werden getötet und das Zwerchfell vorsichtig herausgenommen und sofort in einer mit Carbon-begastem Krebs-Henseleit-Puffer gefüllte Durchflussskammer inkubiert.

3.9.2 Mikroinjektion von Alexa488 und Rhodamin-Dextran

Das Zwerchfell wird in der Durchflussskammer befestigt und während der gesamten Zeit von Carbon-begastem Krebs-Henseleit-Puffer umspült. Die Injektion des Alexa488 bzw. Rhodamin-Dextran erfolgt mit einer scharfen Elektrode durch Anlegen eines Stroms von 2 nA für 2 min. Das Membranpotential wird vor und nach der Injektion gemessen, Injektionen mit einem Membranpotential von weniger als -30mV werden nicht in die Auswertung einbezogen.

3.10 Affinitätschromatische Aufreinigung von Antiseren

Zur Aufreinigung polyklonaler Antikörper aus Seren immunisierter Tiere (z.B. Kaninchen, Meerschweinchen) wird die Affinitätschromatographie eingesetzt. Das Antigen, gegen welches die Antikörper gerichtet sind, wird an eine Säulenmatrix gekoppelt. Die Säule wird mit dem Antiserum inkubiert, die entsprechenden Antikörper können durch Bindung an das Antigen aus dem Serum isoliert werden.

Das System für die Kopplung des Peptids und die affinitätschromatographische Aufreinigung des Serums besteht aus einer regulierbaren peristaltischen Pumpe, einem UV-Detektor und einem Fraktionssammler.

3.10.1 Kopplung des Antigens an eine Säulenmatrix

An die Affinitätssäule (HiTrap[®] affinity column, Amersham) werden 4 mg Peptid gekoppelt, gegen welches der Antikörper gerichtet ist, gelöst in 4 ml Kopplungspuffer.

Hierfür wird die Affinitätssäule mit 12 ml HCl (1 mM, eiskalt) und einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen, im Anschluss wird die Peptidlösung auf die Säule gegeben, diese zirkuliert bei RT für 30 min mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Säule wird nun mit 8 ml Kopplungspuffer gewaschen und der Durchfluss (Waschauffang) für die Messung der Kopplungseffizienz verwahrt. Durch aufeinanderfolgendes Waschen mit Puffer A, Puffer B und Puffer A (je 12 ml, RT, 1 ml/min) wird die Säule deaktiviert. Nach 30-minütiger Inkubation der Säule bei RT folgen Waschschrte mit Puffer B, Puffer A und Puffer B (je 12 ml, RT, 1 ml/min). Für die Lagerung wird die Säule mit 12 ml Lagerungspuffer gewaschen und bei 4°C aufbewahrt.

Die Messung der Kopplungseffizienz des Peptids an die Affinitätssäule kann mit diesem Verfahren nur durchgeführt werden, wenn das Peptid mindestens einen aromatischen Aminosäurerest besitzt, da die Absorption bei 280 nm (A_{280}) bestimmt wird. Als Referenzwert dient ein Gemisch aus Kopplungspuffer und Glyzin-HCl-Lösung im Verhältnis eins zu eins. Die eins zu fünf mit Kopplungspuffer verdünnte Peptidlösung wird mit dem gleichen Volumen Glyzin-HCl-Lösung vermischt und die Absorption bei 280 nm (A_V) bestimmt. Der Waschauffang wird ebenfalls eins zu eins mit Glyzin-HCl-Lösung verdünnt und die Absorption bei 280 nm (A_N) bestimmt. Die Kopplungseffizienz in % lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$\frac{A_V - (A_N \cdot 0,4)}{A_V} \cdot 100 = \text{Kopplungseffizienz (\%)}$$

3.10.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung

Die folgenden Arbeiten werden alle bei 4°C durchgeführt. Die Säule, an die das Peptid gekoppelt wurde, wird durch Waschen mit 20 ml PBS⁻ äquilibriert und die Basislinie anhand der Absorption bei 280 nm eingestellt. Es werden 3 ml Serum mit 3 ml PBS⁻ verdünnt, diese zirkulieren für 2,5 h mit einer Flussrate von 0,5 ml/min über die Säule. Die Säule wird mit PBS⁻ (0,5 M NaCl total) gewaschen, bis die Basislinie erreicht ist. Zur Elution (0,5 ml/min) werden 10 ml Elutionspuffer eingesetzt, das Eluat wird in einzelne Fraktionen à 2 ml unterteilt. Die Säule wird nun mit PBS⁻ gewaschen und zur Lagerung wie unter 3.10.1 beschrieben behandelt. Die

Fractionen werden gegen PBS⁻ für 2 h und anschließend noch einmal ÜN in Dialyseschläuchen dialysiert. Durch Zentrifugation (5500 Upm, 10 min) in Säulen mit Ultrazentrifugationseinsätzen erfolgt eine Konzentrierung der Antikörperfraktionen. Die Antikörperfraktionen in PBS⁻ werden mit 1 % (w/v) BSA versetzt und können bei 4°C gelagert werden.

3.11 Proteinpräparation

3.11.1 Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen einer 10 cm-Kulturschale mit einer Konfluenz von ca. 90 % werden mit einem Gummischaber nach zweimaligem Waschen mit PBS⁻ bei RT und Zugabe von 200 µl 1 x CompleteTM-Lösung abgeschabt. Das so entstandene zähflüssige Lysat wird im Ultraschallbad bei 4°C sonifiziert, es ist bei -70°C lagerbar.

3.11.2 Herstellung von Gewebelysaten

Die Gewebe werden den durch zervikale Dislokation getöteten Mäusen entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss werden die gefrorenen Gewebeproben mit Hilfe vorgekühlter Schraubzylinder und Metallstäbe mit einem Hammer zerkleinert. Das entstandene Pulver wird in 1 x CompleteTM-Lösung aufgenommen. Zur vollständigen Homogenisierung der Proben und Zerkleinerung der genomischen DNS erfolgt eine Behandlung mit Ultraschall bei 4°C. Das Lysat ist bei -70°C lagerbar.

3.11.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate wird der Reagenziensatz „Bichinonic Acid Kit for Protein Determination“ der Firma Sigma verwendet. Es werden 2 bzw. 5 µl Lysat eingesetzt (Doppelbestimmung). Das Prinzip dieses Nachweises beruht auf der Fähigkeit von Proteinen, Kupfersulfat zu reduzieren. Das BCA (Bichinonic Acid) komplexiert das reduzierte Kupfer, die Absorption dieses Komplexes ist bei 562 nm fotometrisch nachweisbar, hierbei ist die Absorption

proportional zur Proteinkonzentration. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben.

3.12 Immunoblotanalysen

3.12.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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

Die Proteinauftrennung erfolgt mit einem Sammel- und einem Trenngel, die sich in ihrem pH-Wert und ihrer Porengröße unterscheiden. Hierdurch wird die Fokussierung der Proteine in scharfe Banden erreicht. Die SDS-Proteinkomplexe ordnen sich im großporigen Sammelgel (pH 6,8) zwischen den vorauslaufenden Chloridionen (Leitionen) und den Glyzin-Molekülen (Folgeionen) an, die bei diesem pH-Wert überwiegend als Zwitterionen mit einer Nettoladung von Null vorliegen. Im kleinporigen Trenngel (pH 8,8) erhält das Glyzin eine negative Gesamtladung und überholt die SDS-Proteinkomplexe, wodurch der Sammeleffekt aufgehoben wird. Nun trennen sich die SDS-Proteinkomplexe nach ihrer molekularen Masse. Sie können anschließend mit verschiedenen Färbemethoden sichtbar gemacht werden.

Zunächst wird das Trenngel bis ca. 1 cm unterhalb der Auftrageschalen gegossen und mit 0,1 % SDS-Lösung überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wird das Sammelgel gegossen und der Auftrageschale eingesetzt. Das auspolymerisierte Gel wird in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Pufferkammer mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt. Die mit 4x Laemmli-Probenpuffer versetzten Proben (je 100 μ g Protein) werden auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 4°C, zum Sammeln der Proben wird eine Stromstärke von

20 mA angelegt. Sobald die Bromphenolblaubande das Trenngel erreicht hat, wird die Stromstärke auf 25 mA erhöht.

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

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele

3.12.2 Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran

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

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

3.12.3 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

3.12.3.1 Ponceau-Färbung

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

3.12.3.2 Immunoblot-Analyse mittels Chemilumineszenz (ECL)

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

Nachdem die Proteine auf eine Hybond-ECL-Nitrozellulose-Membran transferiert wurden, wird die Nitrozellulose-Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungen der Antikörper in Blockpuffer für 1 h bei RT auf einer Wippe inkubiert. Es schließt sich die Inkubation der Nitrozellulose-Membran mit dem Primärantikörper verdünnt in Blockpuffer an (1 h RT oder ÜN 4°C). Durch Waschen mit Waschpuffer (2x 5 min, 2x 10 min, RT) werden die unspezifisch gebundenen Antikörper entfernt. Die Membran wird mit dem in Blockpuffer verdünnten Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert und anschließend die unspezifisch gebundenen Antikörper abgewaschen (2x 5 min, 2 x 10 min, RT). Die Chemilumineszenz-Lösungen (Pierce) werden im Verhältnis eins zu eins gemischt und damit die Membran für 5 min bei RT inkubiert. Die Membran wird in eine Filmkassette eingelegt und ein RX-Film aufgelegt. Nach verschiedenen Expositionszeiten (10 sec - 20 min) werden die Filme entwickelt.

3.12.4 Entfernung gebundener Antikörper von Nitrocellulose-Membranen

Um Nitrozellulose-Membranen nach der Immunoblot-Analyse wiederverwenden zu können, müssen die gebundenen Antikörper entfernt werden. Hierfür wird das Restore[™] Western Blot Stripping Kit der Firma Pierce nach Herstellerangaben eingesetzt.

3.12.5 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Brilliant-Blue[™]

Das Polyacrylamidgel wird in CoomassieBrilliantBlue[™]-Färbelösung für mindestens 1h bei RT auf einer Wippe und anschließend in Coomassie-Entfärber bei RT inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar sind. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 50 ng Protein pro Bande, daher ist diese Färbemethode auch für Gele nach

dem Transfer der Proteine auf eine geeignete Membran geeignet. Unter Vakuum kann das Gel auf einem 3MM-Papier im Geltrockner (80 min, 80°C) getrocknet werden.

3.13 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient zur Fällung eines bestimmten Proteins unter nicht-denaturierenden Bedingungen aus einem Proteingemisch mit Hilfe von Antikörpern. Dadurch wird eine Anreicherung dieses Proteins erreicht, das anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Immunoblot-Analyse nachgewiesen werden konnte.

Der Überstand frischer HeLa-Zelllysate in RIPA-Puffer wird mit 40 µl Sepharose 4B-Gel versetzt und 2 h bei 4°C rotierend vorinkubiert. Durch anschließende Zentrifugation werden hierbei unspezifisch an Sepharose bindende Proteine sedimentiert. Der Überstand wird zu einem Gemisch aus 10 µl Sepharose-ProteinA-Gel und 2 µl Antikörper gegeben, das bereits 30 min auf Eis stehend vorinkubiert war. Die Inkubation erfolgt drehend bei 4°C ÜN. Komplexe aus Antigen, Antikörper und ProteinA-Sepharose werden sedimentiert. Das Sediment wird dreimal mit 500 µl RIPA-Waschpuffer und einmal mit A.bidest gewaschen. Das Sediment wird mit 15 µl 1x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 65°C, was zu einer Trennung der Verbindungen zwischen Antigen, Antikörper und Protein A-Sepharose führt, wird die Protein A-Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand in der SDS-PAGE eingesetzt.

3.14 Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen

3.14.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Die gefrorenen Präparate werden mit Einbettmedium auf dem Objektisch des Gefriermikrotoms fixiert. Die Gewebeschnitte (12 µm) werden bei -20°C Kammer-temperatur, einem Schnittwinkel von 10° und einer Objekttemperatur von -19°C hergestellt und auf Objektträger aufgenommen. Diese werden für 30 min bei RT luftgetrocknet, sie sind bei -70°C lagerbar.

3.14.2 Immunfluoreszenz-Analysen an Gefrierschnitten

Die Gewebeschnitte werden für 10 min mit eiskaltem Ethanol (96 %) fixiert, darauf folgend dreimal in PBS⁻ (5 min, RT) gewaschen, für 1 h bei RT mit Blockierungslösung inkubiert und danach für 2 h bei RT oder ÜN bei 4°C mit den in Blockierungslösung verdünnten Primärantikörpern inkubiert. Es folgen drei Waschschriffe mit PBS⁻ (5 min, RT), die Gewebeschnitte werden daraufhin für 1 h bei RT mit in Blockierungslösung verdünnten Sekundärantikörpern inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min, RT) mit PBS⁻ kann eine Propidiumiodid-Kernfärbung durchgeführt werden. Hierfür werden die Gefrierschnitte für 30 min mit RNase 2000 (1:100 in PBS⁻) bei RT inkubiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS⁻ (je 5 min, RT) für 15 min mit Propidiumiodid in PBS⁻ (1:25000) inkubiert. Nach drei Waschschriffen (je 5 min, RT) mit PBS⁻ werden die Gewebeschnitte mit Permafluor Mounting Medium versehen und mit einem Deckglas verschlossen.

3.15 Histologische Färbetechniken

3.15.1 Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten

Zur histologischen Analyse werden häufig Paraffinschnitte angefertigt, da in ihnen die Gewebestruktur besonders gut erhalten bleibt und viele klassische Färbetechniken für diese Technik etabliert sind. Zur Paraffineinbettung werden die Gewebe nach einer Ganzkörperperfusion der Maus präpariert und in Leitungswasser bei RT gelagert. Vor Beginn des automatisierten Einbettungsprozesses (Paraffin-Gewebeinfiltrationsautomat TP1020, Leica) werden die Organe in einen Metallkorb gelegt, der während der Einbettungsprozedur in verschiedene Flüssigkeitsbehälter getaucht wird. Jeder Einzelschritt dauert etwa 1-2 h und beginnend mit einmaligen Dehydrierungsschriffen bei 60%, 70% und 80% Ethanol werden die Präparate jeweils zweimal in 96% und 100% Ethanol, Xylol und Paraffin getaucht. Nach Beendigung der Einbettung werden die Präparate in Metallbechern in einer Paraffinausgießstation in der gewünschten Schnittrichtung positioniert und mit flüssigem Paraffin eingeschlossen, so dass nach Aushärtung ein Paraffinblock vorliegt. Zum Schneiden wird ein Rotationsmikrotom (HM 360, Leica) verwendet, mit dem 5 µm dünne

Schnitte des Paraffinblocks hergestellt werden, die über einen Flüssigkeitsfilm in ein 42°C Wasserbad gleiten, sich strecken und mit einem Pinsel auf unbehandelte Glasobjektträger gezogen werden können. Da die Schnittpräparate noch in Paraffin eingeschlossen sind, müssen sie für alle Folgeuntersuchungen entparaffiniert werden. Dies wird durch jeweils 5-10 min Inkubation in zwei Xylol- und 96% Ethanolbädern, und anschließender einmaliger Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe erreicht.

3.15.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Diese Färbemethode führt zum Nachweis der Zellkerne (Hämatoxylin) und des Zytoplasmas (Eosin). Rehydratisierte Paraffinschnitte oder Kryoschnitte werden 1min in Hämatoxylin-Lösung inkubiert und anschließend unter warmen Leitungswasser differenziert. In einem 2-5 min Inkubationsschritt werden die Objektträger in 0,1%iger Eosin-Lösung gefärbt und überschüssige Farbe mit Leitungswasser abgewaschen. Die Präparate können erneut dehydriert oder luftgetrocknet werden, bevor sie mit Entellan unter einem Deckgläschen versiegelt werden.

3.15.3 Trichrom-Färbung nach Gomori

Die rehydrierten Paraffinschnitte werden 10 min in Bouinscher Lösung fixiert, die gelbliche Fixierungslösung ausgewaschen (5 min) und die Präparate 2 min in Hämatoxylin-Lösung gefärbt. Anschließend werden die Schnitte in der Trichrom-Färbelösung 15-20 min inkubiert und 2 min in 0,5% Essigsäure gespült. Zum Schluss werden die Präparate kurz in Isopropanol gewaschen, bevor sie mit Entellan unter einem Deckgläschen versiegelt werden.

3.15.4 Acetylcholinesterase-Färbung

Acetylcholin-Esterase als charakteristisches Enzym der Erythrozyten, Nervenzellen, Synapsen und der motorischen Endplatten der quergestreiften Muskulatur wird in Herz-Kryoschnitten (20 µm) zur Darstellung des reizleitenden Systems eingesetzt. Die Schnitte werden in 4% PFA fixiert. Nach zwei Waschschritten in PBS- werden die Schnitte für 2 h bei 37°C in Acetylcholin-Esterase-Färbelösung inkubiert,

anschließend zweimal in PBS- gewaschen, mit Eosin gegengefärbt, getrocknet und eingedeckelt (Entellan).

3.16 Funktionelle Analysen an transgenen Mäusen

3.16.1 Verletzung des Tibialis anterior Muskels durch Injektion von BaCl₂

Die Injektion von 60 µl BaCl₂-Lösung (1,2% in physiologischer NaCl-Lösung) in den Tibialis anterior Muskel adulter Mäuse führt zu einer lokalen Zerstörung des Muskels. Die Mäuse werden zur Injektion betäubt und ein Hautschnitt oberhalb des Kniegelenks gemacht, über den die Injektionskanüle in den Muskel eingeführt wird. Nach erfolgter Injektion wird die Hautwunde mit einer Naht verschlossen.

4 Ergebnisse

4.1 Connexin-Expression während der Skelettmuskelentwicklung und Muskelregeneration

In dem vorliegenden Kapitel werden die experimentellen Untersuchungen zur Expression verschiedener Connexine während der Entwicklung und des Regenerationsprozesses der Skelettmuskulatur beschrieben. Das Ziel der Experimente war die Charakterisierung der an der Skelettmuskelentwicklung und -regeneration beteiligten Connexine sowie die Bestimmung der zeitlichen Abfolge ihrer Expression.

4.1.1 Expression und funktionelle Eigenschaften des murinen Cx39

Die Expression des murinen Connexin39 (Cx39) konnte während der Embryogenese auf Transkript- und Proteinebene nachgewiesen werden (von Maltzahn, Diplomarbeit 2003). Allerdings konnte nicht bestimmt werden, in welchem Zelltyp Cx39 exprimiert wird.

4.1.1.1 Charakterisierung der Antikörper gegen Cx39

Die durch Immunisierung der Kaninchen entstandenen Seren gegen den C-Terminus und die zytoplasmatische Schleife des Cx39 Proteins wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt. Es war allerdings nicht bekannt, gegen welche Epitope des Cx39 Proteins die Antikörper gerichtet sind, da zur Immunisierung Peptide verwendet wurden, die aus dem C-Terminus (TSGSAPHLRTKKSEWV) und aus der zytoplasmatischen Schleife (AVGGACRPQVPDL) abgeleitet wurden. Die Seren wurden mit NHS-Säulen affinitätschromatisch aufgereinigt, die entweder mit dem Peptid aus dem C-Terminus oder dem Peptid aus der zytoplasmatischen Schleife beladen worden waren. Bei den durchgeführten Analysen zeigte sich, dass die erzeugten Antikörper gegen den C-Terminus des Cx39 Proteins gerichtet sind (Abb.4.1). Nur mit den Seren, die über eine mit dem C-terminalen Peptid beladene Säule aufgereinigt wurden, konnten die erwarteten Immunfluoreszenz- und

Immunoblotsignale nachgewiesen werden (Abb.4.1). Wenn die Seren über eine Säule aufgereinigt wurden, die mit einem gegen die zytoplasmatische Schleife gerichteten Peptid beladen waren, konnten weder Immunfluoreszenz- noch Immunoblotsignale gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

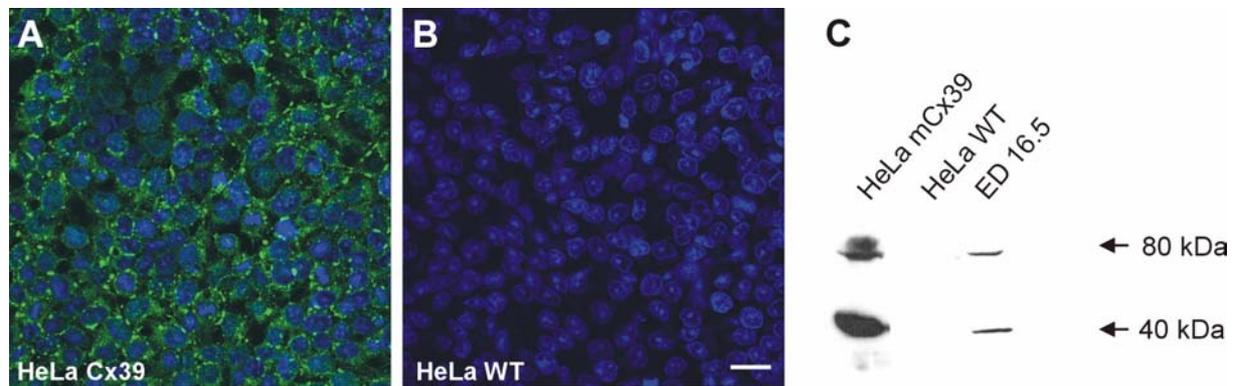


Abb.4.1: Untersuchungen zur Charakterisierung der gegen Cx39 gerichteten Antikörper. A) Immunfluoreszenz-Analyse stabil transfizierter HeLa Cx39 Zellen mit Antikörpern, die gegen den C-Terminus des Cx39 gerichtet sind, zeigen die Expression des Cx39 Proteins in Kontaktmembranen. B) Immunfluoreszenz-Analyse untransfizierter HeLa Zellen mit Antikörpern gegen den C-Terminus des Cx39. C) Immunoblotanalyse mit Antikörpern gegen den C-Terminus des Cx39 weisen das Cx39 Protein in stabil transfizierten HeLa Zellen sowie in Embryonen an Tag 16.5 der Embryonalentwicklung (ED16.5) nach. Maßstabsbalken: 20 μ m.

4.1.1.2 Expression des Cx39 Transkripts und Proteins während der Embryonalentwicklung der Maus

Zu Beginn der vorliegenden Dissertation war bekannt, dass Cx39 während der Embryonalentwicklung der Maus an Tag 13.5 und 16.5 wie auch in der neonatalen Maus exprimiert wird (von Maltzahn, Diplomarbeit 2003). Die genaue Bestimmung des Beginns der Expression wie auch des Zelltyps sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Die Expression des Cx39 Transkripts konnte mit Hilfe von RT-PCR Analysen in verschiedenen Geweben wie Brustkorb, Auge, Herz und Gehirn embryonaler und neonataler Mäuse nachgewiesen werden (Abb.4.2). Zusätzlich wurden verschiedene Skelettmuskeln neonataler Mäuse präpariert und RT-PCR Analysen mit für Cx39 spezifischen Intron-überspannenden Primern durchgeführt. Das Transkript konnte im Zwerchfell, im Interkostalmuskel wie auch in der Hinterbeinmuskulatur nachgewiesen werden (Abb.4.2B). Zur Bestimmung des Beginns der Expression des Cx39 Transkripts wurde RNS aus ganzen Embryonen eingesetzt und RT-PCR Analysen durchgeführt; die Expression konnte ab Tag 11.5 der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden (Abb.4.2C).

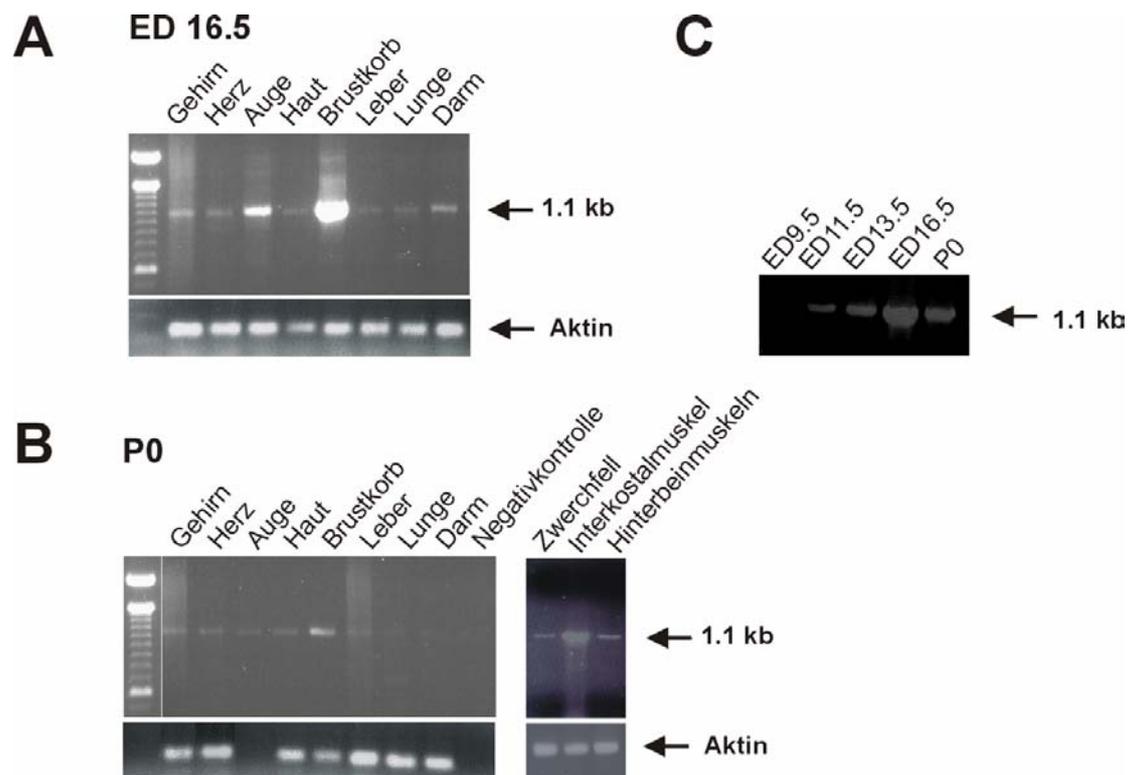


Abb.4.2: Untersuchungen zur Expression des Cx39 Transkripts während der Embryogenese. A) RT-PCR Analyse verschiedener Organe des Embryos an Tag 16.5 der Embryonalentwicklung. Durch Amplifikation des Transkripts für Cx39 entsteht ein Fragment von 1,1 kb, welches der gesamten kodierenden, gespleißten Region entspricht. B) RT-PCR Analyse verschiedener Organe neonataler Mäuse. C) Bestimmung des Beginns der Expression des Cx39 Transkripts an Gesamtembryonen mittels RT-PCR Analyse. Zur Überprüfung der Qualität der synthetisierten cDNS wurde eine PCR mit Primern für β -Aktin durchgeführt.

Zur Untersuchung der Expression des Cx39 Proteins wurden Lysate aus verschiedenen Geweben embryonaler und neonataler Mäuse hergestellt und eine Immunoblotanalyse mit Antikörpern gegen Cx39 durchgeführt (Abb.4.3). Das Cx39 Protein wurde in verschiedenen embryonalen Geweben wie dem Zwerchfell und verschiedenen neonatalen Geweben wie Zwerchfell, Interkostalmuskel und der Hinterbeinmuskulatur nachgewiesen. Die Immunoblotssignale im Gehirn und Herz sind auf den Okzipitalmuskel bzw. das Perikard zurückzuführen.

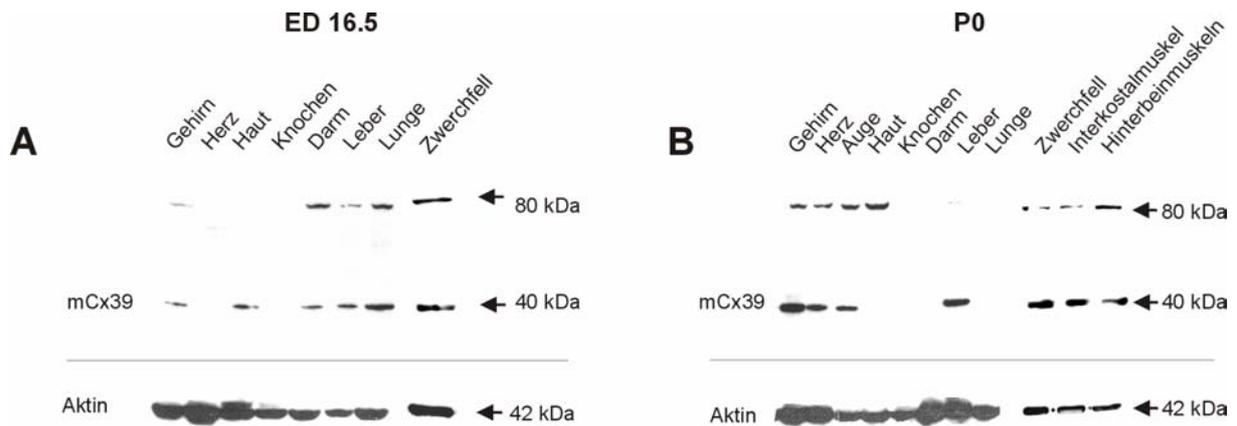


Abb.4.3: Expression des Cx39 Proteins in verschiedenen Geweben aus Embryonen und neonatalen Mäusen

A) Immunoblotanalyse an Tag 16.5 der Embryonalentwicklung und an neonatalen Mäusen (B) mit gegen Cx39 gerichteten Antikörpern. Die Expression des Cx39 Proteins wurde in verschiedenen Geweben nachgewiesen. Die Inkubation mit gegen Aktin gerichteten Antikörpern diente dem Vergleich der eingesetzten Proteinmengen.

Zur Lokalisation des Cx39 Proteins im Skelettmuskel an Tag 16.5 der Embryonalentwicklung wurden Immunfluoreszenz-Analysen an Gefrierschnitten durchgeführt. Das Cx39 Protein wurde an Kontaktmembranen primärer und sekundärer Myotuben in verschiedenen sich entwickelnden Skelettmuskeln nachgewiesen (Abb.4.4).

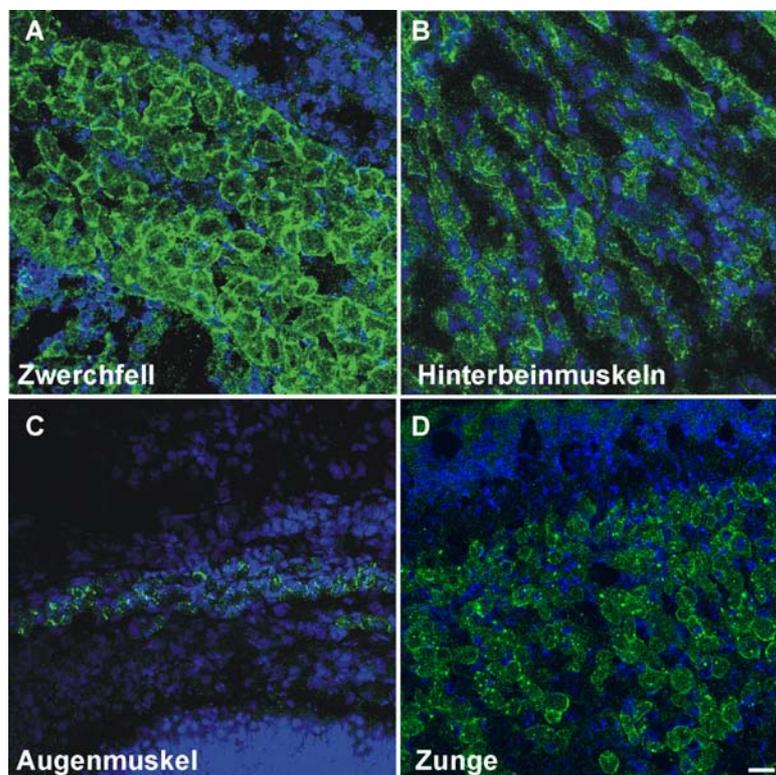


Abb.4.4: Expression des Cx39 Proteins in verschiedenen Skelettmuskeln an Tag 16.5 der Embryonalentwicklung

Immunfluoreszenzanalyse verschiedener Skelettmuskeln an Tag 16.5 der Embryonalentwicklung mit gegen Cx39 gerichteten Antikörpern (grün). Die Zellkerne wurden mit Propidiumiodid angefärbt (blau). Maßstabsbalken: 20 μ m.

Zur Untersuchung der Expression des Cx39 Proteins während der Entwicklung des Interkostalmuskels wurden Immunfluoreszenzanalysen mit Cx39 spezifischen Antikörpern an Interkostalmuskeln aus Mausembryonen verschiedenen Alters durchgeführt (Abb.4.5). Das Cx39 Protein konnte an ED14.5 wie auch an ED16.5 und an neonatalen Mäusen in Kontaktmembranen primärer und sekundärer Myotuben des Interkostalmuskels nachgewiesen werden, wobei an Tag 16.5 der Embryogenese die stärkste Expression gefunden wurde (Abb.4.5B).

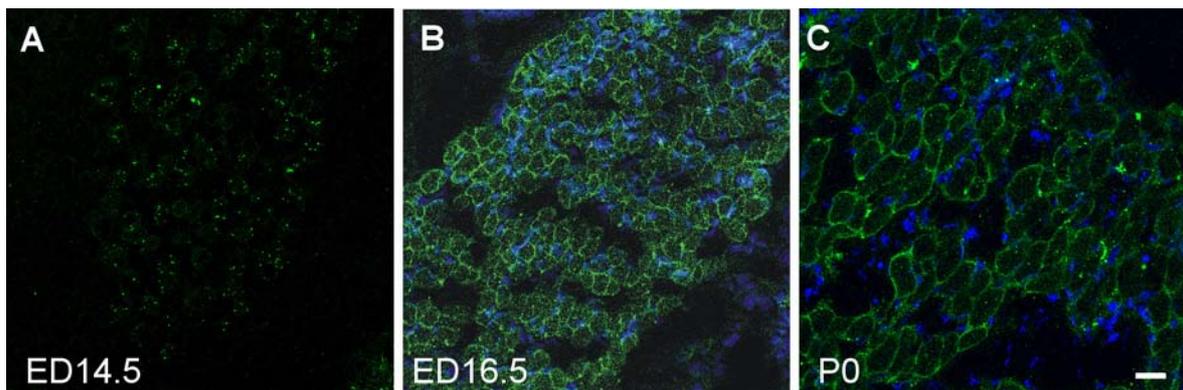


Abb.4.5: Expression des Cx39 Proteins während der Entstehung des Interkostalmuskels
Immunfluoreszenz-Analyse des Interkostalmuskels zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung mit Cx39 spezifischen Antikörpern (grün). Die Zellkerne in B und C wurden mit Propidiumiodid angefärbt (blau). Maßstabsbalken: 20 μ m.

Während der Skelettmuskelentwicklung wird das Cx43 Protein in Myoblasten exprimiert (Constantin und Cronier, 2000). Durch Doppelimmunfluoreszenz-Analysen sollte untersucht werden, ob Cx43 und Cx39 in der gleichen Zelle oder im selben Gap Junction Plaque während der Entwicklung des Interkostalmuskels exprimiert werden. Es wurde gezeigt, dass Cx39 und Cx43 während der Embryonalentwicklung der Maus weder in der gleichen Zelle noch im gleichen Gap Junction Plaque exprimiert werden (Abb.4.6). Des Weiteren wurde die Expression des Cx43 Proteins mit der Expression des Cx39 Proteins verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass die Expression des Cx43 Proteins mit fortschreitender Entwicklung des Interkostalmuskels abnimmt, die Expression des Cx39 Proteins bis ED16.5 hingegen zunimmt (Abb.4.6).

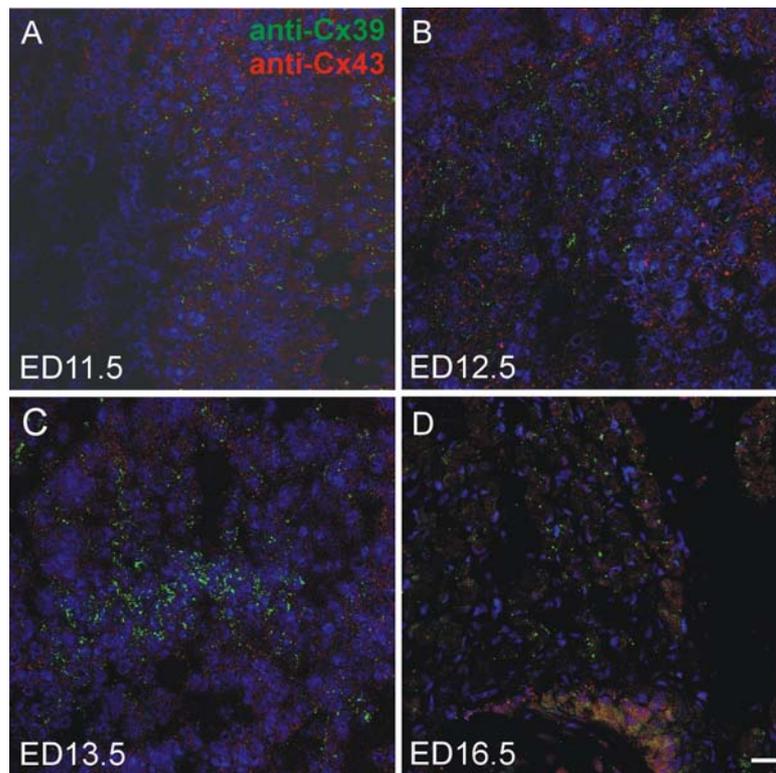


Abb.4.6: Analyse zur Expression des Cx43 und Cx39 im Interkostalmuskel während der Embryogenese

Immunfluoreszenz-Analyse des Interkostalmuskels mit gegen Cx43 (rot) und Cx39 (grün) gerichteten Antikörpern. Die Zellkerne wurden mit Propidiumiodid angefärbt (blau). Es konnte keine Kolokalisation des Cx43 Proteins mit Cx39 während der Entwicklung des Interkostalmuskels nachgewiesen werden. Maßstabsbalken: 20 μ m.

4.1.1.3 Untersuchung der Cx39 Kanäle im neonatalen Zwerchfell der Maus

Zur Untersuchung der funktionellen Eigenschaften der von Cx39 gebildeten Gap Junction Kanäle im endogenen Milieu wurden Mikroinjektionsexperimente in Myotuben des neonatalen Zwerchfells der Maus durchgeführt. Zuvor wurde jedoch die Expression aller bekannten Connexine im neonatalen Zwerchfell untersucht, um die Ausbildung von Gap Junctions durch diese Connexine auszuschließen.

Die Expression aller bekannten Connexine auf Transkriptebene wurde mit cDNA aus dem neonatalen Zwerchfell durchgeführt. Es wurden Transkripte für Cx26, Cx32, Cx37, Cx39, Cx43 und Cx45 nachgewiesen (Abb.4.7).

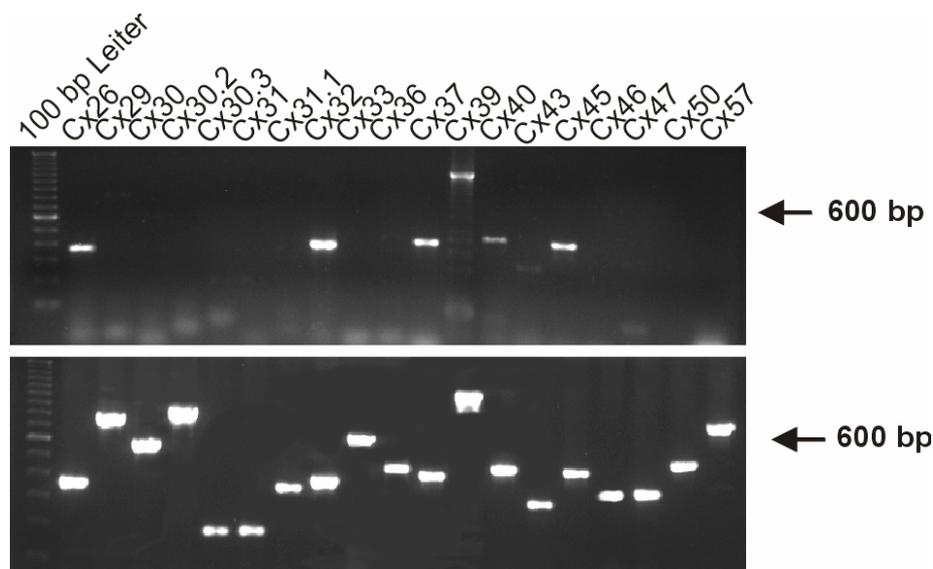


Abb.4.7: Expressionsanalyse aller bekannten Connexine im neonatalen Zwerchfell

Im oberen Teil der Abbildung ist die Analyse mit cDNS aus dem neonatalen Zwerchfell gezeigt, im unteren Teil der Abbildung die Kontrolle mittels genomischer DNS bzw. mittels Vektor-DNS, welche die kodierenden Regionen der Connexine enthält. Im neonatalen Zwerchfell konnten Transkripte für Cx26, Cx32, Cx37, Cx39, Cx40, Cx43 sowie Cx45 nachgewiesen werden.

Zur weiteren Untersuchung der Expression der auf Transkriptebene detektierten Connexine wurden Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Hiermit sollte zum einen überprüft werden, ob diese Connexine auch auf Proteinebene nachgewiesen werden können, zum anderen sollte ihre Lokalisierung gezeigt werden.

Das Cx26 Protein wie auch das Cx32 Protein wurde mittels Immunfluoreszenz-Analyse nur in der Leber, nicht aber im Zwerchfell nachgewiesen (Abb.4.8A,B). Das Cx37 Protein wie auch das Cx43 Protein (Abb.4.8C, E) wurden ausschließlich in der Lunge, nicht aber in der Zwerchfellmuskulatur gefunden. Das Cx40 Protein und das lacZ Reportergen in Cx45^{lacZ/+} Tieren werden in Blutgefäßen des Zwerchfells exprimiert (Abb.4.8D, F).

Zwischen den Myotuben des neonatalen Zwerchfells konnte außer Cx39 (Abb.4.9A) kein weiteres Connexin nachgewiesen werden.

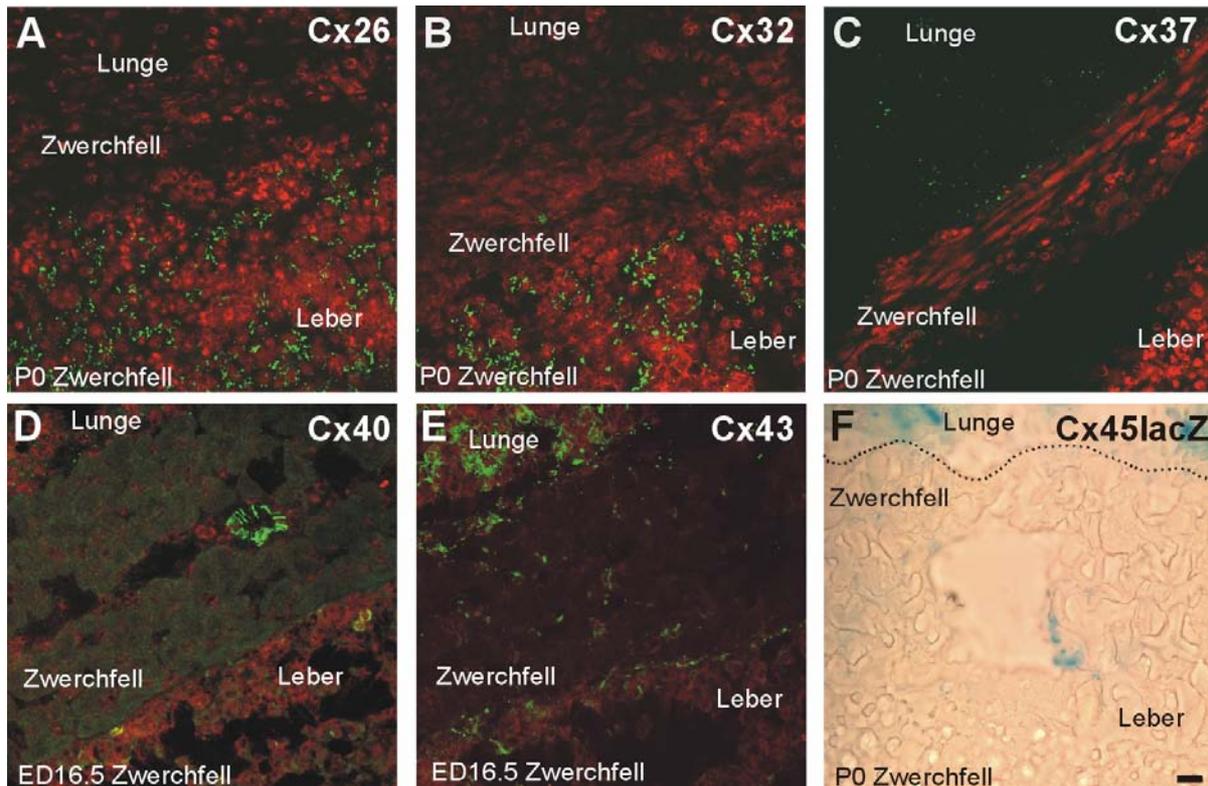


Abb.4.8: Analyse der Expression verschiedener Connexine im neonatalen Zwerchfell der Maus. Die Immunfluoreszenz-Analysen der entsprechenden Connexine wurde in grün dargestellt (A-E), die Kerne wurden mit Propidiumiodid angefärbt (rot). F) Die Expression des lacZ-Reportergens in $Cx45^{lacZ/+}$ Mäusen zeigt eine Expression in den Blutgefäßen. Bei den Analysen in A-E wurden Wildtyp-Tiere verwendet, für die lacZ Färbung in F wurden $Cx45^{lacZ/+}$ Tiere eingesetzt. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Die zwischen den Myotuben des neonatalen Zwerchfells gebildeten Gap Junction Kanäle wurden durch Injektion der Farbstoffe Alexa488 und Rhodamin-Dextran untersucht (Abb.4.9B, C). Es konnte eine Farbstoffkopplung der ersten bis zweiten Ordnung mit Alexa488 nachgewiesen werden. Durch die Injektion des Rhodamin-Dextran, bei der keine Farbstoffkopplung nachgewiesen werden konnte, wurden Zytoplasmabrücken ausgeschlossen, da Gap Junction Kanäle hierfür nicht permeabel sind.

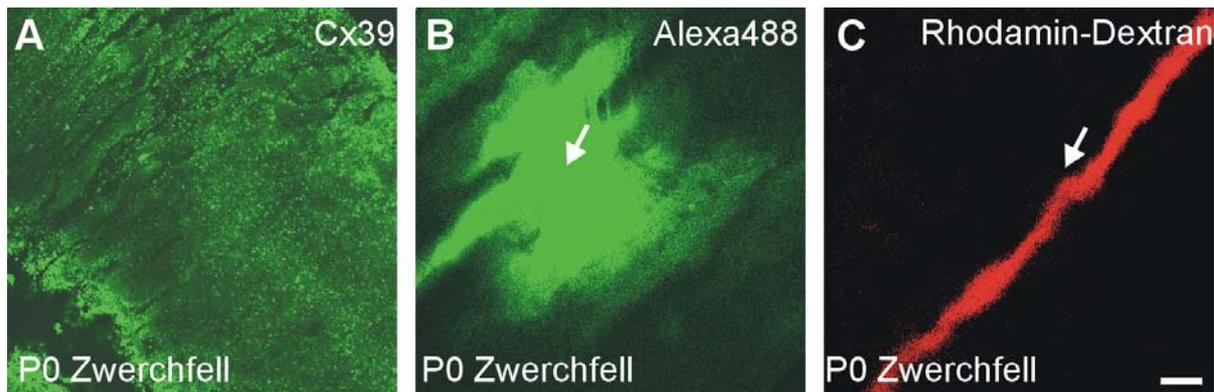


Abb.4.9: Untersuchung der Farbstoffkopplung zwischen Myotuben des neonatalen Zwerchfells. A) Das Cx39 Protein (grün) wird zwischen den Myotuben des neonatalen Zwerchfells exprimiert. B) Die durch einen Pfeil gekennzeichnete Myotube wurde mit dem Farbstoff Alexa488 bzw. Rhodamin-Dextran (C) beladen. Dargestellt ist die nach 20 min auftretende Farbstoffkopplung. Maßstabsbalken: 20 μ m.

4.1.1.4 Phosphorylierung des Cx39 Proteins in HeLa Zellen

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, dass zwischen Zellen stabil transfizierter Cx39 HeLa Zellen kein Farbstofftransfer möglich ist (von Maltzahn, Diplomarbeit 2003). Da Cx39 viele verschiedene putative Phosphorylierungsstellen besitzt (von Maltzahn, Diplomarbeit 2003), sollte die Phosphorylierung des Cx39 Proteins in diesen Zellen und eine eventuelle Beeinflussung der Kopplungseigenschaften durch Veränderung des Phosphorylierungszustands des Cx39 Proteins untersucht werden.

Das Cx39 Protein (Abb.4.10A) liegt in stabil transfizierten HeLa Zellen in stark phosphoryliertem Zustand vor (Abb.4.10B). Weder durch die Zugabe von cAMP zur Stimulation der cAMP-abhängigen Kinase noch durch Zugabe von TPA (12-O-tetradecanoyl-1-phorbol-13-acetate) zur Stimulation der Proteinkinase C konnte eine veränderte Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abb.4.10B). Eine metabolische Markierung der Zellen mit 35 S-markiertem Methionin diente dem Abgleich der eingesetzten Proteinmengen.

Da stabil transfizierte HeLa Cx39 Zellen keine Farbstoffkopplung zeigen, wurden die Zellen mit Staurosporin bzw. Heparin inkubiert und die Farbstoffkopplung bestimmt. Sowohl Heparin wie auch Staurosporin führen zu einer Dephosphorylierung der Proteine in der Zelle. Weder die Inkubation mit Staurosporin noch die Inkubation mit Heparin führten zu einer Veränderung der Kopplungseigenschaften für Neurobiotin und Ethidiumbromid (Daten nicht gezeigt).

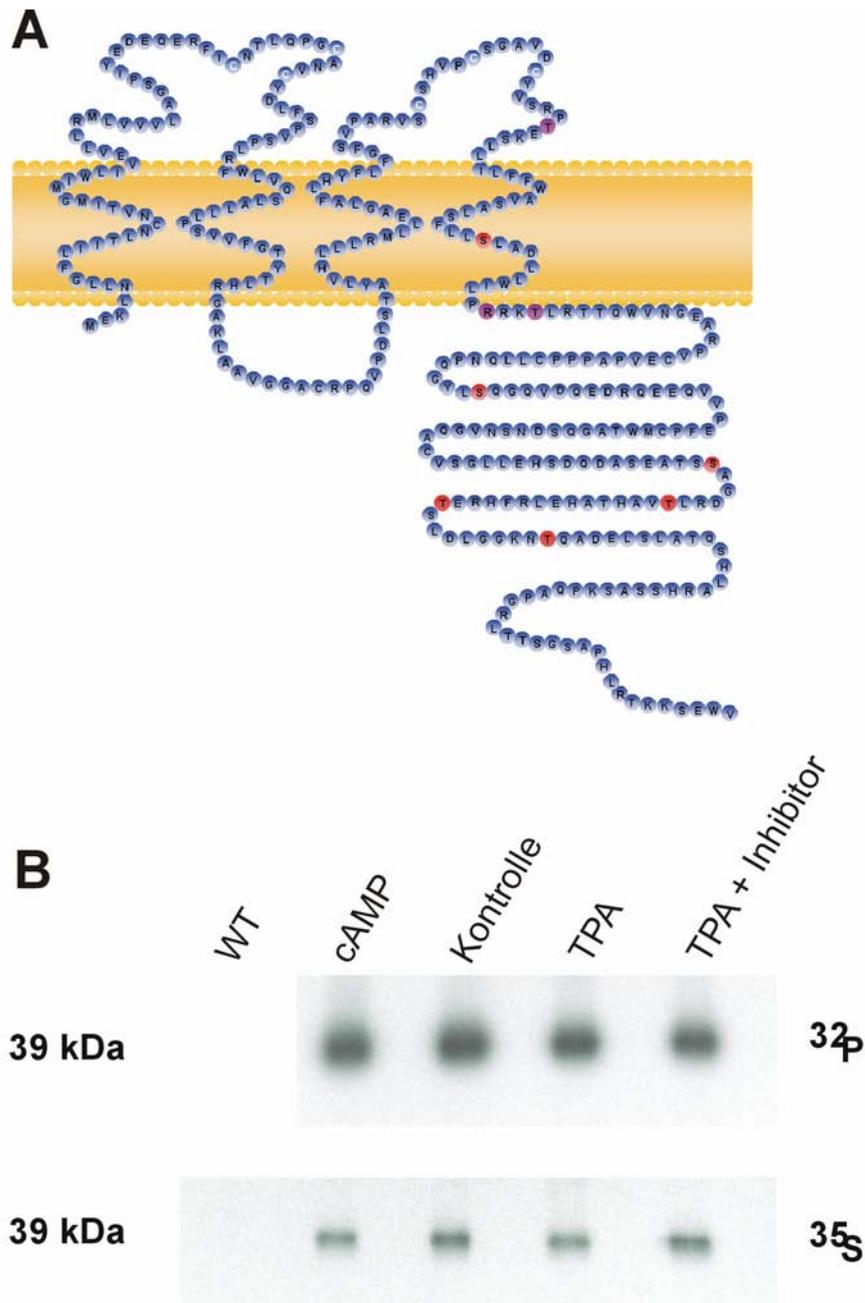


Abb.4.10: Phosphorylierung des Cx39 Proteins in stabil transfizierten HeLa Zellen
 A) Schematische Darstellung des Cx39 Proteins in der Plasmamembran. Die einzelnen Aminosäuren sind durch Kreise gekennzeichnet. Putative Phosphorylierungsstellen für die Casein-Kinasell (CKII-Kinase) sind in rot, putative Phosphorylierungsstellen für die Protein-Kinase C (PKC) sind in violett dargestellt. An Position 203 befindet sich zusätzlich eine putative Phosphorylierungsstelle für die cAMP-abhängige Kinase. B) Phosphorylierung des Cx39 Proteins in HeLa Zellen. Die Zellen wurden entweder mit ³⁵S-Methionin oder durch Zugabe von ³²P-ATP radioaktiv markiert und entweder mit cAMP oder TPA zur Stimulation der Phosphorylierung inkubiert.

4.1.2 C₂C₁₂ Zellen als Modellsystem der Skelettmuskelentwicklung

Die Expression verschiedener Connexin- und Pannexingene während des Differenzierungsprozesses der C₂C₁₂ Zellen, einer etablierten Myoblasten Zelllinie, sollte analysiert und die zeitliche Reihenfolge der Expression bestimmt werden. Des Weiteren sollten die Auswirkungen der Herunterregulation der Expression des Cx43 durch spezifische siRNS auf den Differenzierungsprozess untersucht werden. C₂C₁₂ Zellen eignen sich als Modellsystem für die Skelettmuskelentwicklung, da es sich um eine etablierte Myoblasten-Zelllinie handelt, die zu Myotuben differenziert werden kann.

4.1.2.1 Expression des Cx43 und Cx39 Proteins während des Differenzierungsprozesses

C₂C₁₂ Zellen wurden durch Serum-Depletion differenziert und die Expression verschiedener Connexine sowie des Differenzierungsmarkers Myogenin untersucht, wobei das Cx43 Protein in undifferenzierten C₂C₁₂ Zellen nachgewiesen wurde (Abb.4.11A). Mit dem Grad der Differenzierung nimmt die Expression des Cx43 Proteins ab, die Zellen exprimieren Cx39 und den Differenzierungsmarker Myogenin (Abb.4.11A).

Auf Transkriptebene wurde in undifferenzierten wie auch in differenzierten C₂C₁₂ Zellen keine Cx40 mRNA gefunden (Abb.4.11B). Außerdem wurden nur geringe Mengen an Cx45 mRNA und Panx1 mRNA nachgewiesen (Abb.4.11B).

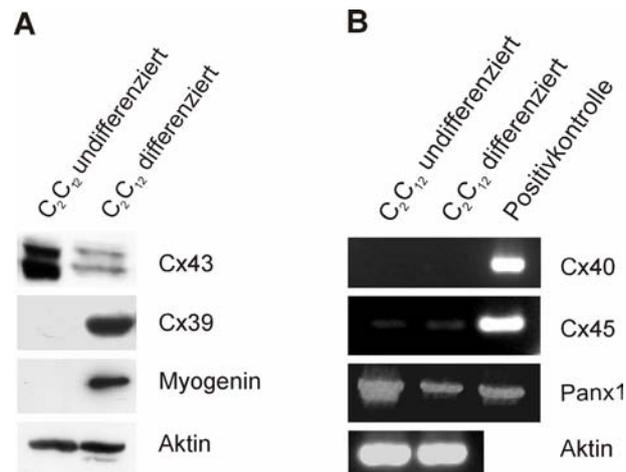


Abb.4.11: Untersuchung der Expression verschiedener Connexine während der Differenzierung von C₂C₁₂ Zellen

A) Immunoblotanalyse: Cx43 ist in undifferenzierten C₂C₁₂ Zellen stark exprimiert, die Expression nimmt während des Differenzierungsprozesses ab. Cx39 wird ausschließlich in differenzierten C₂C₁₂ Zellen exprimiert. Myogenin wurde als Marker für den Differenzierungsprozess eingesetzt. Die Inkubation mit gegen Aktin gerichteten Antikörpern diente dem Vergleich der eingesetzten Proteinmengen. B) In undifferenzierten und differenzierten C₂C₁₂ Zellen konnte kein Cx40 Transkript und nur geringe Mengen an Cx45 mRNA nachgewiesen werden. Panx1 mRNA wurde sowohl in undifferenzierten wie auch in differenzierten C₂C₁₂ Zellen gefunden. Als Positivkontrolle wurde entweder genomische DNS oder Vektor-DNS eingesetzt, die die gesamte kodierende Region enthält.

Die Expression des Cx43 Proteins konnte in der Immunfluoreszenzanalyse in undifferenzierten C₂C₁₂ Zellen (Abb.4.12A), nicht aber in differenzierten C₂C₁₂ Zellen gezeigt werden (Abb.4.12B). Das Cx39 Protein war andererseits ausschließlich in differenzierten C₂C₁₂ Zellen, nicht aber in undifferenzierten Zellen nachweisbar (Abb.4.12C,D).

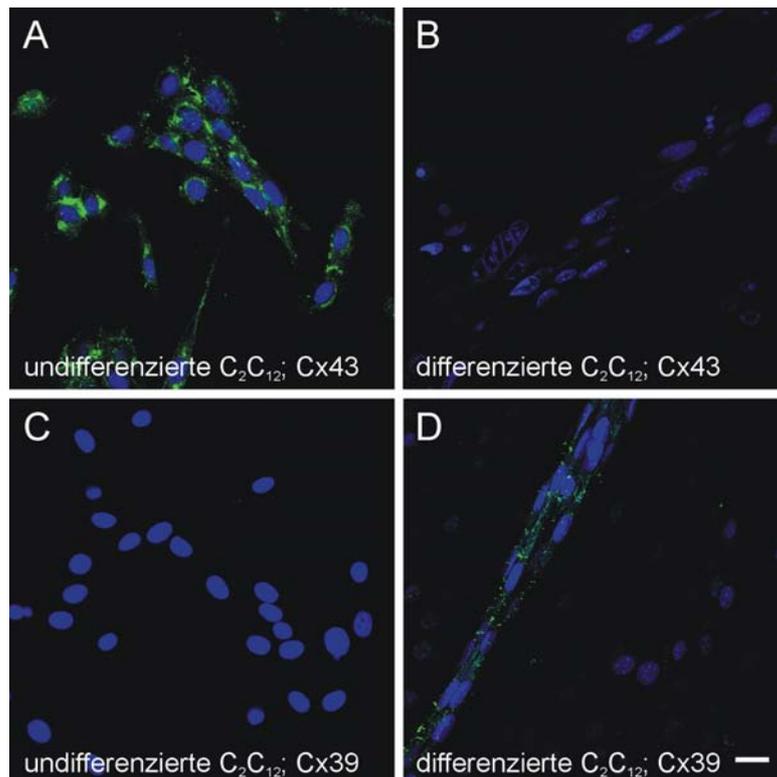


Abb.4.12: Expression des Cx43 und Cx39 Proteins vor und nach der Differenzierung der C₂C₁₂ Zellen mittels Immunfluoreszenz-Analyse

A) In undifferenzierten C₂C₁₂ Zellen konnte das Cx43 Protein (grün) in der Plasmamembran nachgewiesen werden, nicht aber in differenzierten C₂C₁₂ Zellen (B). Undifferenzierte C₂C₁₂ Zellen zeigen keine Immunreaktivität mit Cx39 spezifischen Antikörpern (grün), in differenzierten Zellen konnte die Expression in Myotuben nachgewiesen werden (D). Die Zellkerne wurden mit Propidiumiodid (blau) angefärbt. Maßstabsbalken: 20 µm.

4.1.2.2 Herunterregulation der Cx43 Proteinmenge durch siRNS gegen Cx43

Die maximale Expression des Cx43 Proteins ist während der Fusion der Myoblasten zu finden (Constantin und Cronier, 2000). Zur Untersuchung der Funktion der durch Cx43 gebildeten Gap Junction Kanäle und ihren Beitrag zum Differenzierungsprozess wurden C₂C₁₂ Zellen mit siRNS gegen Cx43 transfiziert, differenziert und der Differenzierungsprozess beobachtet.

Zum Nachweis der Herunterregulation der Cx43 Proteinmenge nach Transfektion mit Cx43 spezifischer siRNS wurden Immunoblotanalysen mit gegen Cx43 gerichteten Antikörpern durchgeführt (Abb.4.13A). 48 h nach Transfektion der C₂C₁₂ Zellen konnte eine Reduktion der Cx43 Proteinmenge um ca. 90% nachgewiesen werden. Wurden die Zellen dagegen als Kontrolle mit der siGlo (Cy3 markierte siRNS ohne

Zielgen) transfiziert, zeigte sich keine Reduktion der Cx43 Proteinmenge wie auch bei Applikation des Transfektionsreagenzes ohne siRNS (Abb.4.13A).

Die mit Cx43 spezifischer siRNS transfizierten C₂C₁₂ Zellen wurden differenziert (5 Tage) und die Expression des Cx43 Proteins wie auch des Differenzierungsmarkers Skeletales Myosin bestimmt. Wurden die Zellen mit siRNS gegen Cx43 transfiziert, konnte nach fünftägiger Differenzierung der Zellen eine Herunterregulation der Cx43 Proteinmenge um ca. 90% und das Fehlen des Markerproteins Skeletales Myosin nachgewiesen werden (Abb.4.13B). Wurden die Zellen während des Differenzierungsprozesses allerdings mit den Gap Junction Blockern Carbenoxolon bzw. Glycyrrhetinsäure inkubiert, konnte keine Veränderung der Cx43 Proteinexpression nachgewiesen werden (Abb.4.13B).

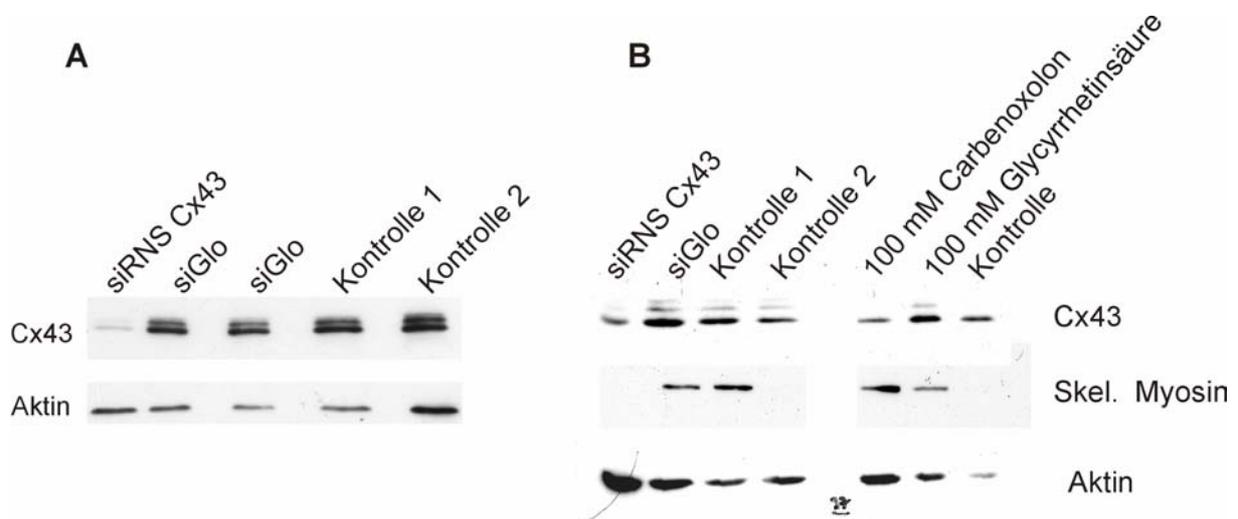


Abb.4.13: Herunterregulation der Cx43 Proteinmenge in mit siRNS gegen Cx43 transfizierten C₂C₁₂ Zellen

A) Die mit siRNS gegen Cx43 transfizierten C₂C₁₂ Zellen zeigten 48 h nach Transfektion eine Reduktion der Cx43 Proteinmenge um ca. 90 %. Dagegen zeigten mit siGlo transfizierte sowie untransfizierte Zellen keine veränderten Cx43 Proteinmengen. B) C₂C₁₂ Zellen wurden mit siRNS gegen Cx43 bzw. mit siGlo transfiziert und nach fünftägiger Differenzierung die Expression des Differenzierungsmarkers Skeletales Myosin und die Expression des Cx43 Proteins bestimmt. Des Weiteren wurden C₂C₁₂ Zellen mit den Gap Junction Blockern Carbenoxolon bzw. Glycyrrhetinsäure inkubiert und ebenfalls die Expression des Cx43 Proteins und des Skeletalen Myosins bestimmt. Die Inkubation mit Antikörpern gegen Aktin diente dem Abgleich der Proteinmengen.

Zur weiteren Untersuchung der Auswirkungen der Herunterregulation der Cx43 Proteinmenge auf den Differenzierungsprozess wurde dieser unter dem Hellfeldmikroskop dokumentiert (Abb.4.14). Die mit Cx43 spezifischer siRNS transfizierten Zellen zeigten keinen Differenzierungsprozess. Es konnten auch nach sieben Tagen keine Myotuben nachgewiesen werden. Wurden die Zellen jedoch nicht oder mit siGlo transfiziert, konnte eine Aneinanderlagerung der Myoblasten

beobachtet werden. Nach siebentägiger Differenzierung wurde in beiden Fällen die Ausbildung von Myotuben nachgewiesen (Abb.4.14).

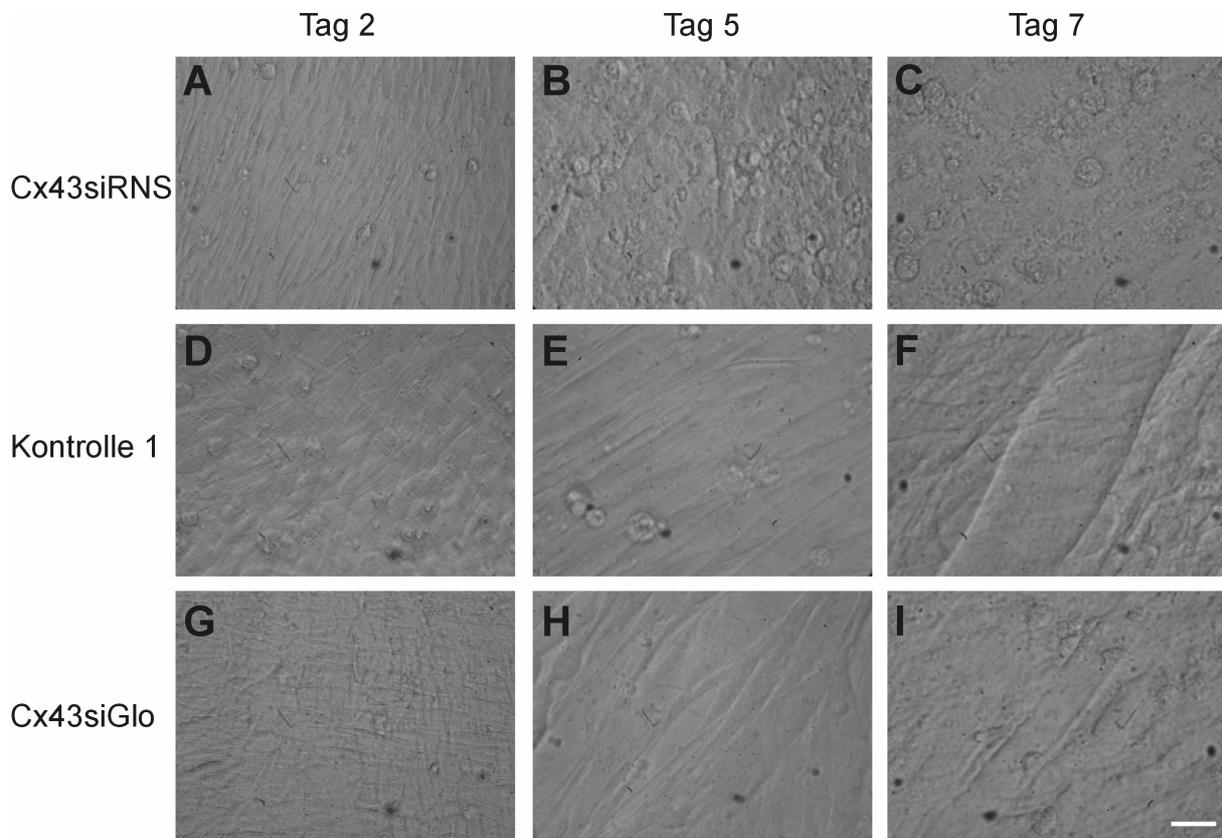


Abb.4.14: Untersuchung des Differenzierungsprozesses von C_2C_{12} Zellen nach Transfektion mit Cx43 spezifischer siRNS

A-C) Die mit siRNS gegen Cx43 transfizierten C_2C_{12} Zellen zeigen weder eine Aneinanderlagerung der Myoblasten noch die Ausbildung von Myotuben. D-F) Werden die Zellen dagegen nur mit dem Transfektionsmedium ohne siRNS oder mit siGlo (G-I) inkubiert und differenziert, ist eine Aneinanderlagerung der Myoblasten und nach sieben Tagen die Ausbildung von Myotuben nachweisbar. Maßstabsbalken: 20 μ m.

4.1.2.3 Blockierung der Gap Junction Kanäle durch Glycyrrhetinsäure oder Carbenoxolon

Ob die veränderte Differenzierung der C_2C_{12} Zellen auf die Ausbildung von durch Cx43 gebildeten Gap Junctions oder eine andere Funktion des Cx43 Proteins in der Zelle zurückzuführen ist, sollte durch Verwendung der Gap Junction Blocker Carbenoxolon und Glycyrrhetinsäure analysiert werden. Bei Verwendung dieser Blocker ändert sich die Proteinmenge des Cx43 nicht (Abb.4.13B), allerdings sind die Gap Junction Kanäle nicht mehr permeabel.

Die C_2C_{12} Zellen wurden entweder mit Carbenoxolon oder Glycyrrhetinsäure inkubiert und der Differenzierungsprozess durch Serum-Depletion eingeleitet. Nach fünftägiger Differenzierung konnten bei Kontrollzellen die ersten Myotuben nachgewiesen werden, bei Applikation der Gap Junction Blocker waren weder Myotuben noch aneinandergelagerte Myoblasten erkennbar (Abb.4.15).

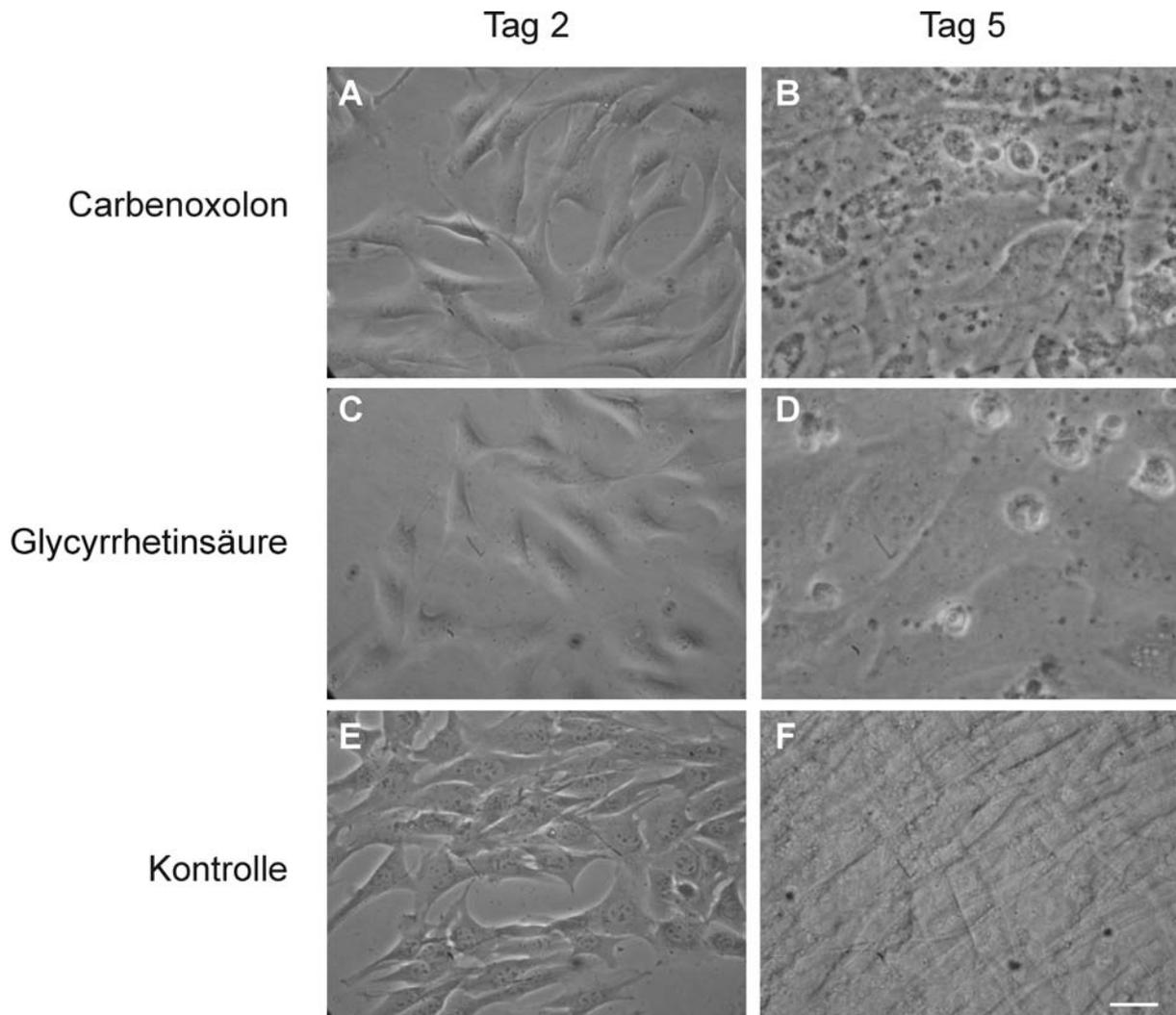


Abb.4.15: Untersuchung des Effektes der Gap Junction Blocker Carbenoxolon und Glycyrrhetinsäure auf die Differenzierung von C_2C_{12} Zellen

Die mit Carbenoxolon (A, B) bzw. Glycyrrhetinsäure (C,D) inkubierten C_2C_{12} Zellen zeigen weder eine Aneinanderlagerung der Myoblasten noch die Ausbildung von Myotuben. E, F) Werden die Zellen dagegen nur mit dem Ethanol/DMSO-Gemisch inkubiert, in dem die Blocker gelöst werden, ist eine Aneinanderlagerung der Myoblasten und die Ausbildung von Myotuben nachweisbar. Maßstabsbalken: 20 μm .

4.1.3 Expressionsanalyse der Pannexine Panx1, Panx2 und Panx3 auf Transkriptebene

Bei Vertebraten treten neben den Connexinen auch Pannexine auf, welche eine starke Strukturähnlichkeit, aber keine Sequenzähnlichkeit zu den Connexinen aufweisen. Die Expression der Pannexine Panx1, Panx2 und Panx3 sollte in verschiedenen Geweben auf Transkriptebene nachgewiesen werden.

Für Panx1 wie auch Panx2 konnte mit Hilfe von RT-PCR Analysen eine fast ubiquitäre Expression in der adulten Maus gezeigt werden (Abb.4.16). Auch während der Embryonalentwicklung konnten Transkripte für Panx1 und Panx2 gefunden werden. Panx3 hingegen wurde ausschließlich in der adulten Haut sowie während der Embryonalentwicklung ab ED11.5 nachgewiesen.

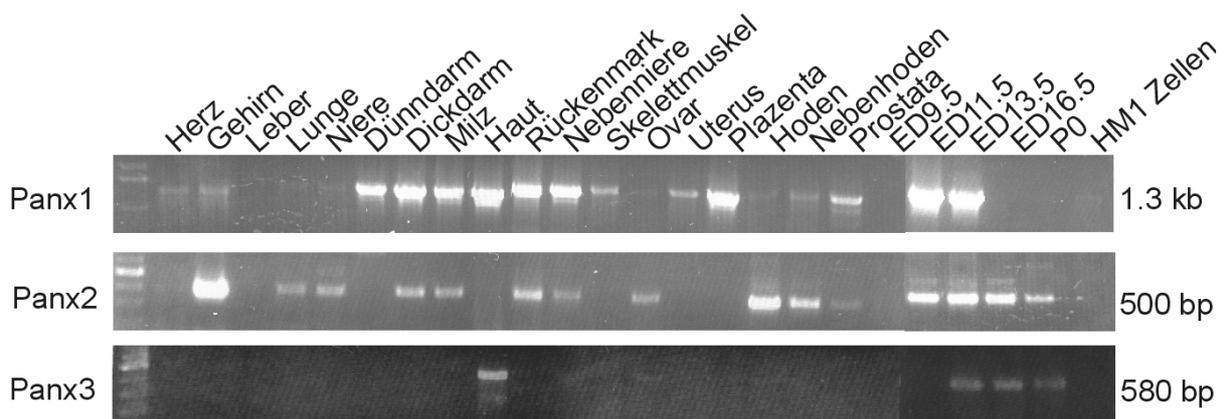


Abb.4.16: Expressionsanalyse aller bekannten Pannexine in verschiedenen Geweben der Maus. Die Expression der Pannexine Panx1 und Panx2 konnte in fast allen adulten Geweben sowie während der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden. Das Panx3 Transkript wurde ausschließlich in der adulten Haut und während der Embryonalentwicklung gefunden. Für alle Analysen wurden Intron-überspannende Primer eingesetzt.

4.1.4 Analysen des Skelettmuskels bei Substitution des Cx43 durch Cx26 bzw. Cx32

Im adulten Skelettmuskel wird Cx43 in Satellitenzellen exprimiert (Araya et al., 2005), bei der Regeneration des Skelettmuskels nach einer Verletzung kommt es zu einer gesteigerten Expression des Cx43 (Araya et al., 2005). In Cx43^{fl/fl}:Mx-Cre Mäusen, bei denen durch Applikation doppelsträngiger RNS die Deletion des Cx43 Gens im adulten Tier induziert wurde (Araya et al., 2005), konnte gezeigt werden, dass der Muskelregenerationsprozess bei Fehlen des Cx43 Proteins schneller verläuft als in Kontrolltieren. Ob auch ein Ersatz des Cx43 durch ein anderes Connexin, z.B. Cx26 oder Cx32, zu diesem Phänotyp führt, sollte an Muskelregenerationsexperimenten mit Cx43^{Cx26/Cx26} (Winterhager et al., 2007) und Cx43^{Cx32/Cx32} Tieren (Plum et al., 2000) gezeigt werden.

4.1.4.1 Histologie des adulten Skelettmuskels

Die Histologie des Tibialis anterior Muskels adulter Cx43^{Cx26/Cx26} Mäuse wurde mit der der Geschwistertiere (Cx43^{Cx26/+} und Cx43^{+/+}) an HE-gefärbten Dünnschnitten verglichen (Abb.4.17). Es konnten weder Unterschiede in der Muskeltextur noch im Durchmesser der einzelnen Muskelfasern (Abb.4.17A-C) noch im Verhältnis von Bindegewebe (Endomysium, Perimysium) zu Muskelfasern (Abb.4.17D-F) festgestellt werden. Auch das Volumen des Skelettmuskels im Vergleich zum Gesamtkörpergewicht war nicht verändert.

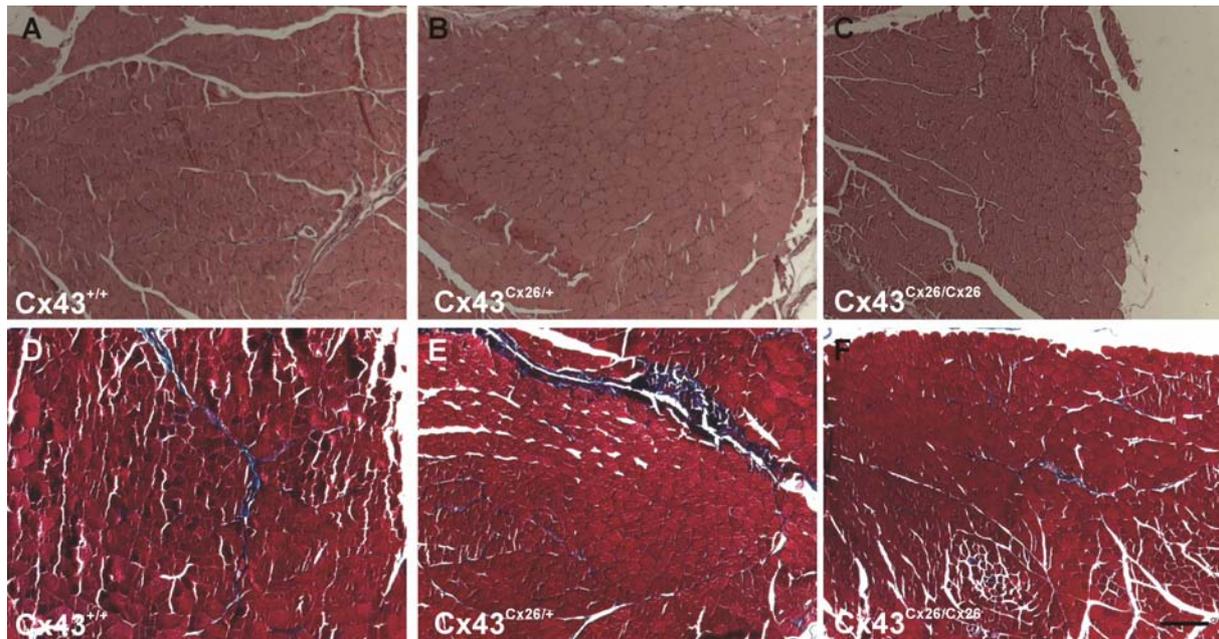


Abb4.17: Histologische Untersuchung des Tibialis anterior Muskels (A-C) HE-Färbung des Tibialis anterior Muskels. (D-F) Trichromfärbung des Tibialis anterior Muskels. Die Muskelfasern sind in rot, kollagenes Bindegewebe in blau angefärbt. Es konnten keine histologischen Veränderungen des Tibialis anterior Muskels im Vergleich von $Cx43^{Cx26/Cx26}$ zu $Cx43^{+/+}$ bzw. $Cx43^{Cx26/+}$ Geschwistertieren nachgewiesen werden. Maßstabsbalken: 100 μ m.

4.1.4.2 Untersuchung des Regenerationsprozesses des adulten Skelettmuskels bei Substitution des Cx43 durch Cx26 bzw. Cx32

Adulte Tiere (8 Wochen alt) wurden betäubt und der Tibialis anterior Muskel durch Injektion von $BaCl_2$ teilweise zerstört. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion des $BaCl_2$ wurden die Muskeln präpariert und für die folgenden Untersuchungen eingesetzt.

Für die Immunoblot-Analyse wurden Proteinlysate des gesamten, verletzten Tibialis anterior Muskels eingesetzt. Als Marker für das Fortschreiten des Regenerationsprozesses wurde Myogenin verwendet. In Wildtyp Tieren liegt das Expressionsmaximum des Myogenin Proteins an Tag 5 der Regeneration (Araya et al., 2005; Daten nicht gezeigt). Bei $Cx43^{Cx26/+}$ wie auch bei $Cx43^{Cx32/+}$ Tieren wurde die stärkste Expression des Myogenins ebenfalls an Tag 5 des Regenerationsprozesses nachgewiesen (Abb.4.18). In $Cx43^{Cx26/Cx26}$ und $Cx43^{Cx32/Cx32}$ Tieren wurde bereits nach 3 Tagen eine starke Expression des Myogenins gefunden.

In beiden heterozygoten Mäusen war das Expressionsmaximum des Cx43 Proteins an Tag 5 erreicht, wie auch für die Wildtyp Situation beschrieben (Araya et al., 2005). In Cx43^{Cx26/Cx26} und Cx43^{Cx32/Cx32} Tieren hingegen wurde das Expressionsmaximum von Cx26 bzw. Cx32 an Tag 3 des Regenerationsprozesses erreicht. Diese vorzeitige Expression korreliert mit der verfrühten Myogenin Expression bei Ersatz des Cx43 durch Cx26 bzw. Cx32.

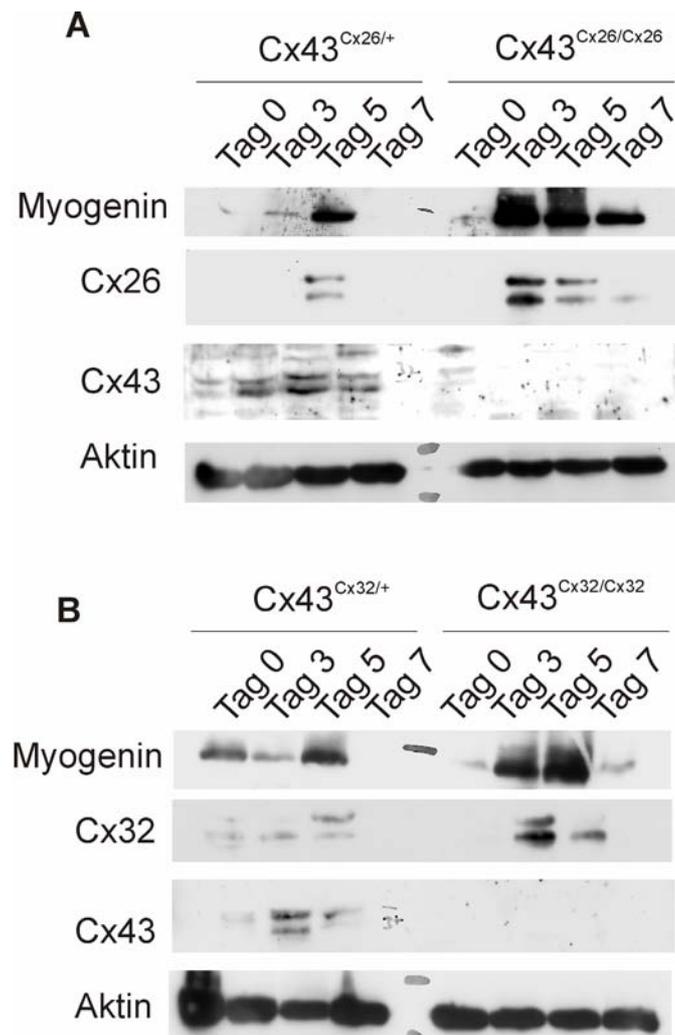


Abb.4.18: Untersuchung des Regenerationsprozesses des Tibialis anterior Muskels bei Substitution des Cx43 durch Cx26 bzw. Cx32 mittels Immunoblotanalyse

Für die Immunoblotanalyse wurde der gesamte Tibialis anterior Muskel eingesetzt. Das Expressionsmaximum des Markerproteins Myogenin wurde in Cx43^{Cx26/Cx26} Tieren wie auch in Cx43^{Cx32/Cx32} Tieren an Tag 3 des Regenerationsprozesses erreicht, während heterozygote Tiere die stärkste Expression an Tag 5 zeigten. Die Expression des Cx26 bzw. Cx32 in Mäusen, bei denen Cx43 durch Cx26 bzw. Cx32 ersetzt wurde, ist im Vergleich zu heterozygoten Geschwistertieren bereits nach drei Tagen nachweisbar. Zum Abgleich der eingesetzten Proteinmengen wurde eine Inkubation mit gegen Aktin gerichteten Antikörpern durchgeführt.

Zur weiteren Untersuchung des Regenerationsprozesses der $Cx43^{Cx26/Cx26}$ Tiere wurden Dünnschnitte an Tag 5 der Regeneration und anschließend eine HE-Färbung durchgeführt (Abb.4.19).

Bei $Cx43^{+/+}$ Tieren wie auch bei $Cx43^{Cx26/+}$ Tieren konnten 5 Tage nach Verletzung des Tibialis anterior Muskels viele runde Zellkerne nachgewiesen werden (Abb.4.19A,B), die auf aktivierte Satellitenzellen hindeuten. In $Cx43^{Cx26/Cx26}$ Tieren waren längliche Zellkerne zu finden, des Weiteren war die Anzahl der Zellkerne reduziert im Vergleich zu den Kontrollen. Auch konnten hier schon erste Myotuben gezeigt werden.

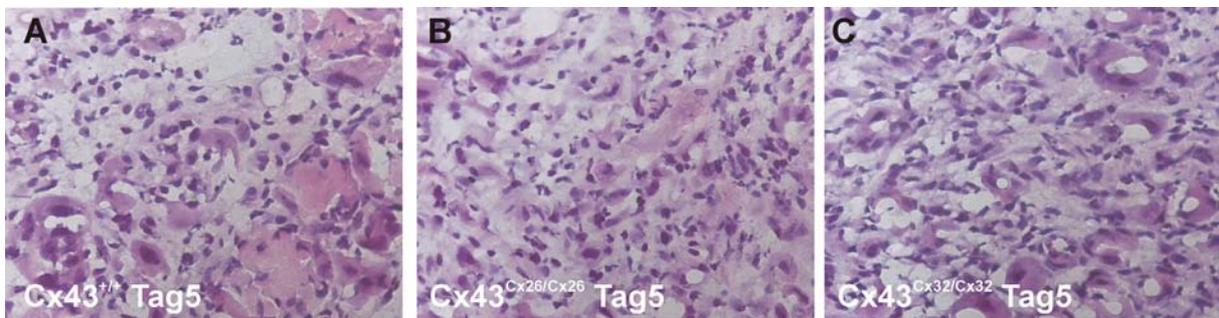


Abb.4.19: Histologische Untersuchung des Tibialis anterior Muskels während des Regenerationsprozesses

A-C) HE-Färbung des Tibialis anterior Muskels fünf Tage nach Injektion des $BaCl_2$. In $Cx43^{Cx26/Cx26}$ Tieren wiesen die Zellkerne im Vergleich zu den Kontrolltieren eine längliche Form auf, des Weiteren ließen sich Myotuben nachweisen.

Weiterhin wurden an $Cx43^{Cx26/Cx26}$ Tieren Immunfluoreszenzanalysen am Tibialis anterior Muskel an Tag 5 der Regeneration durchgeführt. In $Cx43^{+/+}$ Tieren wurde kein Cx26 Protein nachgewiesen, so dass eine endogene Expression des Cx26 während des Muskelregenerationsprozesses ausgeschlossen werden konnte (Abb.4.20A). In $Cx43^{Cx26/Cx26}$ wie auch in $Cx43^{Cx26/+}$ Tieren war ein Nachweis des Cx26 Proteins im Bereich der Verletzung möglich (Abb.4.20B, C) wie auch für Cx43 in heterozygoten Tieren (Abb.4.20D).

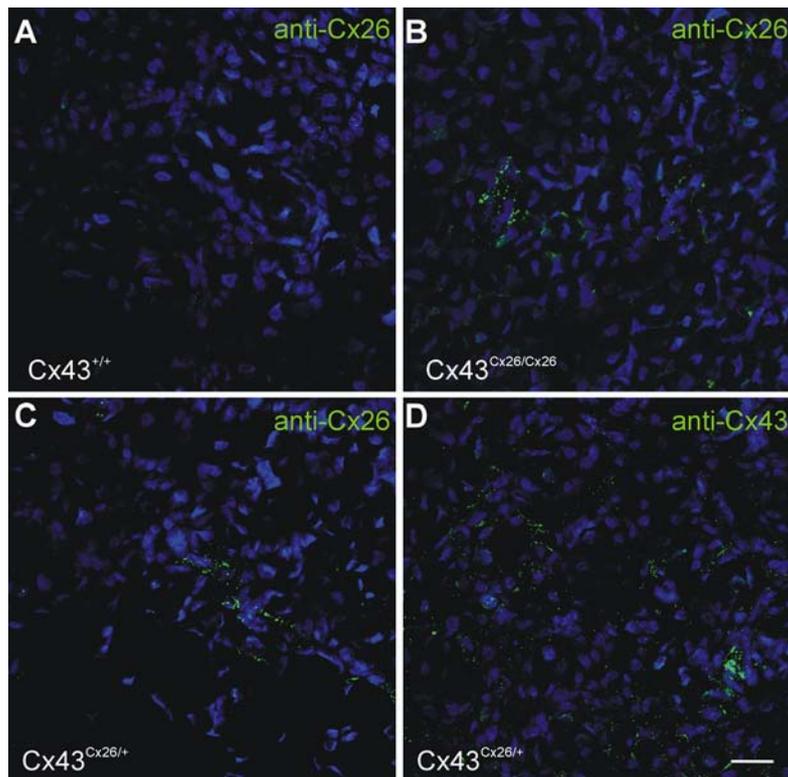


Abb.4.20: Expression des Cx26 und Cx43 während der Regeneration des Tibialis anterior in $Cx43^{Cx26/Cx26}$ Mäusen an Tag 5 nach Verletzung
A) In $Cx43^{+/+}$ Tieren konnte kein Cx26 Protein (grün) nachgewiesen werden, wohingegen in $Cx43^{Cx26/Cx26}$ (B) und $Cx43^{Cx26/+}$ Tieren eine Expression des Cx26 Proteins (grün) gefunden wurde. D) Heterozygote $Cx43^{26/+}$ Tiere exprimieren Cx43 (grün) ebenfalls im Bereich der Verletzung. Die Zellkerne wurden mit Propidiumiodid (blau) angefärbt. Maßstabsbalken: 20 μ m.

4.2 Transplantation Cx43 exprimierender Skelettmuskelzellen in das Mauserz

Die Transplantation verschiedener Zelltypen stellt eine potentielle Strategie zur Behandlung akuter oder chronisch ischämischer Herzen dar. Werden normale Skelettmuskelzellen transplantiert, führt dies nur zu einer leichten Verbesserung der Kontraktilität des Herzens, da die Skelettmuskelzellen weder zu Kardiomyozyten werden noch mit dem Myokard des Empfängers über Gap Junctions koppeln (Reinecke et al., 2002; Leobon et al., 2003). Des Weiteren erhöht sich das Risiko des Auftretens einer ventrikulären Tachykardie nach Transplantation dieser Zellen (Hagege et al., 2006), welches wiederum zum Tod nach einem myokardialen Infarkt führen kann.

Zur Verringerung der Arrhythmien wäre es von Vorteil, wenn die transplantierten Myoblasten auch nach ihrer Differenzierung zu Myotuben Cx43 exprimierten. Dies würde eine Kopplung der transplantierten Zellen mit dem Empfängermyokard ermöglichen. Daher wurden für die folgenden Analysen Mäuse eingesetzt, die in Myotuben sowohl Cx43 als auch eGFP als Reportergen unter Kontrolle eines bidirektionalen Promotors mit Hilfe des TetOFF Systems exprimieren (Volker Wulf, Diplomarbeit 2005).

4.2.1 Charakterisierung der Cx43^{tetOeGFP}:MCKtTA Mäuse

Die Cx43^{tetOeGFP} Mäuse (Döring, Dissertation 2005) wurden mit MCKtTA Mäusen (Ahmad et al., 2000) verpaart, welche den Transaktivator für das TetOFF System unter Kontrolle des MCK Promotors (Muskel Kreatin Kinase) exprimieren. Hierdurch wird die Expression des Cx43 sowie des eGFP in Myotuben und reifen Muskelfasern erreicht (Abb.4.21) (vgl. Volker Wulf, Diplomarbeit 2005).

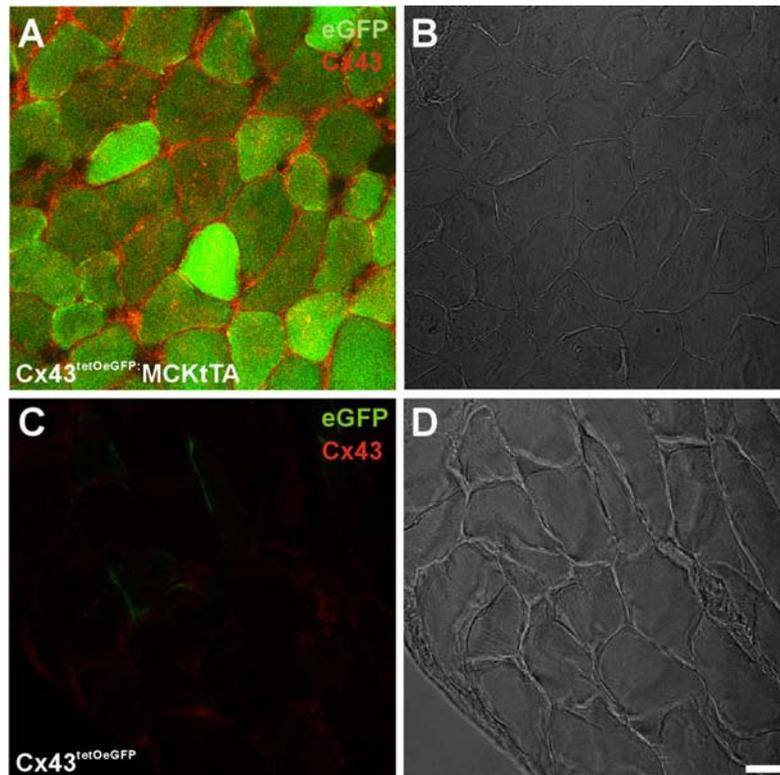


Abb.4.21: Immunfluoreszenz-Analyse des Tibialis anterior Muskels adulter Cx43TetOeGFP/MCKtTA und Cx43^{tetOeGFP} Mäuse. In Cx43^{tetOeGFP}:MCKtTA Tieren konnte sowohl das eGFP (grün) als auch das Cx43 Protein (rot) nachgewiesen werden (A), Cx43^{tetOeGFP} Mäuse exprimieren weder eGFP noch Cx43 in adulten Muskelfasern (C). (B) und (D) zeigen die entsprechenden Hellfeldaufnahmen. Maßstabsbalken: 20 µm.

4.2.2 Untersuchung des Herzens nach Transplantation primärer Myoblasten

Nach Vereisung der anterior-lateralen linken Ventrikelwand zur Infarktauslösung wurden den Mäusen primäre Myoblasten intramyokardial injiziert. Diese Myoblasten wurden Cx43^{tetOeGFP}:MCKtTA Mäusen oder als Kontrolle einfach transgenen Tieren (Cx43^{tetOeGFP} bzw. MCKtTA) an Tag 18.5 der Embryonalentwicklung entnommen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Expression des Reportergens eGFP in den verschiedenen Skelettmuskeln der Cx43^{tetOeGFP}:MCKtTA Embryonen bereits deutlich sichtbar (Abb.4.22A), während in Cx43^{tetOeGFP} Tieren kein eGFP nachgewiesen werden konnte (Abb.4.22B). Werden die aus Cx43^{tetOeGFP}:MCKtTA Tieren gewonnenen Myoblasten kultiviert und zu Myotuben differenziert, kann in der Zellkultur die Expression des Cx43 wie auch des eGFP nachgewiesen werden (Abb.4.22C).

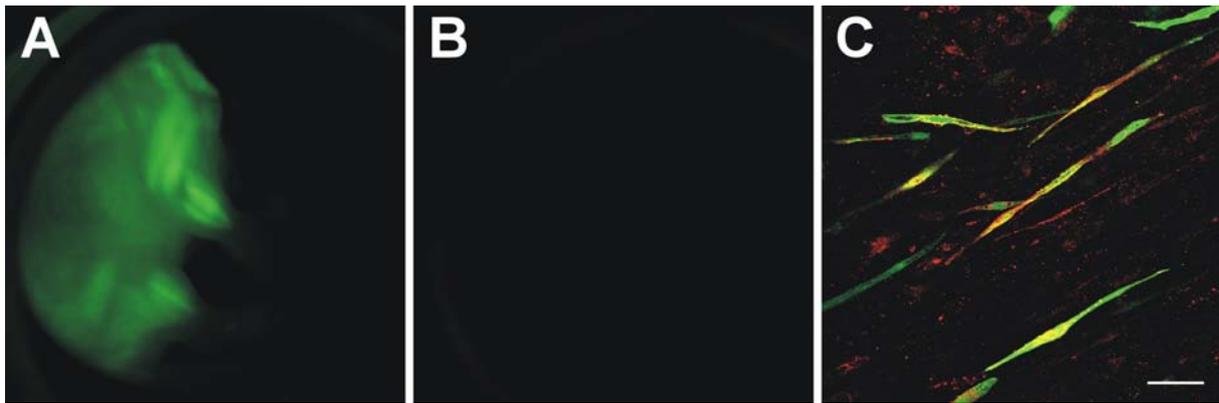


Abb.4.22: Expression des eGFP Reportergens an Tag 18.5 der Embryonalentwicklung
 A) Die Expression des eGFP konnte in Cx43^{tetOeGFP}:MCKtTA Tieren an Tag 18.5 der Embryonalentwicklung in verschiedenen Skelettmuskeln des Embryos durch Fluoreszenzanalyse nachgewiesen werden. B) Cx43^{tetOeGFP} Tiere zeigen keine Expression des eGFP. C) Die Expression des Cx43 Proteins (rot) wie auch des eGFP (grün) wurde in kultivierten Myotuben von Cx43^{tetOeGFP}:MCKtTA Tieren nachgewiesen. Maßstabsbalken in A und B: 1 cm, in C: 20 μ m.

Zwei Wochen nach Transplantation der Myoblasten wurden die Empfängertiere kardiologisch untersucht. Die aus den Cx43^{tetOeGFP}:MCKtTA Tieren isolierten Myoblasten lagerten sich stabil in die Infarktregion des Myokards ein (Abb.4.23A, B), wobei sich multinukleäre Zellen bildeten, die sowohl Cx43 als auch eGFP exprimierten (Abb.4.23F, G). Im Oberflächen-EKG wiesen die Empfängertiere nur kleinere Veränderungen im Vergleich zu Kontrolltieren und Schein-injizierten Tieren auf (Abb.4.23C). Es zeigte sich auch keine Spaltung des QRS Komplexes (Abb.4.34D) der Empfängertiere wie sie bei Transplantation genetisch unveränderter Myoblasten auftritt. Des Weiteren verbesserte sich die elektrische Stabilität bei Transplantation der Cx43-überexprimierenden Zellen (Abb.4.23D, H), das Auftreten ventrikulärer Tachykardien war auf 37.5 % reduziert. Wurde dagegen eine Transplantation mit genetisch unveränderten Myoblasten durchgeführt, traten bei allen Empfängertieren ventrikuläre Tachykardien auf (Abb.4.23E).

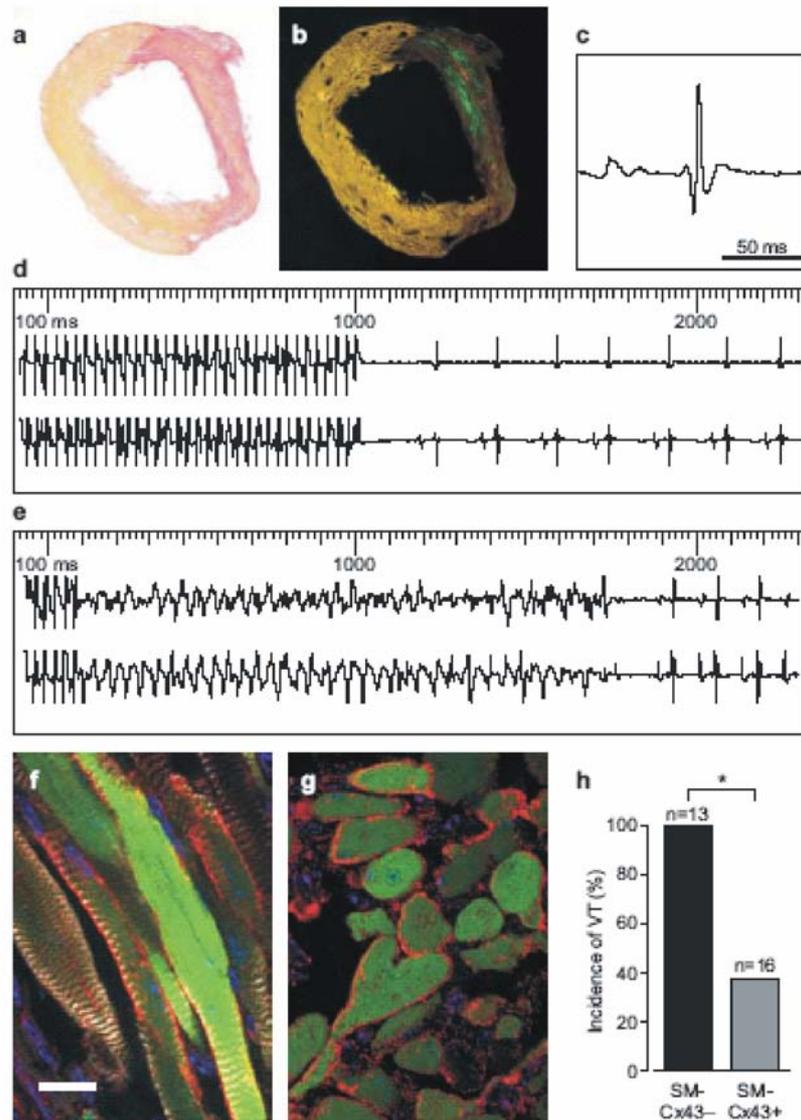


Abb.4.23: Untersuchung des Herzens nach Transplantation primärer Myoblasten
 A) Die Sirius-Rot Färbung zeigt den Bereich des Ventrikelwand, die durch die Vereisung zerstört wurde und in die sich die Cx43^{tetOeGFP}:MCKtTA positiven Myoblasten eingelagert haben (B). Die Fluoreszenz des eGFP Reportergens ist in grün dargestellt. C) Das Oberflächen-EKG weist keine größeren Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen auf. D) Die elektrische Stabilität ist verbessert im Vergleich zu Mäusen, denen genetisch unveränderte Myoblasten injiziert wurden (E). (F, G) Die transplantierten Zellen exprimieren sowohl Cx43 (rot) als auch eGFP (grün). H) Induzierbarkeit ventrikulärer Tachykardien. Maßstabsbalken: (A, B) 1,2 mm, (F, G) 15 µm. Die Daten wurden in Kooperation mit der AG Fleischmann, Bonn, gewonnen und publiziert (Roell et al., 2007).

4.3 Erzeugung und Analyse Cx39 defizienter Mäuse

Während der Entwicklung des Skelettmuskels wird Cx39 in primären und sekundären Myotuben exprimiert (siehe 4.1.1). Zur Untersuchung der Funktion des Cx39 Proteins *in vivo* sollte eine Maus erzeugt werden, die anstelle der kodierenden Region des Cx39 das Reporteragen eGFP exprimiert.

4.3.1.1 Klonierung des Austauschvektors Cx39KO

Schritt 1 (pBSK-Apal-2a): Aus dem Cosmid 12645 wurden 4,1 kb der 5'homologen Region mit *Apal* ausgeschnitten und in den Vektor pBSKII ligiert (Abb.4.24).

Schritt 2 (pBSK-5'HR): Um die folgenden Klonierungsschritte zu erleichtern, wurde der Vektor pBSK-5'HR kloniert, indem die 5'Homologie aus dem Vektor pBSK-Apal-2a mit *PspOMI* ausgeschnitten und in den Vektor pBSKII kloniert wurde, der zuvor mit *EcoRI* und *EcoRV* geschnitten und die Enden aufgefüllt wurden.

Schritt 3 (pBSK-5'HR-5'UTR): Da der Vektor pBSK-Apal-2a nicht die gesamte 5'homologe Region beinhaltet, wurde eine PCR zur Amplifikation des 5'UTRs des Cx39 Gens mit Cosmid DNS (Cosmid 12645) durchgeführt. Das PCR Produkt wurde mit *EcoRI* gespalten und in den mit *EcoRI* und *SmaI* geöffneten Vektor pBSK-5'HR ligiert. Hieraus entstand der Vektor pBSK-5'HR-5'UTR (Abb. 4.24). Der rückwärtige Primer enthielt eine zusätzliche *SaI* Schnittstelle, die so gewählt ist, dass im Endvektor das eGFP Reporteragen unter Kontrolle des Cx39 Promotors und der Kozak-Sequenz des Cx39 Gens steht.

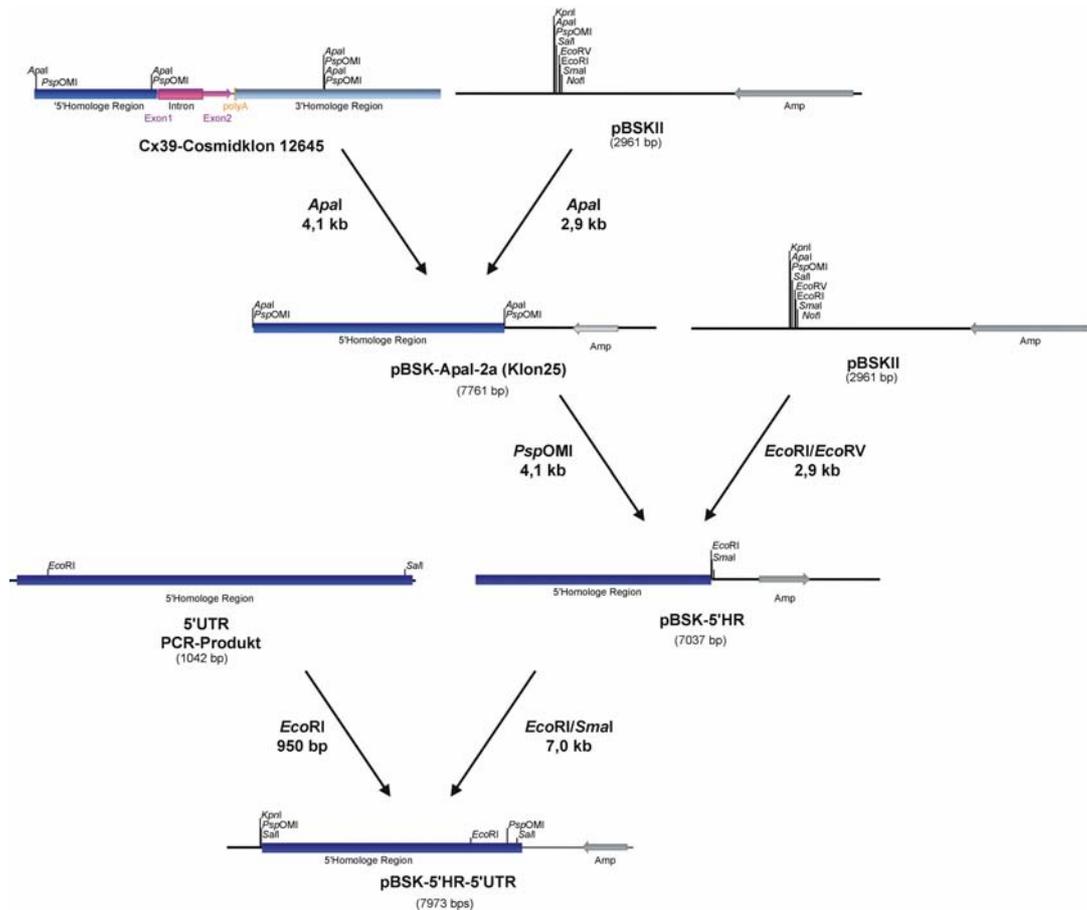


Abb.4.24: Klonierung des Vektors pBSK-5'HR-5'UTR

Schritt 4 (pBSK-eGFP): Aus dem Plasmid pMJGreen wurde das eGFP Gen mit *EcoRI/NotI* ausgeschnitten und in den mit *EcoRI* und *NotI* geöffneten Vektor pBSKII kloniert.

Schritt 5 (pBSK-5HR-UTR-eGFP): Der 5'homologe Bereich wie auch der 5'UTR des Cx39 Gens sollten vor das Reporter gen eGFP kloniert werden. Hierzu wurde der Vektor pBSK-eGFP mit *NcoI* linearisiert und der 5'homologe Bereich sowie der 5'UTR aus dem Vektor pBSK-5'HR-5'UTR mit *SalI* ausgeschnitten. Nach der Ligation entstand das Plasmid pBSK-5HR-UTR-eGFP (Abb.4.25).

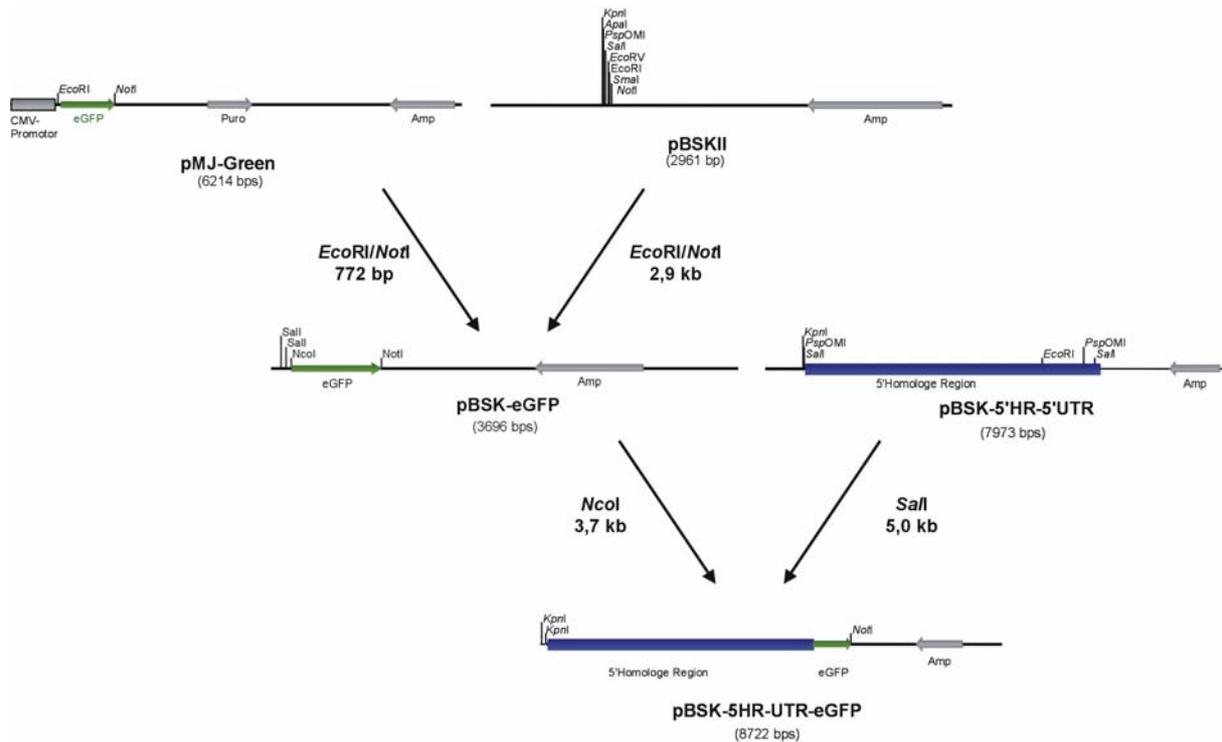


Abb.4.25: Erzeugung des Vektors pBSK-5HR-UTR-eGFP

Schritt 6 (pBSK-EcoRI): Aus dem Cosmid 12645 wurde die 3'homologe Region sowie die kodierende Region des Cx39 Gens mit *EcoRI* ausgeschnitten und in den mit *EcoRI* geöffneten Vektor pBSKII kloniert (Abb.4.26).

Schritt 7 (pBSK-3'HR): Der Vektor pBSK-EcoRI wurde mit *NaeI/PsI* gespalten, die Vektorenden aufgefüllt und die 3'homologe Region in den mit *EcoRV* linearisierten Vektor pBSKII ligiert (Abb.4.26).

Schritt 8 (pBSK-3'HR-Neo): Für eine spätere Selektion der mit dem Zielvektor transfizierten embryonalen Stammzellen wurde eine von *frt*-Stellen umgebene, PGK-Promotor gesteuerte Neomycin-Resistenzkassette (Neo) durch Spaltung mit *SalI* aus dem Vektor pBSK-*frt*-Neo-*frt* isoliert. Diese Resistenzkassette wurde in den mit *SalI* linearisierten Vektor pBSK-3'HR vor den 3'homologen Bereich des Cx39 Gens eingebracht (Abb.4.26).

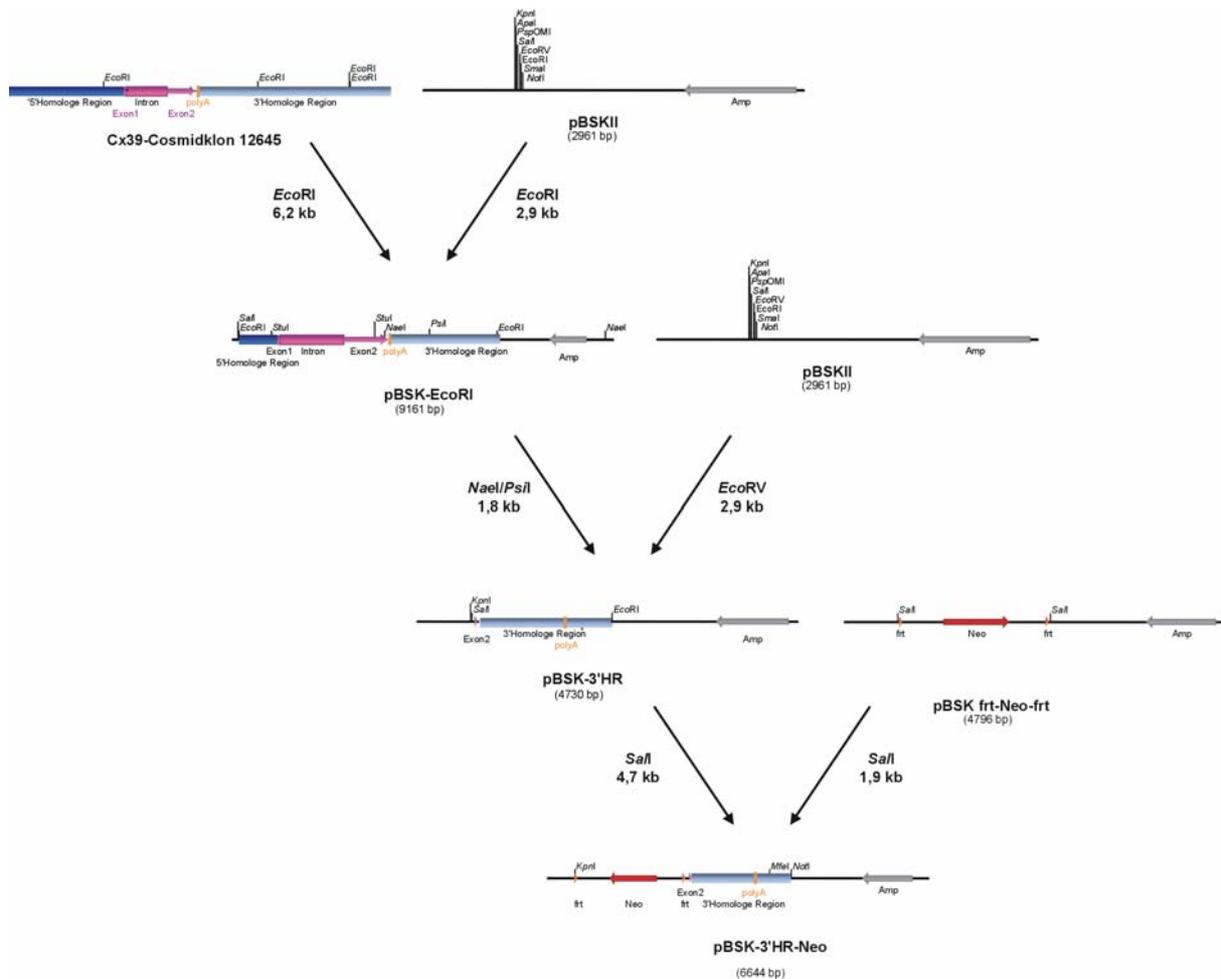


Abb.4.26: Erzeugung des Vektors pBSK-3'HR-Neo

Schritt 9 (Cx39KO): Im letzten Schritt zur Erzeugung des Austauschvektors Cx39KO wurde ein 6,6 kb großes Fragment aus dem Vektor pBSK-3'HR-Neo mit *PspOMI* und *KpnI* isoliert und in das durch *KpnI/NotI* Spaltung geöffnete Plasmid pBSK-5HR-UTR-eGFP ligiert (Abb.4.27).

Schritt 10 (PCR-Testvektor): Um eine PCR etablieren zu können, mit der die homologe Rekombination im 3'Homologiebereich des Cx39 Gens nachgewiesen werden kann, wurde der PCR-Testvektor generiert. Ein 1,3 kb großes Fragment aus der 3'Homologie des Cx39 Gens wurde in den mit *MfeI* linearisierten Vektor pBSK-3'HR-Neo kloniert (Abb.4.27).

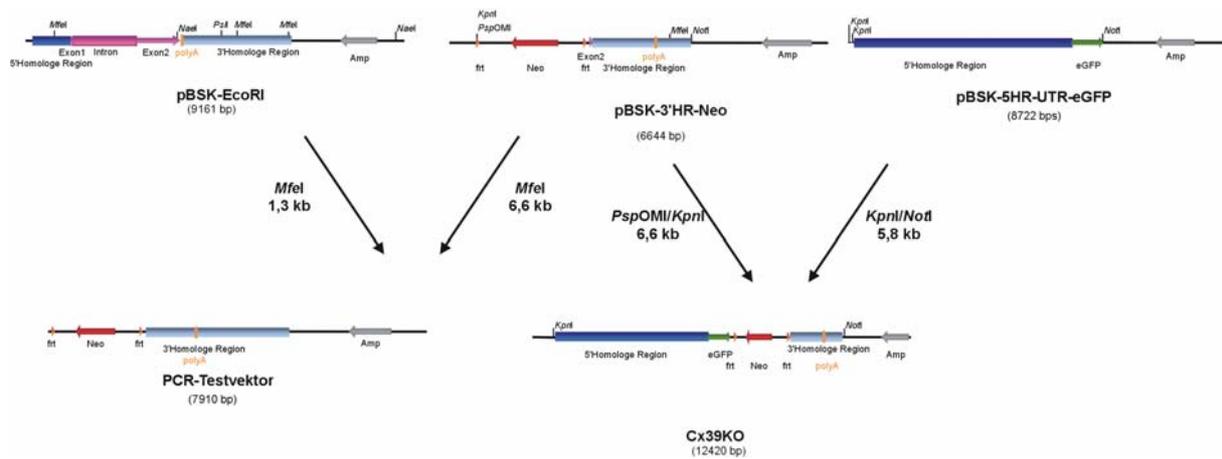


Abb.4.27: Erzeugung der Vektoren Cx39KO und PCR-Testvektor

Der fertige Austauschvektor (Abb.4.28A) wurde durch Restriktionsspaltung mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen überprüft (Abb.4.28B). Die Spaltung des Vektors zeigte mit allen verwendeten Restriktionsenzymen das erwartete Bandenmuster nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Die Funktionalität der frr-Stellen wurde durch Transformation des Vektors in flp-*E.coli* Bakterien (Buchholz et al., 1998) und anschließende Spaltung der Plasmid DNS mit gelelektrophoretischer Auftrennung bestätigt (Daten nicht gezeigt).

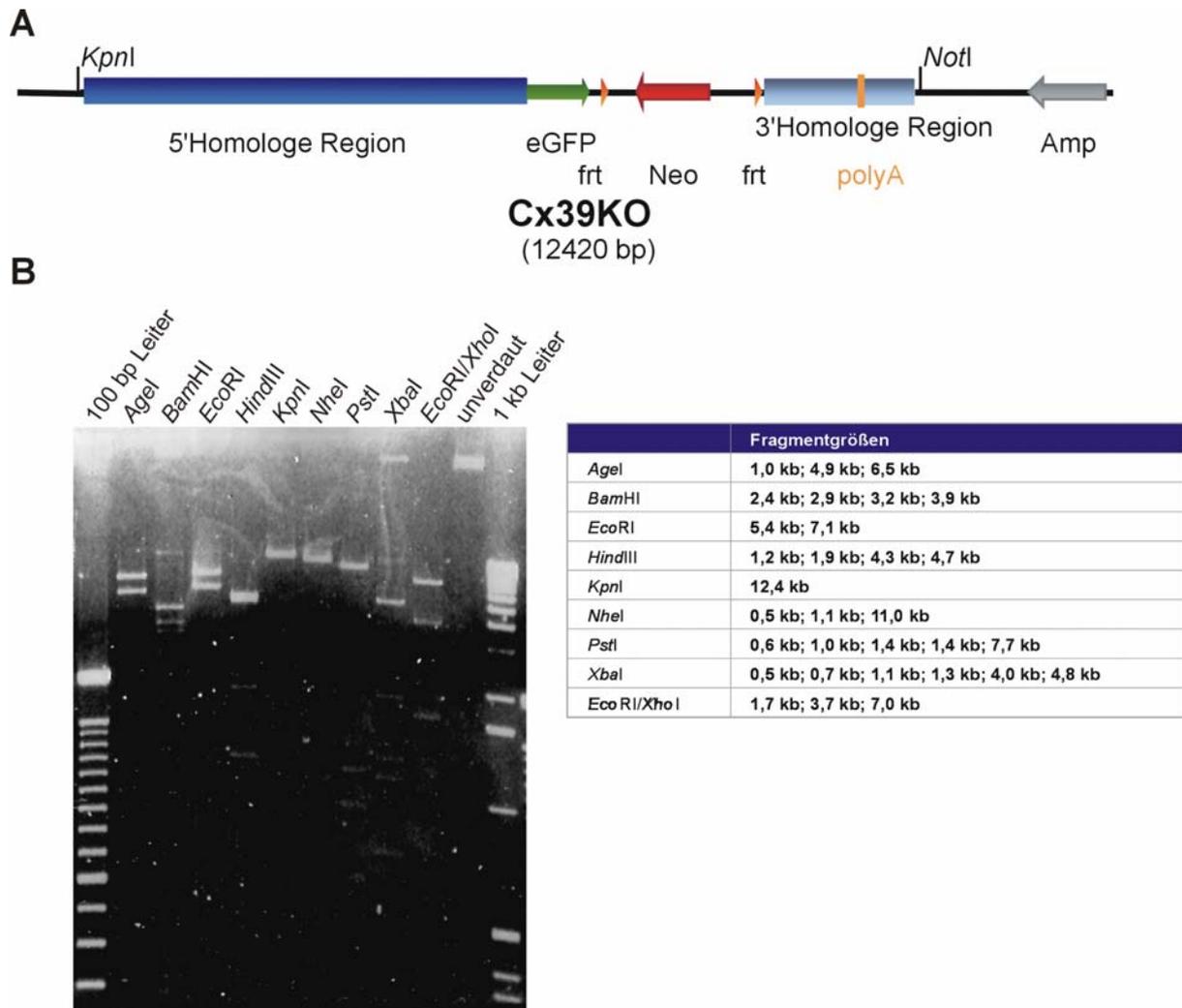


Abb.4.28: Schematische Darstellung des Austauschvektors Cx39KO (A) und gelelektrophoretische Auftrennung nach Restriktionsspaltung (B).

(A) Der Austauschvektor Cx39KO beinhaltet die 5'homologe Region des Cx39 Gens, das Reporter-gen eGFP unter Kontrolle des Cx39 Promotors, eine von frt-Stellen flankierte Neomycin-Resistenzkassette sowie die 3'Homologie des Cx39 Gens. Zur Selektion in *E.coli* beinhaltet der Vektor zusätzlich ein Ampizillin-Resistenzgen.

(B) Die erwarteten Fragmentgrößen sind der Tabelle auf der rechten Seite zu entnehmen. Die Spaltung des Vektors Cx39KO lieferte die erwarteten Fragmente.

4.3.1.2 Erzeugung und Charakterisierung homolog rekombinierter Maus ES-Zellen

Zur Überprüfung der Rekombination des 3'Bereichs des Cx39 Gens wurde eine Test-PCR etabliert. Der hierfür verwendete PCR-Testvektor ist in Abb.4.27 schematisch dargestellt. Der Vektor enthält 3'gelegene Bereiche, die im Cx39KO-Vektor nicht enthalten sind. Die eingesetzten Primer binden sowohl in der Neomycin-Resistenzkassette wie auch in diesem 3'gelegenen Bereich. Somit ist sichergestellt, dass mit DNS aus embryonalen Stammzellen nur dann ein PCR-Fragment entsteht, wenn eine homologe Rekombination mit dem Cx39KO-Vektor im 3'Bereich des Cx39

Gens stattgefunden hat. Die PCR liefert ein PCR-Fragment mit einer Größe von 1,9 kb (Abb.4.29).

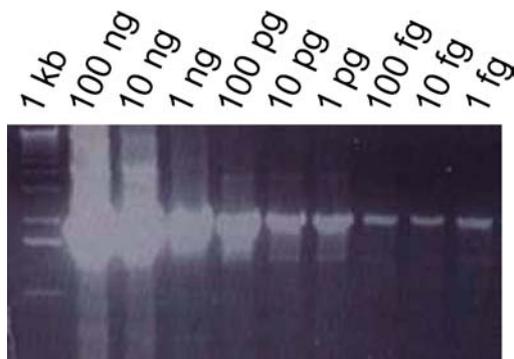
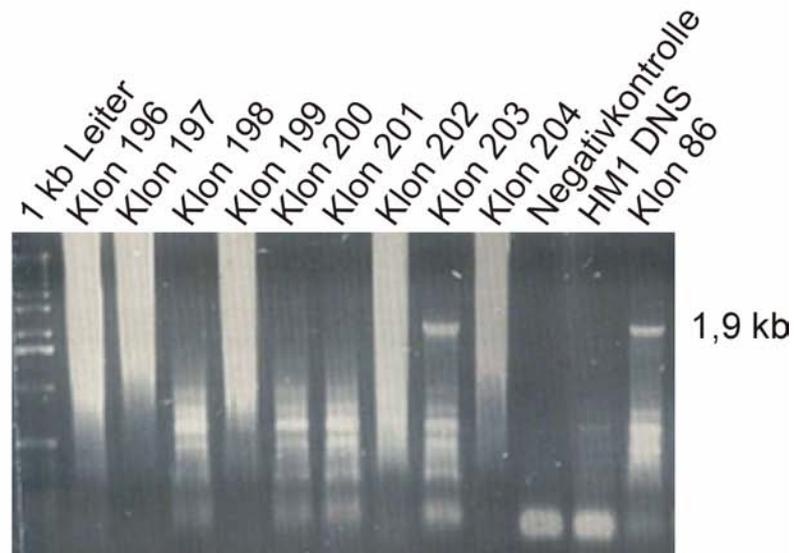


Abb.4.29: Etablierung einer Test-PCR zur Überprüfung der homologen Rekombination der 3'Homologie des Cx39 Gens. Die PCR liefert ein Fragment von 1,9 kb bei Verwendung der Primer Cx39konv-for und Cx39konv-rev. Als Matrize diente der PCR-Testvektor.

Nach Elektroporation von Sv129P2/OlaHsd HM1 Zellen (Magin et al., 1992) mit dem durch *KpnI* linearisierten Austauschvektor Cx39KO wurden die Zellen mit G418-haltigem Medium selektioniert. Es wurden 420 Klone stabil transfizierter embryonaler Stammzellen isoliert und mittels PCR Analyse untersucht (Abb.4.30A). Von den 13 PCR-positiven Klonen wurden 8 Klone für eine weitere Charakterisierung mittels Southern Blot Hybridisierung ausgewählt. Die Rekombination des 5'Bereichs wurde bei den Klonen 86, 123, 203, 303 und 404 unter Verwendung einer Sonde aus dem 5'Bereich des Cx39 Gens (*Apal/BbrPI* Fragment aus Cosmid 12645) bestätigt. Diese Klone zeigten bei Verwendung *SpeI*-gespaltener DNS aus ES-Zellen ein Fragment von 24 kb für das Wildtyp Allel und ein 14 kb großes Fragment für den homolog rekombinierten Zustand (Abb.4.30B). Um Mehrfachintegrationen des Vektors außerhalb des Cx39 Locus auszuschließen, wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen die DNS der Neomycin-Resistenzkassette durchgeführt. Die DNS wurde zuerst mit *SacI* gespalten, so dass nach erfolgreicher Hybridisierung eine Bande bei 11,5 kb für das rekombinierte Allel erwartet wird (Abb.4.30B). Gleichzeitig konnte durch Auswahl dieser Sonde die korrekte Hybridisierung im 3'Bereich nachgewiesen werden. Bei den Klonen 86, 147, 231, 303 und 404 wurde jeweils nur das erwartete Fragment bei 11,5 kb detektiert. Die schematische Darstellung der homologen Rekombination des Austauschvektors mit dem Cx39 Wildtyp Locus sowie die verschiedenen allelen Zustände sind in Abb. 4.31 dargestellt.

A



B

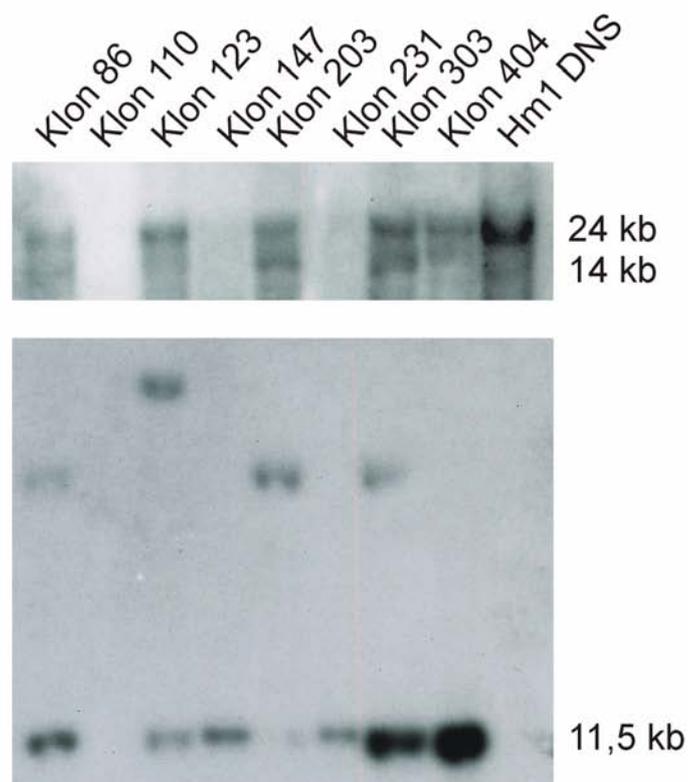


Abb.4.30: Analyse mit dem Vektor Cx39KO stabil transfizierter embryonaler Stammzellen
 (A) PCR Analyse: Bei erfolgreicher homologer Rekombination im 3'-Bereich des Cx39 Gens entsteht ein Fragment von 1,9 kb. Bei den Klonen 203 und 86 wurde dieses Fragment nachgewiesen. (B) Southern-Blot Hybridisierung: Die im oberen Teil der Abbildung gezeigte Hybridisierung mit einer 5'externen Sonde diente dem Nachweis der erfolgreichen homologen Rekombination im 5'Bereich des Cx39 Gens. Nach Restriktion der DNS mit *SpeI* entsteht ein Fragment von 24 kb bei Vorliegen eines Wildtyp Allels und ein Fragment von 14 kb im Falle des homolog rekombinierten Allels. Im unteren Teil der Abbildung ist die Überprüfung der Rekombination im 3'Bereich gezeigt. Nach Spaltung der DNS mit *SacI* und Hybridisierung mit einer in der Neomycin-Resistenzkassette gelegenen Sonde wird ein Fragment von 11,5 kb im Falle des rekombinierten Lokus detektiert. Die Klone 86, 203, 303 und 404 lieferten in allen durchgeführten Analysen die erwarteten Fragmente.

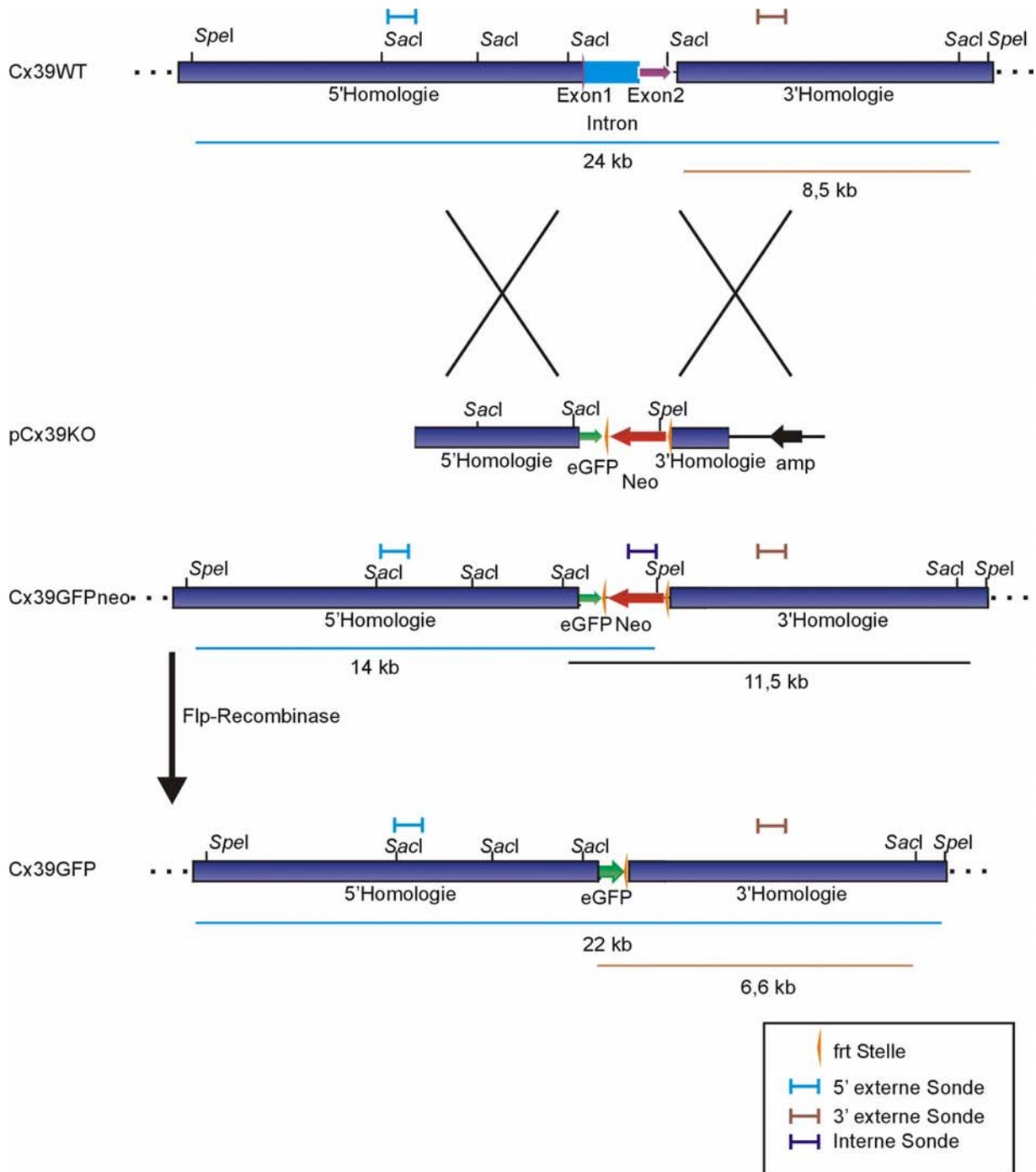


Abb.4.31: Schematische Darstellung der homologen Rekombination des Austauschvektors Cx39KO mit dem Cx39WT-Lokus in HM1-Zellen. Der Gen-Lokus nach Flp-Recombinase vermittelter Rekombination ist ebenfalls angegeben.

4.3.1.3 Erzeugung und Analyse der Cx39^{GFP} Mauslinie

4.3.1.3.1 Erzeugung chimärer Tiere durch Blastozysteninjektion homolog rekombinierter ES-Zellen

Nach der Überprüfung der embryonalen Stammzellen hinsichtlich der homologen Rekombination (siehe 4.3.1.2) wurden die Klone 86 und 303 auf die Vollständigkeit des Chromosomensatzes hin untersucht (Abb.4.32A). Beide Klone zeigten die erwartete Anzahl von 40 Chromosomen und wurden für die Blastozysten-Injektion eingesetzt.

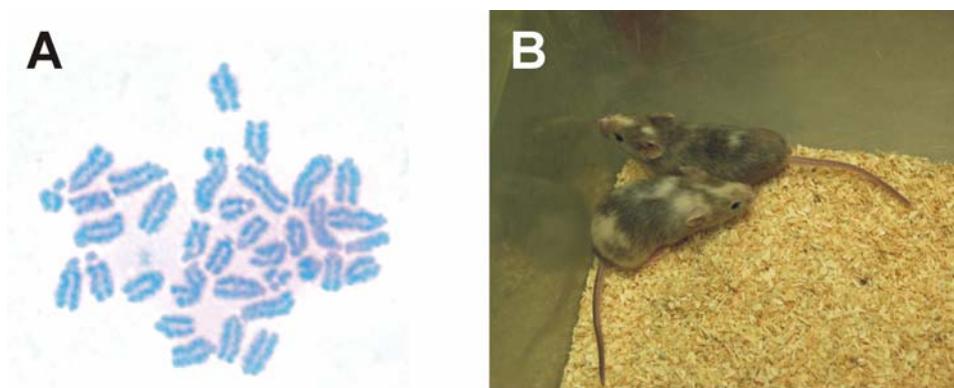


Abb.4.32: (A) Analyse der Vollständigkeit des Chromosomensatzes des Klons 86. Es sind die 40 Chromosomen in der Metaphase nach einer Giemsa-Färbung zu erkennen. (B) Beispiel zweier chimärer Mäuse (Chimäre 2, 3) mit einem Chimerismusgrad von ca. 100 %.

Im Zeitraum von drei Wochen wurden Blastozysteninjektionen der homolog rekombinierten Klone 86 und 303 in Blastozysten des Mausstamms C57BL/6 durchgeführt. Die Injektionen erfolgten an drei Tagen pro Woche. Aus der ersten Woche der Injektion (Klon 86) entstanden 8 Chimären (Abb.4.32B, Tab.4.1), aus der zweiten Woche (Klon 303) 10 Chimären und aus der dritten Woche (Klon 86) 6 Chimären mit einem Chimerismusgrad zwischen 60% und 100%. Zur Erzeugung von Cx39^{GFPneo/+} Tieren wurden die Chimären 1-8 mit C57BL/6 Tieren verpaart und die braunen Nachkommen mittels PCR-Analyse überprüft.

Chimäre	Geschlecht	Chimerismus-grad	aus ES-Zellklon	Nachkommen	braune Nachkommen	transgene Nachkommen
1	weiblich	100%	86	0	0	0
2	männlich	100%	86	60	47	20
3	männlich	100%	86	24	1	0
4	männlich	90%	86	16	2	2
5	männlich	60%	86	4	0	0
6	männlich	100%	86	8	0	0
7	weiblich	95%	86	9	0	0
8	männlich	80%	86	14	0	0

Tab.4.1: Beschreibung der erhaltenen Chimären aus der ersten Woche der Blastozysteninjektion

4.3.1.3.2 Überprüfung transgener Mäuse durch PCR-Analytik

Heterozygote $Cx39^{GFPneo/+}$ Tiere wurden mit deleter-Flp Mäusen (Rodriguez et al., 2000) verpaart, um die Deletion des Selektionsmarkers im Genom der Tiere zu erreichen. Die hieraus entstandenen Tiere werden als $Cx39^{GFP/+}$ bezeichnet. Gleichzeitig wurden heterozygote $Cx39^{GFPneo/+}$ Tiere untereinander verpaart, um die Auswirkungen der Deletion des $Cx39$ Gens in der Maus zu untersuchen. Die unterschiedlichen allelen Formen des $Cx39$ Locus werden durch PCR-Analyse unterschieden (Abb.4.33). In der $Cx39$ KO PCR (Abb.4.33A) entsteht bei Vorliegen des $Cx39$ WT Allels ein Amplikon von 670 bp, bei einem $Cx39^{GFPneo}$ Allel ein 870 bp Amplikon. Verwendet man die $Cx39$ KOdelneo PCR, wird ein Fragment von 670 bp für das $Cx39$ WT Allel amplifiziert, bei einem $Cx39^{GFP}$ Allel entsteht ein Amplikon von 450 bp. Zusätzlich entsteht bei Vorliegen eines $Cx39^{GFPneo}$ Allels ein Amplikon von 2,0 kb.

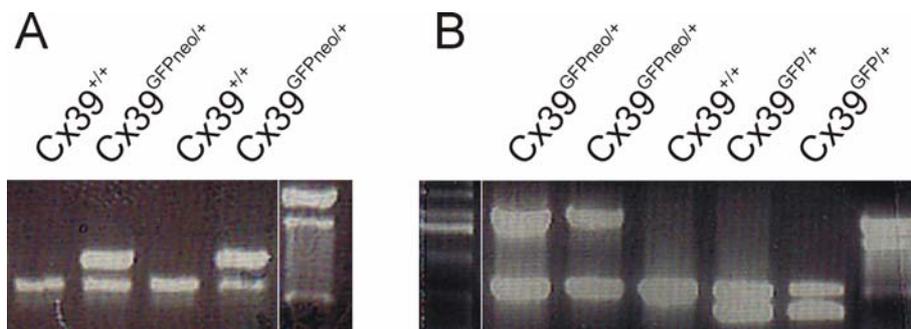


Abb. 4.33: PCR-Analytik transgener Mäuse

(A) Bei der $Cx39$ KO PCR entsteht bei Vorliegen des $Cx39$ WT Allels ein Amplikon von 670 bp, im Fall des $Cx39^{GFPneo}$ Allels ein Fragment von 870 bp. (B) Verwendet man die $Cx39$ KOdelneo PCR wird ein Amplikon von 670 bp für das $Cx39$ WT Allel amplifiziert, bei Vorhandenseins eines $Cx39^{GFP}$ Allels entsteht ein Amplikon von 450 bp. Das $Cx39^{GFPneo}$ Allel führt zur Amplifikation eines 2,0 kb großen Fragments.

4.3.1.4 Abwesenheit des Cx39 Proteins in Cx39^{GFPneo/GFPneo} Embryonen

Zum Nachweis der Abwesenheit des Cx39 Proteins in Cx39^{GFPneo/GFPneo} Embryonen wurden Immunfluoreszenz-Analysen der Interkostalmuskel von Embryonen an Tag 17.5 durchgeführt (Abb.4.31). Die Cx39 Defizienz konnte in den Cx39^{GFPneo/GFPneo} Embryonen durch Verwendung Cx39 spezifischer Antikörper bestätigt werden. In heterozygoten Geschwistertieren war das Cx39 im Interkostalmuskel nachweisbar.

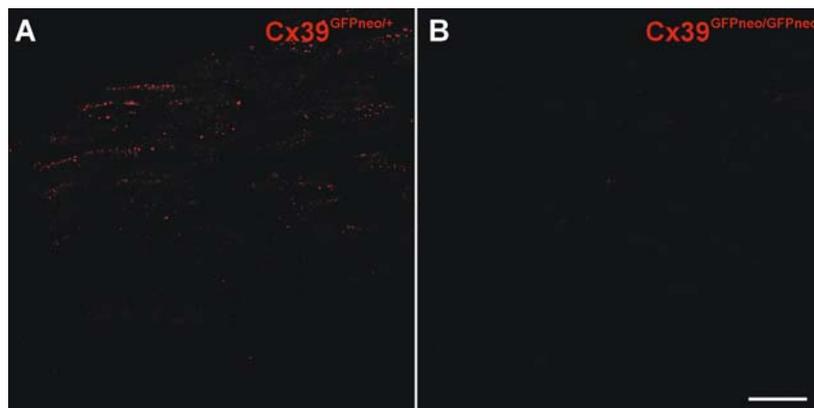


Abb.4.31: Expression des Cx39 Proteins an Tag 17.5 der Embryonalentwicklung in Cx39^{GFPneo/+} und Cx39^{GFPneo/GFPneo} Mäusen.

Durch Immunfluoreszenzanalyse Cx39 heterozygoter Tiere (A) konnte das Cx39 (rot) im Interkostalmuskel nachgewiesen werden. In Cx39 defizienten Tieren (B) war kein Nachweis des Cx39 möglich.

4.4 Erzeugung und Charakterisierung einer Cx45eGFP exprimierenden Mauslinie

Während der Embryogenese wie auch im adulten Tier wird Cx45 in vielen verschiedenen Organen und Zelltypen exprimiert. Die meisten hierzu durchgeführten Untersuchungen wurden mit Reportermäusen durchgeführt (Krüger et al., 2000; Maxeiner et al., 2003), da keine verlässlichen Antikörper gegen das Cx45 Protein vorhanden waren. Mit Hilfe der Cx45eGFP Mäuse sollte die Lokalisation des Cx45eGFP Fusionsproteins in verschiedenen Zelltypen untersucht werden. Hierzu wurden transgene Mäuse mit Hilfe der BAC-Technologie erzeugt, die das Gen für das Cx45eGFP Fusionsprotein unter Kontrolle des Gjc1 (Cx45) Promotors exprimieren.

4.4.1 Generierung und Aufreinigung des Cx45eGFP BACs

Für die Erzeugung des Cx45eGFP BACs, welcher die Sequenz für das Cx45eGFP Fusionsprotein unter Kontrolle des Cx45 Promotors trägt, wurde das System der homologen Rekombination in *E.coli* eingesetzt (Yang et al., 1997). Die homologe Rekombination verläuft in zwei Schritten, wobei es zuerst zu einer Integration des gesamten Shuttlevektors in den BAC kommt. Im zweiten Schritt wird ein Großteil des Shuttlevektors wieder entfernt, wodurch der Cx45eGFP BAC entsteht. Es gibt zwei Möglichkeiten der homologen Rekombination in Schritt 1 (Abb.4.32), die im Folgenden mit A und B bezeichnet werden.

Kommt es im ersten Schritt zu einer homologen Rekombination im Exon3 des Gjc1 Gens (Cx45), können mittels Restriktion mit *EcoRI* und anschließender Southern Blot Hybridisierung mit einer Sonde gegen Exon3 des Gjc1 Gens Fragmente der Größe 3,0 kb und 3,9 kb nachgewiesen werden. Bei einer homologen Rekombination im 3'UTR des Gjc1 Gens entstehen Fragmente mit einer Größe von 2,2 kb und 4,7 kb.

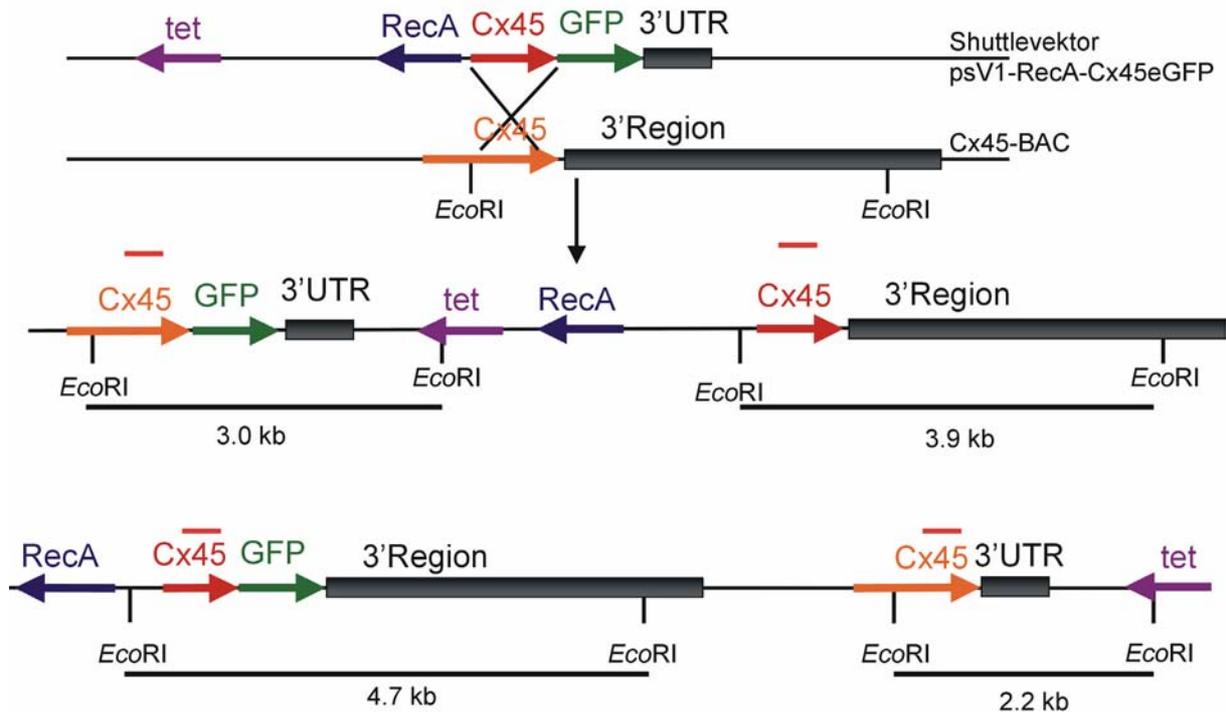


Abb.4.32: Schematische Darstellung der Möglichkeiten der homologen Rekombination zwischen dem Shuttlevektor pSV1-RecA-Cx45eGFP und dem Cx45-BAC im ersten Selektionsschritt.

Im zweiten Schritt der homologen Rekombination kommt es zu einer Rekombination innerhalb des DNS-Strangs, wobei mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% der Cx45eGFP-BAC oder der Cx45-BAC entstehen (Abb.4.33, Abb.4.34).

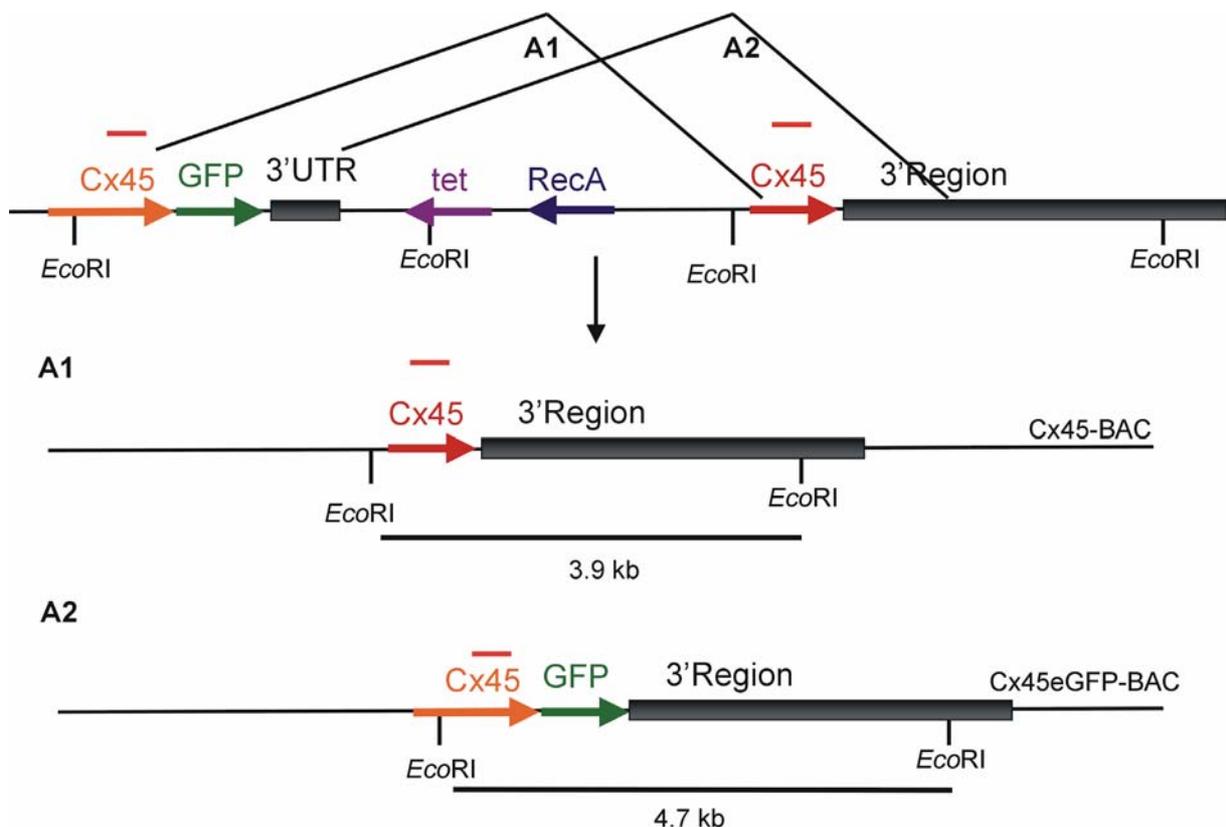


Abb.4.33: Schematische Darstellung der Möglichkeiten der homologen Rekombination im zweiten Selektionsschritt nach Möglichkeit A im ersten Schritt.

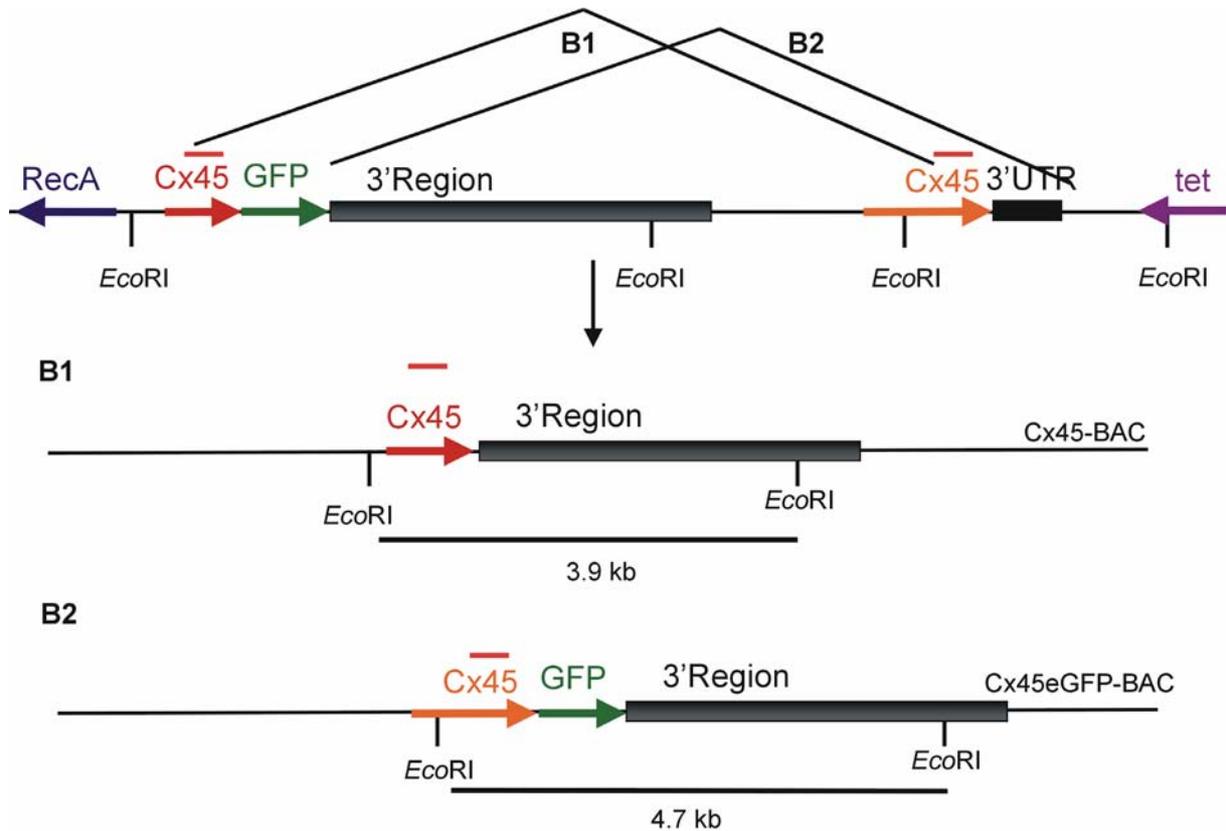


Abb.4.34: Schematische Darstellung der Möglichkeiten der homologen Rekombination im zweiten Selektionsschritt nach Möglichkeit B im ersten Schritt.

Die erfolgreiche homologe Rekombination in Schritt 1 und Schritt 2 wurde durch Southern Blot Hybridisierung mit einer Sonde aus Exon3 des Gjc1 Gens durchgeführt. In Schritt 1 sind die Klone 20 und 25 gezeigt, bei denen jeweils ein Fragment von 2,2 kb und 4,7 kb nach Restriktion mit *EcoRI* nachgewiesen werden konnte (Abb.4.35). Dies entspricht der homologen Rekombination nach Möglichkeit B. Für den zweiten Schritt der homologen Rekombination wurde der Klon 20 ausgewählt. Im zweiten Schritt der homologen Rekombination wurde bei den Klonen 14 und 16 nach Restriktion mit *EcoRI* das erwartete Fragment von 4,7 kb nachgewiesen (Abb.4.35). Eine weitere Restriktionsspaltung mit *HindIII* bestätigte das Ergebnis wie auch eine Hybridisierung mit einer Sonde aus dem eGFP Gen (Daten nicht gezeigt). Zur weiteren Überprüfung wurde der Bereich um das deletierte Stop-Codon des Cx45 Gens sequenziert (Daten nicht gezeigt).

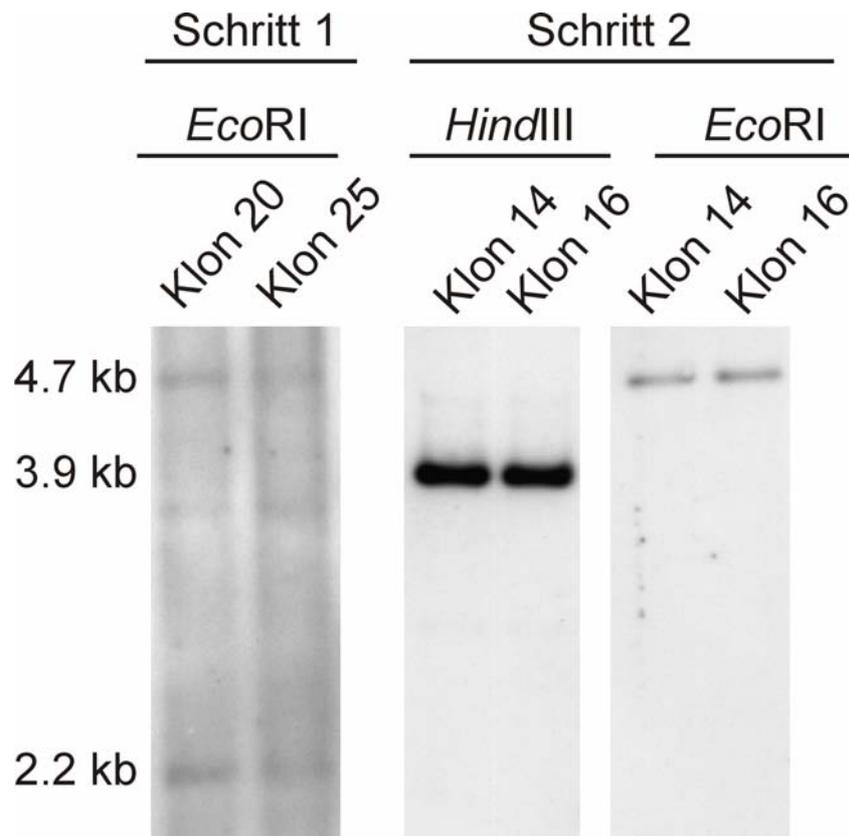


Abb.4.35: Southern-Blot Hybridisierung des durch homologe Rekombination entstandenen Cx45eGFP BACs sowie des Zwischenprodukts nach Schritt 1 Möglichkeit B. Die Hybridisierung wurde mit einer DIG-markierten Sonde aus Exon3 des Gjc1 Gens durchgeführt.

Zur Injektion des Cx45GFP-BACs in Mausoozyten (FVB/N x C57BL/6) wurde dieser aufgereinigt, mit PISceI linearisiert und erneut durch Southern Blot Hybridisierung überprüft (Abb.4.36).

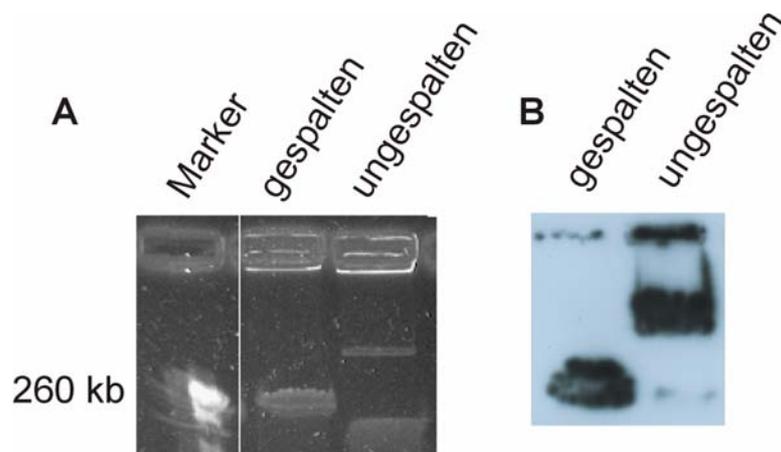


Abb.4.36: Gelelektrophoretische Auftrennung des Cx45GFP-BACs sowie Southern Blot Hybridisierung

A) Der Cx45eGFP-BAC wurde mit dem Enzym PISceI linearisiert und gelelektrophoretisch (Pulsfeld-Gelelektrophorese) aufgetrennt. B) Die Southern Blot Hybridisierung mit einer Sonde aus Exon3 des Gjc1 Gens zeigt den linearisierten Cx45eGFP BAC mit einer Größe von ca. 260 kb.

4.4.2 Erzeugung Cx45eGFP transgener Mäuse

Transgene Cx45eGFP Mäuse wurde durch Injektion des Cx45eGFP-BACs in Mausoozyten (FVB/N x C57/BL6) erzeugt. Von 50 erzeugten Tieren trugen 7 das Cx45GFP Transgen, welches über PCR-Analyse nachgewiesen wurde. Diese Tiere wurden als Begründer eigener Linien eingesetzt und ihre Nachkommen durch Southern Blot Hybridisierung sowie Immunoblot und Immunfluoreszenz-Analysen charakterisiert.

4.4.3 Charakterisierung und Vergleich der verschiedenen transgenen Linien

Anhand der Southern Blot Analysen *EcoRI* gespaltener DNS konnte gezeigt werden, dass die erhaltenen Tiere unterschiedlich viele Kopien des Cx45eGFP Transgens in ihr Genom integriert hatten (Abb.4.37A). So zeigen die Linien 18 und 20 eine einfache Integration, die Linie 43 dagegen eine mehrfache Integration des Cx45eGFP Transgens bei Vergleich der Bandenintensität des Cx45eGFP Transgens mit der des Cx45 WT Gens. Bei Linie 26 ist nur ein Fragment bei 3,0 kb nachweisbar, allerdings kein Fragment bei 3,9 kb.

Für die weiteren Analysen wurden die transgenen Linien L18 und L43 eingesetzt, da es sich um Linien mit einer unterschiedlichen Kopienanzahl des Cx45eGFP Transgens handelt. Die Linie 20 zeigte die gleiche Expression des Cx45eGFP Transgens wie die Linie 18 und wurde daher nicht weiter verwendet (Abb.4.38; Daten nicht gezeigt). Auf Transkriptebene wurde das Cx45eGFP Transgen mittels RT-PCR-Analyse (Abb.4.37B) in verschiedenen Organen in Tieren der transgenen Linien 18 und 43 nachgewiesen. In WT Tieren wurde ausschließlich das endogene Cx45 Transkript nachgewiesen.

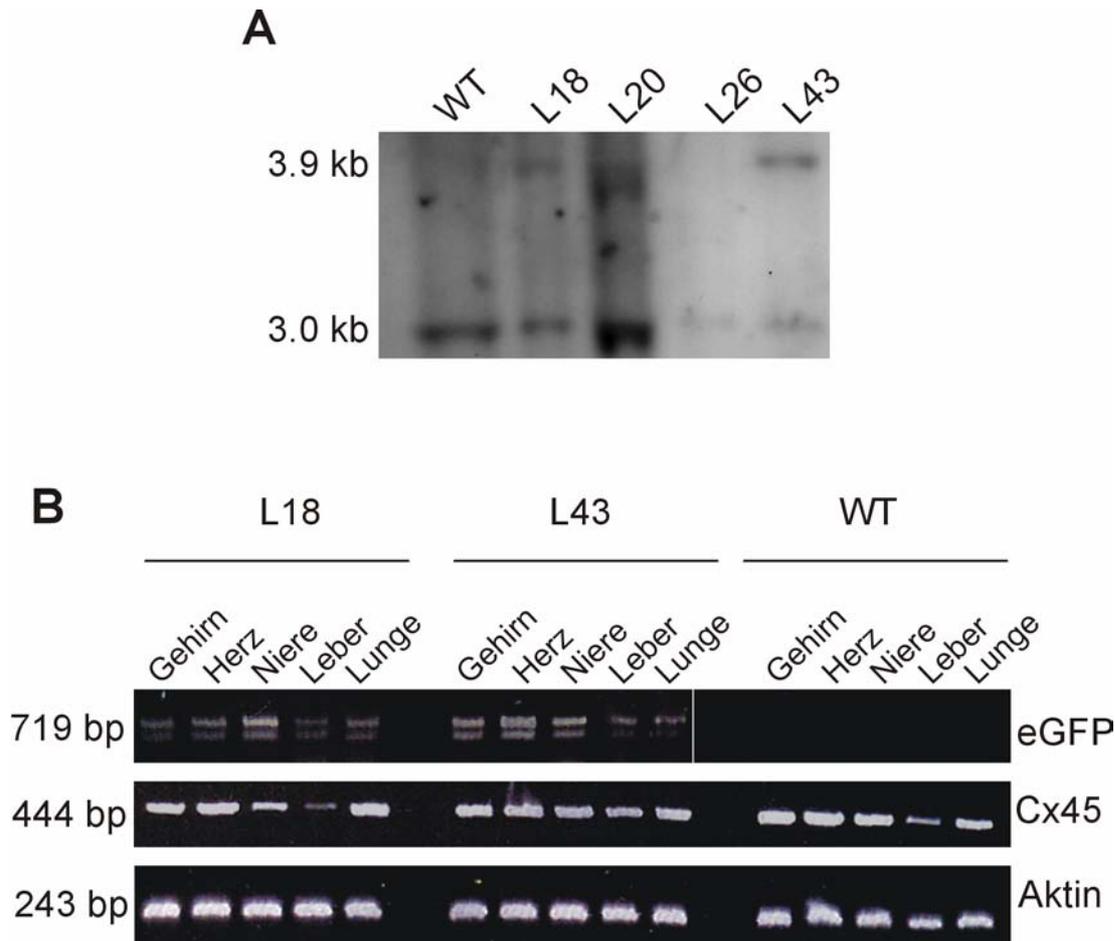


Abb.4.37: Nachweis des Cx45eGFP Transgens auf DNS- und RNS-Ebene

A) Southern-Blot Hybridisierung *EcoRI* geschnittener DNS verschiedener transgener Linien. Die Hybridisierungssignale liegen bei Verwendung einer Sonde aus dem Exon3 des *Gjc1* Gens bei 3,0 kb für das endogene Cx45 Allel und bei 3,9 kb für das Cx45eGFP Transgen. B) RT-PCR Analyse verschiedener Organe der transgenen Linien 18, 43 sowie aus WT Tieren. Durch Amplifikation des Transkripts für eGFP entsteht ein Fragment von 719 bp, für Cx45 ein Amplikon von 444 bp. Zur Überprüfung der Qualität der synthetisierten cDNS wurde eine PCR mit Primern für β -Aktin durchgeführt.

Die verschiedenen transgenen Linien wurden auch auf die Expression des Cx45eGFP Proteins im Herzen durch Immunoblot-Analysen untersucht (Abb.4.38A). Hierbei zeigte sich, dass die Nachkommen der Linien 18 und 20 die gleiche Expressionsstärke des Cx45eGFP Proteins im Vergleich zum Cx45 Protein aufwiesen. Tiere der Linie 43 zeigten eine wesentlich stärkere Bandenintensität entsprechend der mehrfachen Integration des Cx45GFP BACs in das Genom. Bei Linie 26 konnte kein Cx45eGFP Protein nachgewiesen werden, dies bestätigte die Southern Blot Ergebnisse (Abb.4.37A) sowie die Immunfluoreszenz-Analysen des adulten Herzens (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurden Nachkommen der Linie 43 auf die Expression des Cx45eGFP Proteins in verschiedenen Geweben untersucht. Bei einem Vergleich der Bandenintensität des Cx45eGFP Proteins mit der des

endogenen Cx45 Proteins stellte sich heraus, dass das Cx45eGFP Protein in den gleichen Organen wie das Cx45 Protein exprimiert wird (Abb.4.38B). Des Weiteren entspricht die Expressionsstärke des Cx45eGFP der des endogenen Cx45 Proteins bei einem Vergleich der verschiedenen Organe.

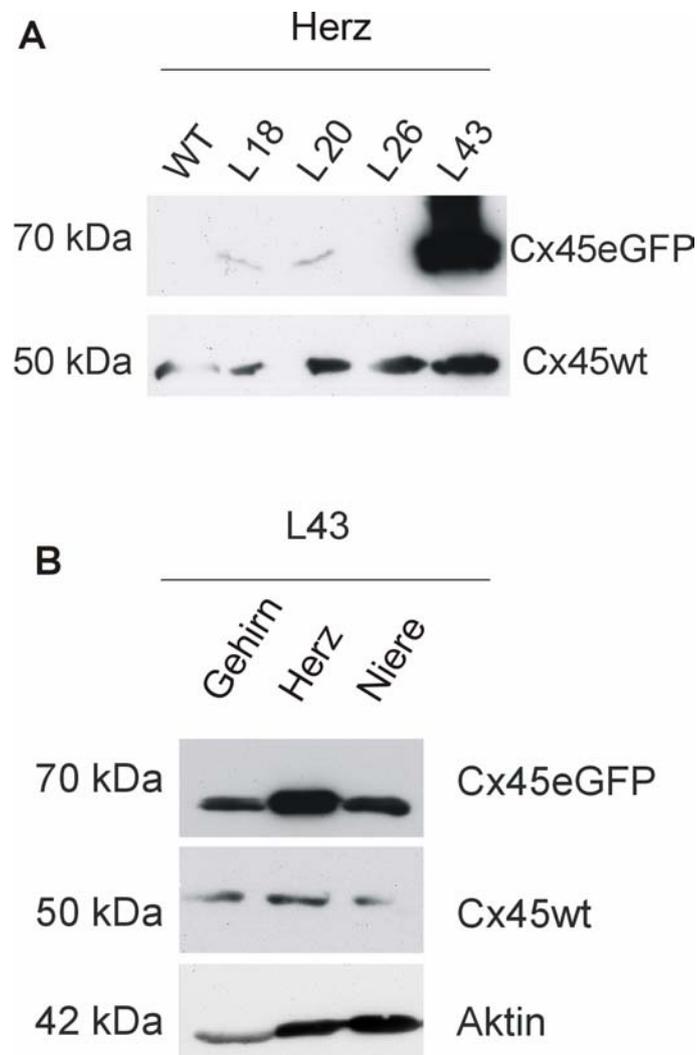


Abb.4.38: Expression des Cx45eGFP Fusionsproteins in verschiedenen Geweben
A) Vergleich der Expression des Cx45eGFP Proteins in Herzen der verschiedenen transgenen Linien. Das Cx45eGFP Protein wurde mit Antikörpern gegen eGFP nachgewiesen. B) Verschiedene Organe der Linie 43 wurden auf die Expression des Cx45eGFP Proteins wie auch des Cx45 Proteins hin untersucht. Die Inkubation mit gegen Aktin gerichteten Antikörpern diente dem Vergleich der eingesetzten Proteinmengen.

4.4.4 Kolokalisation des Cx45eGFP Proteins mit dem endogenen Cx45 Protein im adulten Herzen

Zur Überprüfung der Lokalisation des Cx45eGFP Fusionsproteins wurden Immunfluoreszenz-Analysen an Gefrierschnitten des adulten Herzens verschiedener transgener Linien durchgeführt (Abb.4.39). Die Fluoreszenz des Cx45eGFP konnte mit der gegen Cx45 gerichteten Immunfluoreszenz kolokalisiert werden (Abb.4.39C, F). Daher kann im Folgenden die Fluoreszenz des Cx45eGFP mit der Expression des endogenen Cx45 Proteins gleichgesetzt werden.

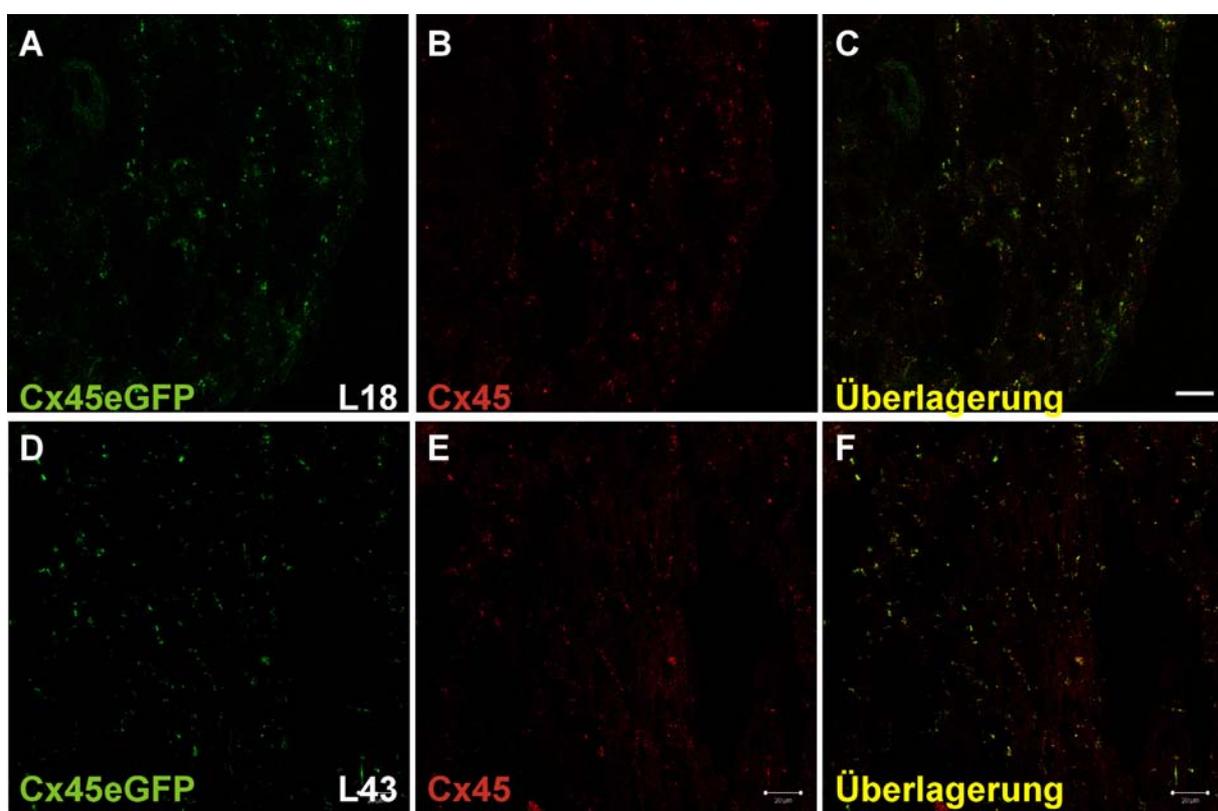


Abb.4.39: Expression des Cx45eGFP Proteins im Reizleitungssystem adulter transgener Mäuse
Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Analyse am Reizleitungssystem des Herzens adulter Mäuse der Linien 18 und 43 konnte die Cx45eGFP Fluoreszenz (grün) (A, D) mit der Immunfluoreszenz mit gegen Cx45 gerichteten Antikörpern (B, E) kolokalisiert werden (C, F). Die Identifikation des Reizleitungssystems erfolgte durch Acetylcholinesterase-Färbung von Konsekutivschnitten (nicht gezeigt). Maßstabsbalken: 20 μ m.

4.4.5 Die Expression des Cx45eGFP im adulten Herzen

Über die Expressionsorte des Cx45 Proteins im adulten Herzen gibt es widersprüchliche Befunde, v.a. über die Expression im Atrium sowie im Arbeitsmyokard (van Veen et al., 2001). Daher wurde die Expression des Cx45eGFP im adulten Herzen untersucht. Im Arbeitsmyokard konnte Cx45eGFP wie auch Cx43

(Coppen et al., 1999) nachgewiesen werden (Abb.4.40A), wo eine partielle Kolokalisation der beiden Proteine auftritt. Cx45eGFP wird ebenfalls in den Purkinje-Fasern exprimiert (Abb.4.40B) wie auch im Atrium (Abb.4.40C), auch im Atrium tritt eine partielle Kolokalisation mit Cx43 auf. Das Cx45eGFP Protein kolokalisiert im Sinus-Knoten partiell mit dem Cx30.2 Protein (Abb.4.40D).

Das Cx45eGFP Protein konnte im gesamten reizweiterleitenden System des Herzens nachgewiesen werden, welches durch Acetylcholinesterase-Färbung von Konsekutivschnitten identifiziert wurde (Daten nicht gezeigt).

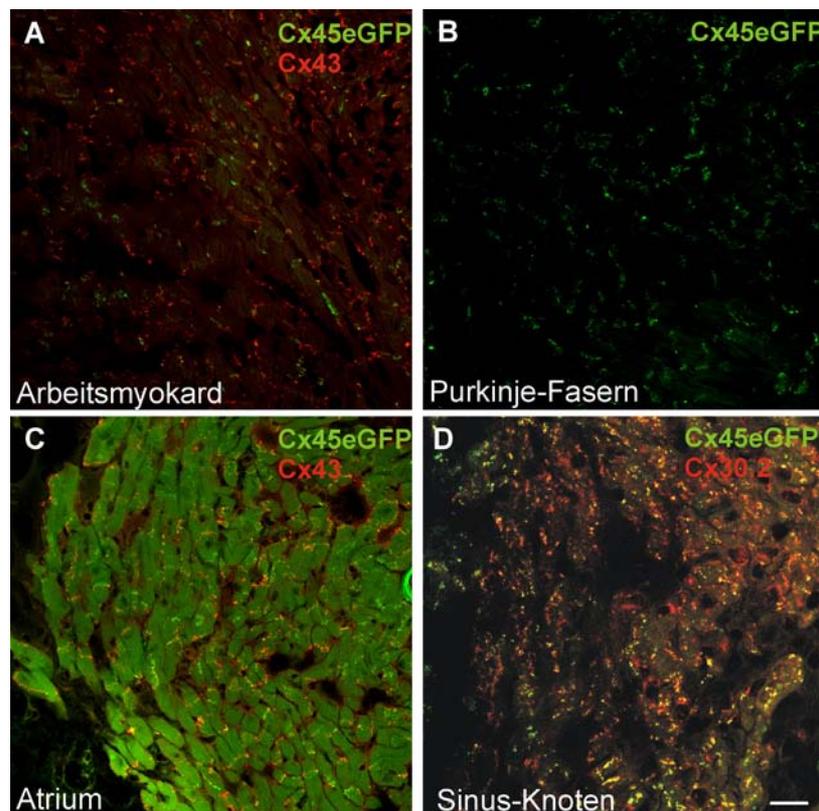


Abb.4.40: Expression des Cx45eGFP im adulten Herzen

Das Cx45eGFP Protein (grün) wurde im Arbeitsmyokard (A) wie auch im Atrium (C) partiell mit Cx43 (rot) kolokalisiert. Des Weiteren wurde das Cx45eGFP Protein in den Purkinje-Fasern (B) und im Sinus-Knoten (D) nachgewiesen. Im Sinus-Knoten tritt eine partielle Kolokalisation mit Cx30.2 (rot) auf. Maßstabsbalken: 20 μ m.

4.4.6 Kolokalisation des Cx45eGFP mit ZO-1

Für das Cx45 Protein wurde eine Bindung an ZO-1 (Zonula occludens) nachgewiesen (Laing et al., 2001). Diese Interaktion verläuft vermutlich über den C-Terminus des Cx45 Proteins. Im Fall des Cx45eGFP könnte diese Interaktion durch das eGFP Protein, welches am C-Terminus des Cx45 Proteins angehängt ist, gestört sein. Zur Untersuchung der Kolokalisation des Cx45eGFP mit ZO-1 wurden

Immunfluoreszenz-Analysen des Cerebellums und des Cerebrums durchgeführt. Eine partielle Kolokalisation des ZO-1 mit Cx45eGFP wurde in beiden Gehirnbereichen nachgewiesen (Abb.4.41).

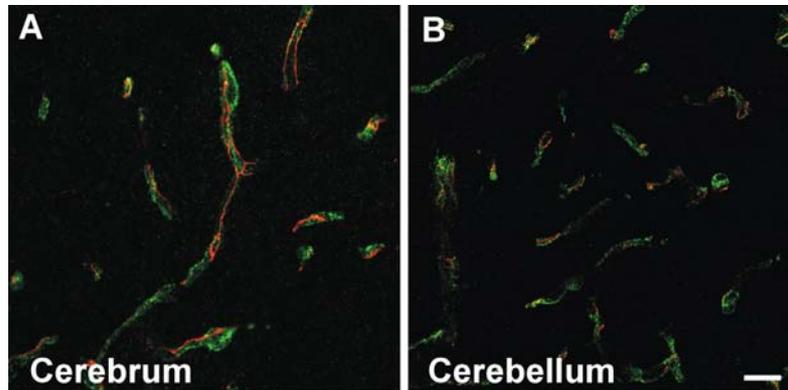


Abb.4.41: Kolokalisation des Cx45eGFP mit ZO-1
Das Cx45eGFP Protein (grün) kolokalisiert mit ZO-1 (rot) im Cerebrum (A) und Cerebellum (B) adulter transgener Cx45eGFP Mäuse. Maßstabsbalken: 20 μ m.

4.4.7 Expression des Cx45eGFP während der Embryonalentwicklung des Gehirns

Während der Embryogenese wird Cx45 im sich entwickelnden Gehirn stark exprimiert (Maxeiner et al., 2003). Es wurde die Expression des Cx45eGFP im Bereich der Ventrikel sowie im neonatalen Cortex untersucht. Das Cx45eGFP Protein wurde im Bereich der Ventrikel des Gehirns an Tag 16.5 der Embryonalentwicklung (Abb.4.42A) sowie an Ventrikeln neonataler Mäuse nachgewiesen (Abb.4.42B). Hier ließ sich Cx45eGFP in den gleichen Zellen detektieren, die auch S100 β , einen Marker für sich entwickelnde Neurone, exprimieren. Im Cortex neonataler Mäuse konnte die Expression des Cx45eGFP Fusionsproteins ebenfalls gezeigt werden (Abb.4.42C).

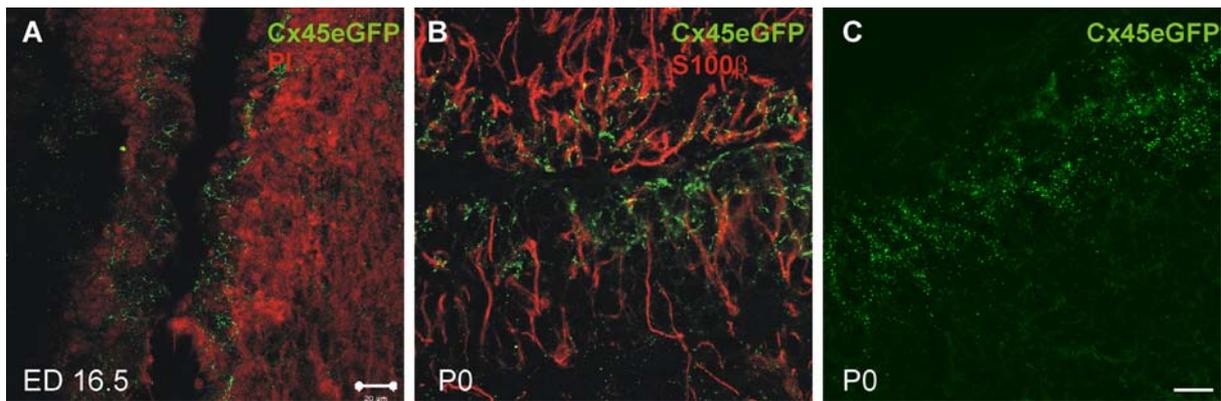


Abb.4.42: Expression des Cx45eGFP während im embryonalen und neonatalen Gehirn
 Das Cx45eGFP Protein (grün) wurde im Bereich der Ventrikel an ED16.5 (A) und an P0 in S100β-positiven Zellen (rot) (B) detektiert. Die Expression im neonatalen Cortex (C) konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Maßstabsbalken: 20 μm .

4.4.8 Expression des Cx45eGFP im Cerebellum adulter Mäuse

Bislang wurde die Untersuchung der Expression des Cx45 Gens im adulten Gehirn fast ausschließlich mit Reportergermäusen durchgeführt (Maxeiner et al., 2003). Die Lokalisation des Cx45eGFP Proteins im Cerebellum sollte untersucht werden. Das Cx45eGFP Protein wurde an Parvalbumin-positiven (Abb.4.43A) und Calbindin-positiven (Abb.4.43B) Interneuronen des Cerebellums detektiert. Es ließ sich keine Lokalisation in CamKII-positiven (Abb.4.43C) Zellen nachweisen. Des Weiteren ließ sich das Cx45eGFP Protein in der Nähe chemischer Synapsen nachweisen (Abb.4.43D), dies konnte durch Immunfluoreszenz-Analysen mit gegen SynapsinIII gerichteten Antikörpern nachgewiesen werden.

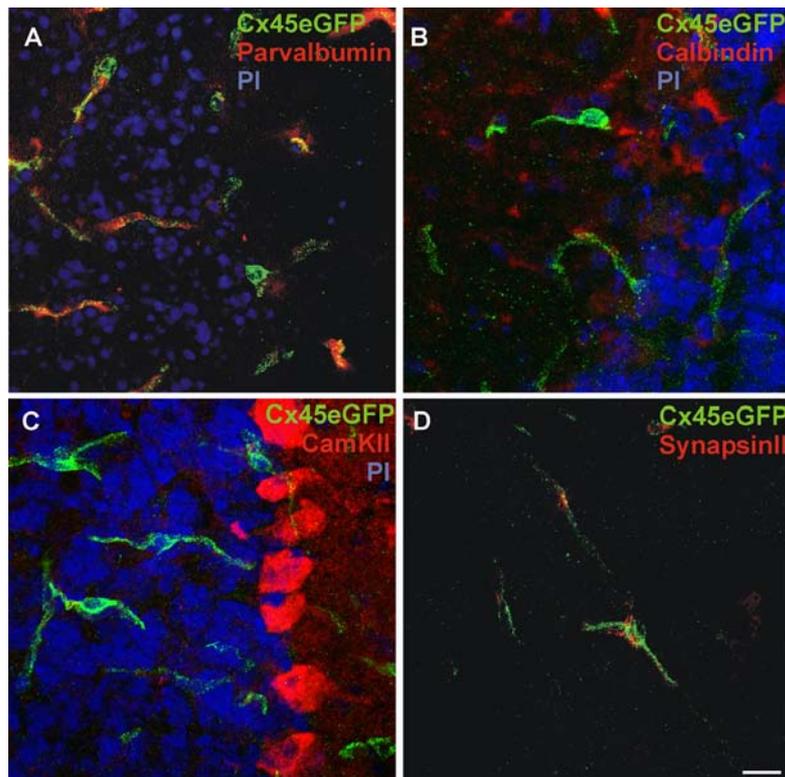


Abb. 4.43: Expression des Cx45eGFP im Cerebellum adulter transgener Mäuse
 Das Cx45eGFP Protein (grün) wurde an Parvalbumin-positiven (A, rot) Zellen der Granularzellschicht nachgewiesen. Die Lokalisation des Cx45eGFP Proteins in Calbindin-positiven (B, rot) sowie in CamKII-positiven (C, rot) Zellen wurde in diesem Gehirnbereich ausgeschlossen. Das Cx45eGFP Protein ist in der Nähe des Synapsenmarkers SynapsinII lokalisiert. Die Zellkerne wurden in A-C mit Propidiumiodid (blau) gegengefärbt. Maßstabsbalken: 20 μ m.

4.4.9 Expression des Cx45eGFP in der Subventrikularzone

Die Expression des Cx45eGFP in der Subventrikularzone des Cerebrums wurde durch Doppel-Immunfluoreszenz-Analysen mit verschiedenen Markerproteinen untersucht. Das Cx45eGFP wurde in Nestin-positiven (Abb.4.44A), S100 β -positiven (Abb.4.44B) sowie in GFAP-positiven Zellen (Abb.4.44C) nachgewiesen. Des Weiteren konnte Cx45eGFP mit Cx43 partiell kolokalisiert (Abb.4.44D) werden.

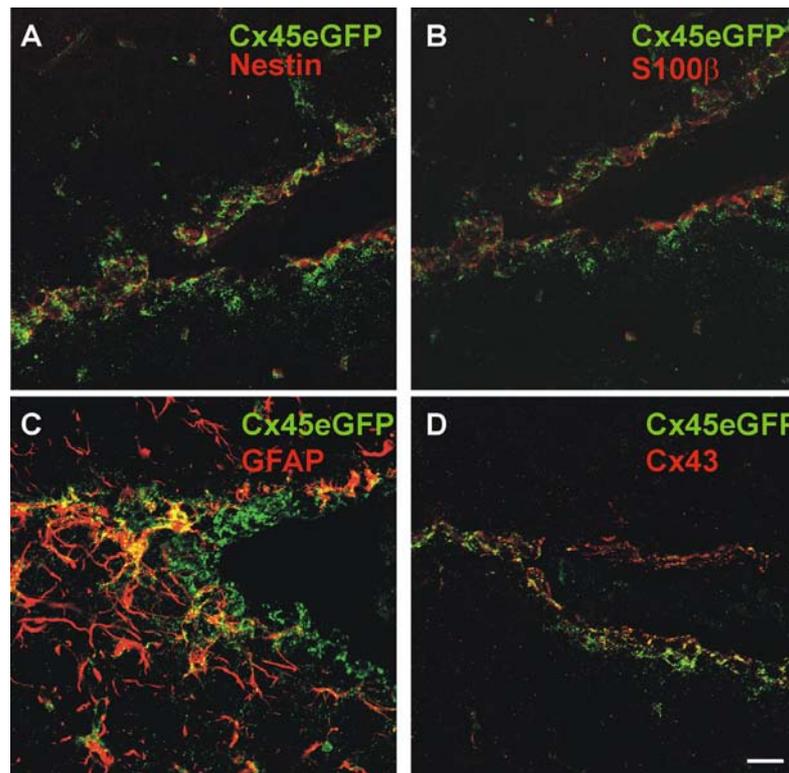


Abb.4.44: Expression des Cx45eGFP in der Subventrikularzone adulter Mäuse
Cx45eGFP (grün) wurde in Nestin-positiven (A, rot), S100 β -positiven (B, rot) sowie GFAP-positiven (C, rot) Zellen der Subventrikularzone nachgewiesen. Eine partielle Kolo­kalisierung mit Cx43 (D, rot) wurde ebenfalls gezeigt. Maßstabsbalken: 20 μ m.

4.4.10 Expression des Cx45eGFP in der Niere adulter Mäuse

Der Nachweis des Cx45 Proteins in der adulten Niere gestaltet sich aufgrund der schlechten Antikörper gegen Cx45 als schwierig. Daher wurden bislang die meisten Untersuchungen zur Expression des Cx45 mit Hilfe von Reporter­genmäusen durchgeführt (Krüger et al., 2000). Die Expressionsanalyse des Cx45eGFP Proteins in der adulten Niere sollte Aufschluss darüber geben, ob Cx45eGFP nur in den Glomeruli, den afferenten und efferenten Arteriolen sowie der Henle'schen Schleife oder auch im tubulären Epithel exprimiert wird. Das Cx45eGFP Protein konnte ausschließlich in den Glomeruli, den afferenten und efferenten Arteriolen sowie der Henle'schen Schleife nachgewiesen werden (Abb.4.45); eine Expression im tubulären Epithel konnte nicht gezeigt werden.

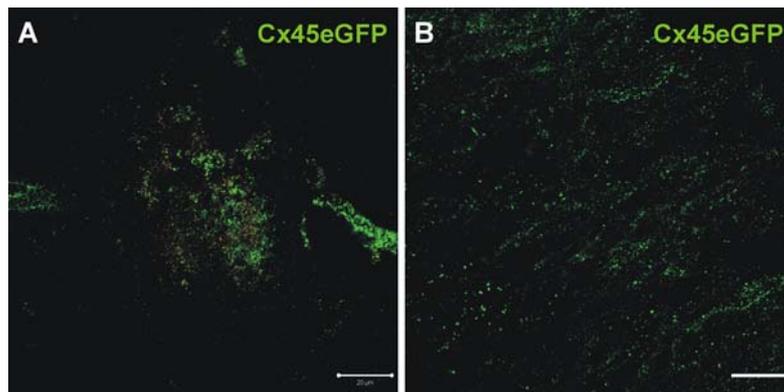


Abb.4.45: Expression des Cx45eGFP in der adulten Niere
Das Cx45eGFP Protein (grün) wurde im Glomerulus, den afferenten und efferenten Arteriole (A) sowie in der Henle'schen Schleife (B) nachgewiesen. Maßstabsbalken: 20 µm.

4.4.11 Expression des Cx45eGFP in der glatten Muskulatur adulter Mäuse

Zur weiteren Charakterisierung der Expression des Cx45eGFP wurden Gefrierschnitte der adulten Lunge auf die Expression des Cx45eGFP Fusionsproteins und seine Lokalisation untersucht. Das Cx45eGFP Protein konnte in der glatten Muskulatur der Bronchien (Abb.4.46A) detektiert werden. Ferner wurde eine partielle Kolokalisation mit Cx43 (Abb.4.46B) und Cx40 (Abb.4.46C) festgestellt.

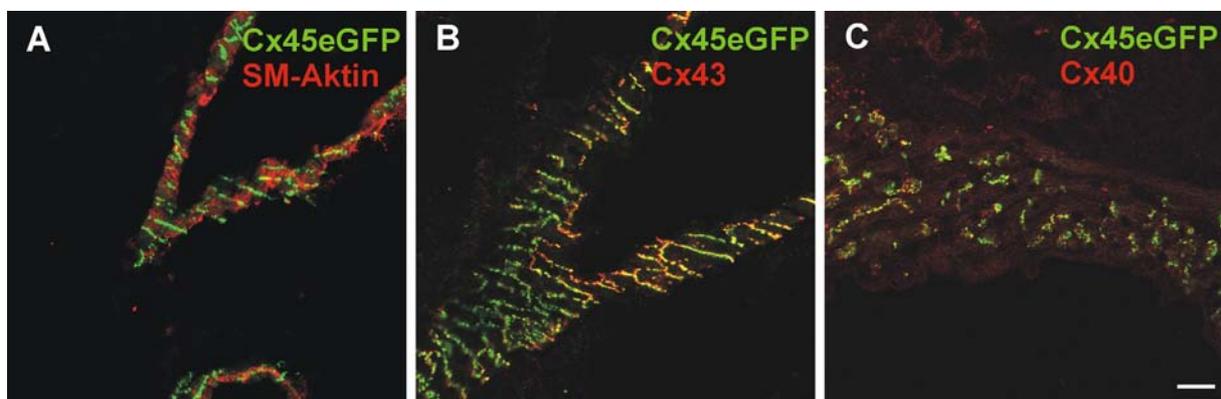


Abb.4.46: Expression des Cx45eGFP in der adulten Lunge
Das Cx45eGFP Fusionsprotein (grün) wurde in den Bronchien in SM-Aktin-positiven (A, rot) Zellen nachgewiesen. Des Weiteren kolokalisiert das Cx45eGFP partiell mit Cx43 (B, rot) und Cx40 (C, rot). Maßstabsbalken: 20 µm.

Durch Reporter-gen-Analysen ist bekannt, dass Cx45 in der glatten Muskulatur des Uterus und Darms adulter Tiere exprimiert wird (Döring et al., 2007). Allerdings konnte die Lokalisation des Proteins nicht gezeigt werden. Daher wurden Immunfluoreszenz-Analysen an Gefrierschnitten des Uterus und des Darms durchgeführt. Das Cx45eGFP Protein wurde in der glatten Muskulatur des Uterus und des Darms (Abb.4.47) nachgewiesen.

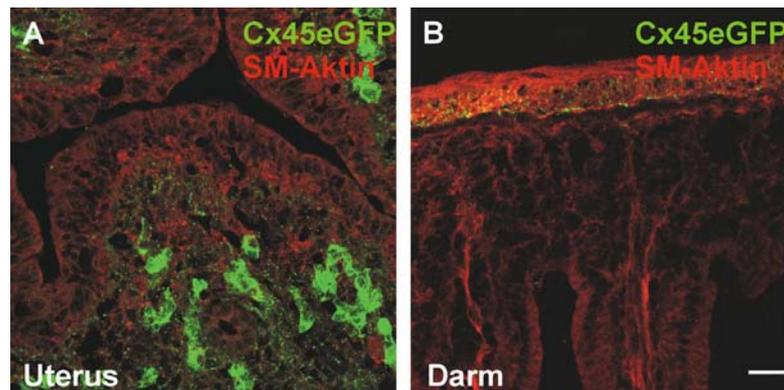


Abb.4.47: Expression des Cx45eGFP in der glatten Muskulatur
Das Cx45eGFP Fusionsprotein (grün) wurde in SM-Aktin positiven (rot) Zellen des Uterus (A) und des Darms (B) adulter Tiere nachgewiesen. Maßstabsbalken: 20 μ m.

4.4.12 Versuche zur Überwindung der embryonalen Letalität Cx45 defizienter Tiere durch das Cx45eGFP Transgen

Cx45 defiziente Tiere versterben an Tag 10.5 der Embryonalentwicklung aufgrund einer Fehlausbildung des Herzens (Krüger et al., 2000, Nishii et al., 2003). Die Funktionalität der durch Cx45eGFP gebildeten Gap Junction Kanäle sollte *in vivo* untersucht werden, indem Mäuse erzeugt werden sollten, die nur Cx45eGFP aber kein Cx45 mehr exprimieren. Hierzu wurden Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/+} Tiere mit Cx45^{lacZ/+} Tieren verpaart und die adulten Nachkommen genotypisiert (Abb.4.48; Tab.4.2). Es konnten sowohl bei Verwendung der transgenen Linie 18 wie auch bei Verwendung der Linie 43 keine Tiere erzeugt werden, die den Genotyp Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/lacZ} aufwiesen (Tab.4.2). Wurden allerdings Embryonen am Tag 10.5 der Embryonalentwicklung aus diesen Verpaarungen präpariert, war bei Linie 43 ein Tier mit dem Genotyp Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/lacZ} nachweisbar. Das Cx45eGFP Protein scheint das Cx45 Protein während der Embryonalentwicklung nicht funktionell ersetzen zu können.

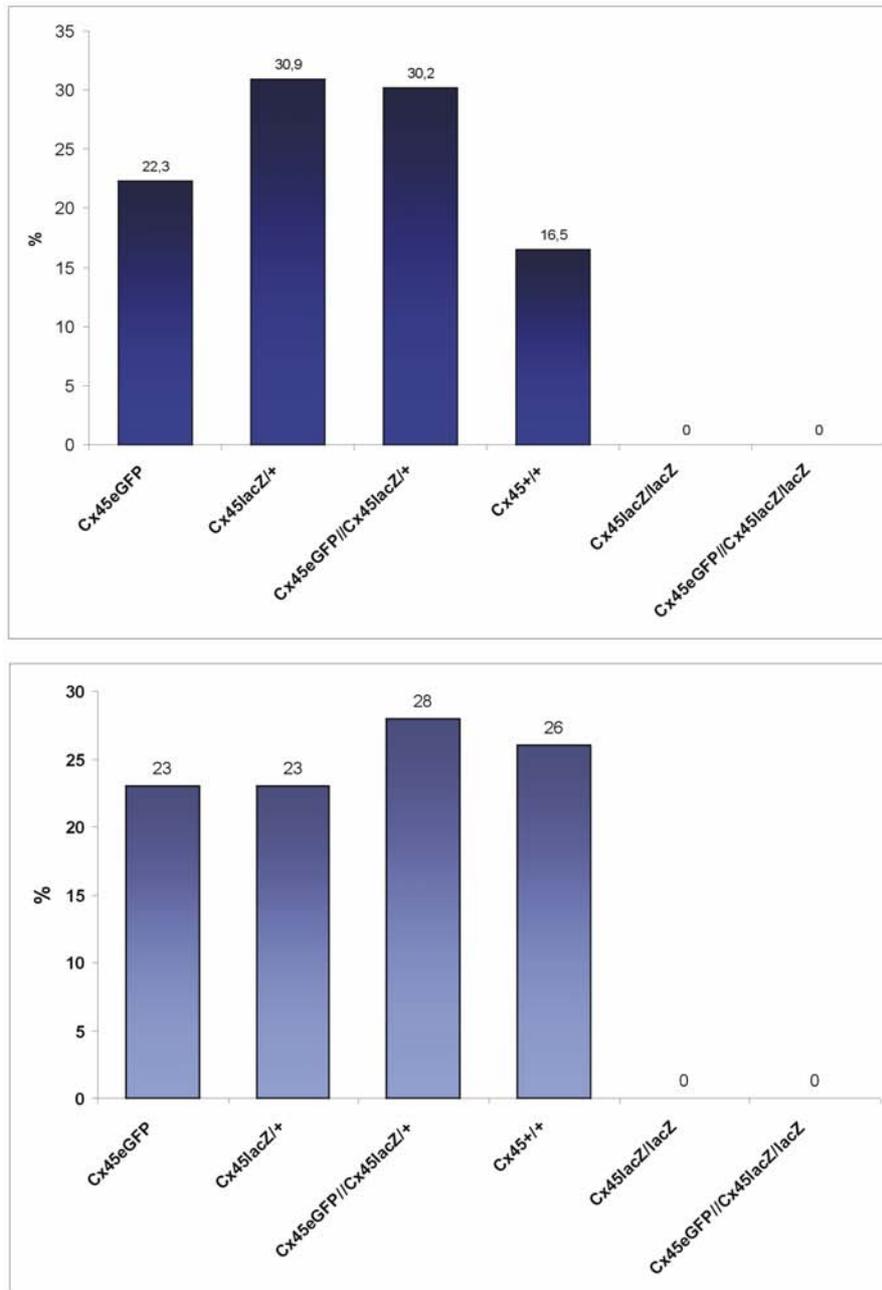


Abb.4.48: Verteilung der Genotypen nach Verpaarung von Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/+} Tieren mit Cx45^{lacZ/+} Tieren

Die obere Graphik zeigt die Verteilung der Genotypen bei Verwendung der transgenen Linie 18, die untere Graphik die Verteilung der Genotypen wenn die Linie 43 für die Verpaarungen eingesetzt wurde. In beiden Fällen konnten keine adulten Cx45^{lacZ/lacZ} sowie keine Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/lacZ} Tiere nachgewiesen werden.

	erwartet	Linie18 (n = 139)	Linie 43 (n = 100)
Cx45eGFP	12,5 %	22,3 %	23 %
Cx45 ^{lacZ/+}	25 %	30,9 %	23 %
Cx45eGFP//Cx45 ^{lacZ/+}	25 %	30,2 %	28 %
Cx45 ^{+/+}	12,5 %	16,5 %	26 %
Cx45 ^{lacZ/lacZ}	12,5 %	0 %	0 %
Cx45eGFP//Cx45 ^{lacZ/lacZ}	12,5 %	0 %	0 %

Tab.4.2: Verteilung der Genotypen nach Verpaarung von Cx45eGFP/Cx45^{lacZ/lacZ} Tieren mit Cx45^{lacZ/+} Tieren

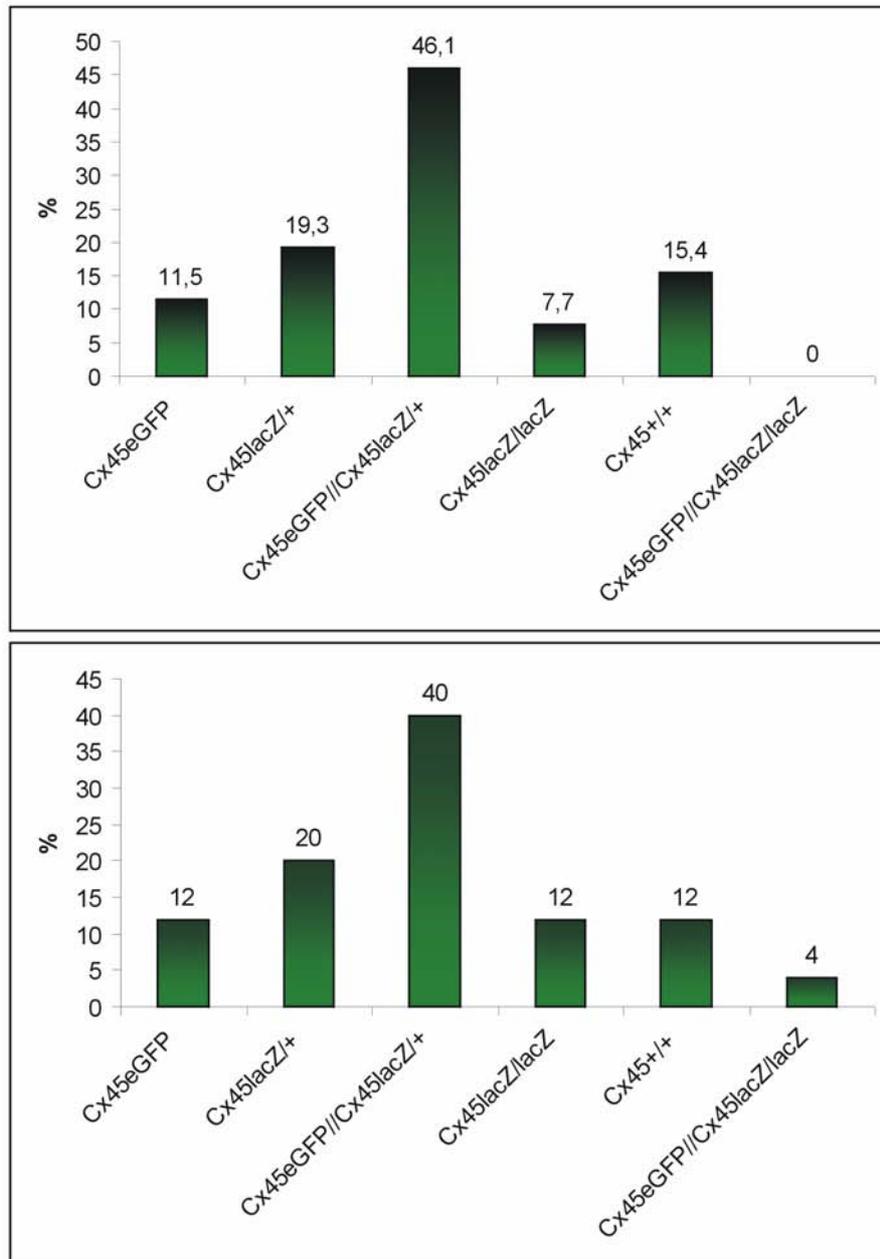


Abb.4.49: Verteilung der Genotypen nach Verpaarung von Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/+} Tieren mit Cx45^{lacZ/+} Tieren an Tag 10.5 der Embryonalentwicklung
 Die obere Graphik zeigt die Verteilung der Genotypen bei Verwendung der transgenen Linie 18, die untere Graphik die Verteilung der Genotypen wenn die Linie 43 für die Verpaarungen eingesetzt wurde. Nur bei Verwendung der Linie 43 konnte ein Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/lacZ} Tier nachgewiesen werden.

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Charakterisierung der Expression verschiedener Connexine während der Skelettmuskelentwicklung durchgeführt wozu eine Cx39 defiziente Mauslinie erzeugt wurde. Ferner wurde eine Cx45eGFP exprimierende Mauslinie generiert und charakterisiert.

5.1 Connexine während der Skelettmuskelentwicklung und –regeneration

5.1.1 Expression des Cx39 in primären und sekundären Myotuben

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, dass Cx39 während der Embryogenese auf mRNA und Proteinebene während der Embryogenese exprimiert wird (von Maltzahn, Diplomarbeit 2003). Die gegen Cx39 gerichteten Antikörper (von Maltzahn, Diplomarbeit 2003) wurden weiter charakterisiert, es wurde gezeigt, dass sie gegen den C-Terminus des Cx39 Proteins gerichtet sind (vgl. Abschnitt 4.1.1.1). Die stärksten Unterschiede zwischen den Connexinen befinden sich im C-Terminus (Saez et al., 2003), daher ist dieser Bereich zur Erzeugung spezifischer Antikörper besonders gut geeignet.

Der Expressionszeitraum des Cx39 wurde sowohl auf mRNA als auch Proteinebene bestimmt. Sowohl das Transkript wie auch das Cx39 Protein wurden in sich entwickelnden Skelettmuskeln des Embryos und neonatalen Mäusen nachgewiesen (vgl. Abschnitt 4.1.1.2). Postnatal (P7) ließ sich das Cx39 nicht mehr detektieren (Daten nicht gezeigt). Durch Immunfluoreszenz-Analysen wurde gezeigt, dass Cx39 ausschließlich in der Plasmamembran primärer und sekundärer Myotuben, nicht aber in Myoblasten exprimiert wird (vgl. Abschnitt 4.1.1.2). Eine Studie von Ling et al. hat bereits 1992 durch Elektronenmikroskopie Gap Junction Strukturen zwischen Myotuben der sich entwickelnden Skelettmuskeln, speziell dem embryonalen Zwerchfell der Ratte, nachgewiesen. Vermutlich werden diese Gap Junctions von Cx39 gebildet, da kein weiteres Connexin Protein zwischen Myotuben des neonatalen Zwerchfells nachgewiesen wurde (vgl. Abschnitt 4.1.1.3). Allerdings kann die Expression von Pannexinen zwischen Myotuben aufgrund des Fehlens spezifischer Antikörper nicht ausgeschlossen werden. Auch in der Ratte wurde das Cx39 Transkript in Myotuben des Rattenembryos durch *in situ* Hybridisierung nachgewiesen (Belluardo et al., 2005).

5.1.2 Eigenschaften der durch Cx39 gebildeten Gap Junction Kanäle

Zur Untersuchung der durch Cx39 gebildeten Gap Junction Kanäle wurden HeLa Zellen mit Cx39 cDNS stabil transfiziert und der Farbstofftransfer zwischen den Zellen untersucht (von Maltzahn, Diplomarbeit 2003). Es bilden sich zwar Gap Junction ähnliche Strukturen aus (vgl. Abschnitt 4.1.1.1), allerdings kann kein Farbstofftransfer beobachtet werden. Dies ändert sich auch nicht, wenn das Cx39 Protein in HeLa Zellen durch Zugabe von Heparin oder Staurosporin dephosphoryliert wird. Das Cx39 Protein weist putative Phosphorylierungsstellen für drei verschiedene Kinasen, die Caseinkinase II, die Proteinkinase C und die cAMP-abhängige Kinase, auf. Untersuchungen zum Phosphorylierungszustand des Cx39 in HeLa Zellen zeigten, dass eine starke Phosphorylierung vorliegt (vgl. Abschnitt 4.1.1.4). Die Öffnungswahrscheinlichkeit sowie die Eigenschaften der Gap Junction Kanäle werden durch Phosphorylierung stark beeinflusst (Saez et al., 2003; King und Lampe, 2005). Der Phosphorylierungszustand eines Connexins in HeLa Zellen kann sich von dem *in vivo* vorliegenden Zustand unterscheiden. Daher wurde der Farbstofftransfer zwischen Myotuben des neonatalen Zwerchfells untersucht (vgl. Abschnitt 4.1.1.3). Der Farbstofftransfer von Alexa488 (570 Da) bis zur zweiten Ordnung konnte zwischen Myotuben des neonatalen Zwerchfells nachgewiesen werden. Das Vorliegen von Zytoplasmabrücken wurde durch Injektionsexperimente mit Rhodamin-Dextran (10 kDa) ausgeschlossen. Des Weiteren wurde die Expression anderer Connexine durch RT-PCR und Immfluoreszenz-Analysen ausgeschlossen, so dass die gemessene Gap Junction Kopplung vermutlich auf Cx39 zurückzuführen ist.

Die unterschiedlichen Kanaleigenschaften der durch Cx39 gebildeten Gap Junction Kanäle in HeLa Zellen und im neonatalen Zwerchfell könnten auf eine unterschiedliche Phosphorylierung des Proteins zurückzuführen sein. Eine andere Möglichkeit wäre das Fehlen essentieller Interaktionspartner in HeLa Zellen. Eine weitere Regulation der Kanalpore erfolgt spannungsabhängig (van Veen et al., 2001) sowie in Abhängigkeit von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Peracchia et al., 2000), die in Myotuben im Vergleich zu anderen Zellen erhöht ist (Constantin et al., 1996).

Bislang wurde die elektrische Kopplung zwischen stabil transfizierten HeLa Zellen (Cx39) und Myotuben des neonatalen Zwerchfells nicht untersucht. Es ist daher nicht

unwahrscheinlich, dass Cx39 Gap Junction Kanäle eine elektrische Kopplung benachbarter Zellen ermöglichen.

5.1.3 Zeitliche Reihenfolge der Connexin-Expression während der Skelettmuskelentwicklung

Während der Entwicklung des Skelettmuskels wird Cx43 in Myoblasten exprimiert (von Maltzahn und Willecke, 2005). Zur Untersuchung der zeitlichen Reihenfolge der Expression während der Myogenese wurden C₂C₁₂ Zellen, eine etablierte myogene Zelllinie, differenziert und die Expression verschiedener Connexine untersucht.

Es zeigte sich, dass Cx43 – wie schon beschrieben (Araya et al., 2003) – in Myoblasten exprimiert wird, die maximale Expression konnte kurz vor der Fusion der Myoblasten nachgewiesen werden. Nach Differenzierung der Myoblasten zu Myotuben wird nur Cx39 exprimiert, es ist keine Expression des Cx43 mehr nachweisbar (vgl. Abschnitt 4.1.2.1). Diese Analysen wurden an Gefrierschnitten von Mausembryonen verschiedener Entwicklungsstadien bestätigt (vgl. Abschnitt 4.1.1.2). Das Cx43 Protein wurde nie in der gleichen Zelle wie das Cx39 Protein nachgewiesen. Es trat auch keine Kolokalisation des Cx43 mit Cx39 auf, was auf heteromere Kanäle schließen ließe.

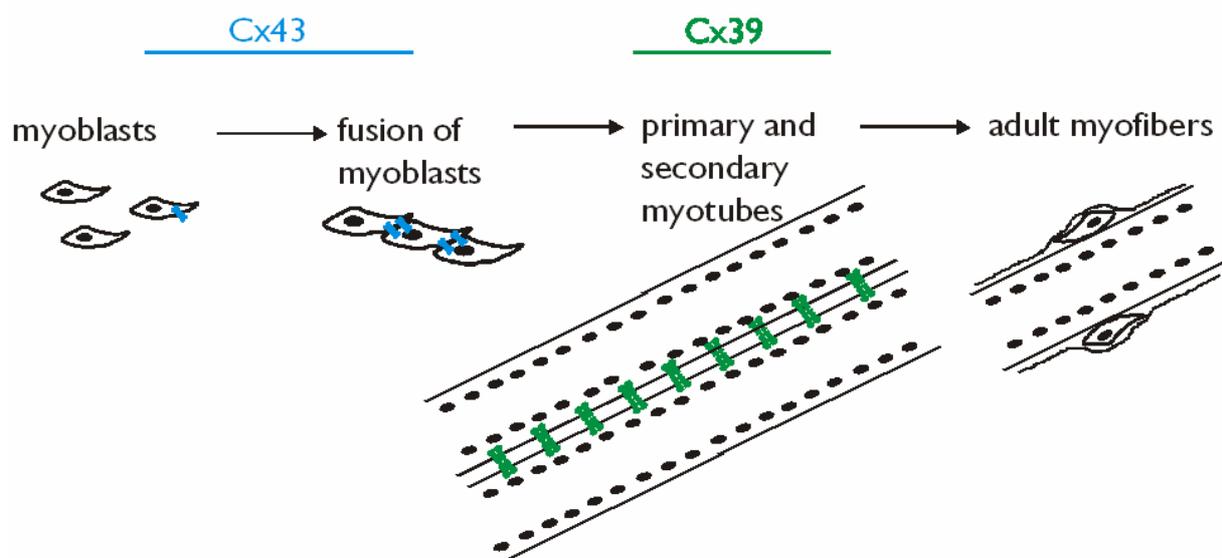


Abb.5.1: Zeitliche Reihenfolge der Expression der Connexine während der Myogenese (verändert nach von Maltzahn und Willecke, 2005)

Die Myoblasten werden durch den intrazellulären Austausch von Signalmolekülen kurz vor der Fusion synchronisiert (Constantin und Cronier, 2000). Dies entspricht dem Expressionsmaximum des Cx43. Kurz nach der Synchronisation der Myoblasten kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Seigneurin-Venin et al., 1996). Für viele Reaktionen, die mit der Fusion der Myoblasten einhergehen wie Oberflächeninteraktionen oder Protease-Aktivitäten (z.B. Calpaine), ist Ca^{2+} von entscheidender Bedeutung (von Maltzahn und Willecke, 2005). Es kommt zur Spaltung der Proteine der extrazellulären Matrix und des Zytoskeletts wie Fibronektin oder Desmin (Dedieu et al., 2002; Dourdin et al., 1999) und anschließender Fusion der Myoblasten. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma bleibt auch in den neu gebildeten Myotuben erhalten (Constantin et al., 1996). Die Kommunikation über Gap Junctions vermittelt vermutlich den Austausch sekundärer Botenstoffe wie cAMP, Ca^{2+} oder IP_3 zwischen den Myoblasten und Myotuben, wodurch wahrscheinlich eine Synchronisierung der Zellen erfolgt. Die konsekutive Expression des Cx43 und Cx39 lässt vermuten, dass unterschiedliche Kanaleigenschaften für die Ausbildung des funktionellen Synzytiums notwendig sind. Eine Hypothese zur Funktion der Gap Junctions während der Myogenese könnte eine Beteiligung am Austausch von IP_3 zwischen den Myoblasten kurz vor der Fusion sein (Abb.5.2). Durch den Austausch von IP_3 zwischen den Myoblasten kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Freisetzung des Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum. Durch die nun erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird über Aktivierung Muskel-spezifischer Transkriptionsfaktoren wie Myogenin oder Myf5 die Fusion der Myoblasten ausgelöst (Constantin und Cronier, 2000). Die für die koordinierte Differenzierung erforderliche interzelluläre Weiterleitung der Ca^{2+} -Wellen geht vermutlich von ATP-sensitiven Zellen aus (Araya et al., 2004). Diese Zellen besitzen ATP-abhängige P2X Kanäle, durch die Ca^{2+} in die Zellen einströmen kann. Durch die nun erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase C und somit zur Erhöhung der intrazellulären IP_3 -Konzentration. Das IP_3 wird nun über Gap Junction Kanäle an benachbarte Zellen weitergegeben, in denen es zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Freisetzung des Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum und somit zur Differenzierung führt. Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Myotuben-Bildung und Reifung zeigt sich auch in der Abhängigkeit von NFATC („Nuclear Factor of T-cell family), einer Familie Ca^{2+} - und Calmodulin-abhängiger

Transkriptionsfaktoren (Horsley und Pavlath, 2004). Mäuse mit einer Deletion des NFATC2 Gens zeigen beispielsweise einen verkleinerten Soleus Muskel bedingt durch Defekte während des Muskelwachstums (Horsley et al., 2001).

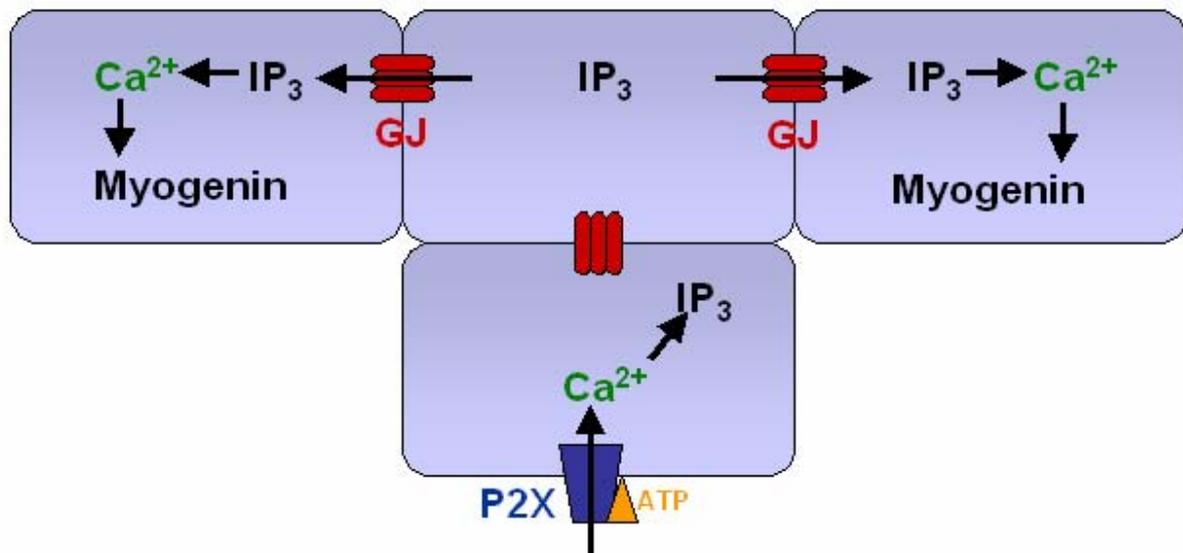


Abb.5.2: Mögliche Funktion der Gap Junctions (GJ) während der Fusion der Myoblasten (verändert nach Araya et al., 2004).

Nach der Geburt ist die Trennung der primären und sekundären Myotuben fast vollständig abgeschlossen, die Muskelfasern werden von der Basallamina umgeben (Wigmore und Dunglison, 1998). Diese zeitliche Reihenfolge entspricht ungefähr dem Expressionszeitraum der durch Cx39 gebildeten Gap Junction Kanäle. Während der Entwicklung der Maus werden zwei Phasen der Myogenese unterschieden. Zwischen Tag 11.5 und Tag 14.5 der Embryogenese bilden sich die primären Myotuben aus, während nach Tag 15.5 der Embryogenese bis zur Geburt die Differenzierung der sekundären Myoblasten zu den sekundären Myotuben stattfindet (Wigmore und Dunglison, 1998). Dies spricht für eine Funktion des Cx39 bei der homologen Gap Junction Kopplung zwischen primären Myotuben sowie bei der heterologen Kopplung zwischen primären und sekundären Myotuben.

Die zeitliche Reihenfolge der Expression der Connexine ist für die Muskelentwicklung von entscheidender Bedeutung wie die Studie von Reinecke et al. (2004) gezeigt hat. Erfolgt eine Überexpression des Cx43 zum Zeitpunkt der Fusion der Myoblasten unter Kontrolle eines viralen Promotors, versterben diese. Erfolgt die Überexpression

allerdings erst nach der Fusion der Myoblasten durch Verwendung des MCK-Promotors, überleben die Zellen. Dies konnte auch *in vivo* an Cx43^{tetOeGFP}:MCKtTA Mäusen gezeigt werden (Wulf, Diplomarbeit 2005), die keine auffälligen Veränderungen in der Muskelentwicklung und Muskeltextur zeigen. Die Ergebnisse von Reinecke et al. (2004) stehen im Gegensatz zu Analysen von Suzuki et al. (2001) und Gorbe et al. (2007), die nach Transfektion der Myoblasten mit Cx43 cDNS eine schnellere Fusion der Myoblasten und eine bessere funktionelle Kopplung der Myoblasten über Gap Junctions beschreiben.

Im Unterschied zu den Befunden von Dahl et al. (1995), die die Expression des Cx40 Transkripts durch *in situ* Hybridisierungsexperimente in Myoblasten des Mausembryos beschreiben, konnte kein Cx40 Transkript in C₂C₁₂ Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 4.1.2.1). Auch Immunoblot-Analysen konnten die Expression des Cx40 Proteins in Myoblasten nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt), so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Resultate von Dahl et al. (1995) durch unspezifische Bindungen der Sonde entstanden sind. Des Weiteren waren nur geringe mRNS Mengen von Cx45 sowie von Panx1 in C₂C₁₂ Zellen nachweisbar. Da für die Analysen der Cx45 Expression keine Intron-überspannenden Primer eingesetzt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass geringe Kontaminationen mit genomischer DNS zur Amplifikation der Fragmente geführt haben. Eine Amplifikation genomischer DNS kann bei den Analysen der Expression des Panx1 ausgeschlossen werden, da hier Intron-überspannende Primer eingesetzt wurden. Analysen zur Expression des Panx1 auf Proteinebene konnten aufgrund des Fehlens spezifischer Antikörper gegen Panx1 nicht durchgeführt werden.

5.1.4 Herunterregulation der Expression des Cx43 in C₂C₁₂ Zellen durch spezifische siRNS

Die Bedeutung der Expression des Cx43 während der Muskelentwicklung wurde in C₂C₁₂ Zellen durch Verwendung verschiedener Gap Junction Blocker und gegen Cx43 gerichteter siRNS weiter untersucht (vgl. Abschnitt 4.1.2.2). Sowohl bei Verwendung der Gap Junction Blocker Carbenoxolon und Glycyrrhetinsäure wie auch bei Herunterregulation der Cx43 Expression durch spezifische siRNS trat keine

Fusion der Myoblasten mehr auf. Weiterhin konnten keine Unterschiede bei Verwendung der siRNS im Vergleich zum Einsatz der Gap Junction Blocker festgestellt werden.

Mit diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die Gap Junction vermittelte Kopplung zwischen den Myoblasten für den Fusionsprozess essentiell ist. Hierdurch kommt es vermutlich zu einer Synchronisierung der Myoblasten sowie zu einem Austausch sekundärer Botenstoffe wie IP_3 und Ca^{2+} , die den Fusionsprozess einleiten (Constantin und Cronier, 2000; von Maltzahn und Willecke, 2005). In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass bei Verwendung verschiedener Gap Junction Blocker (Heptanol, Glycyrrhetinsäure) die Fusion der Myoblasten in Zellkultur (L6 Myoblasten, C₂C₁₂ Zellen) inhibiert wird (Constantin et al., 1997; Araya et al., 2003). Allerdings kann durch die Verwendung der Gap Junction Blocker als unspezifischer Nebeneffekt Apoptose ausgelöst werden (Wörsdörfer et al., 2008), auch andere Nebeneffekte wurden bei der Verwendung der Gap Junction Blocker beobachtet (Takeda et al., 2005; Rouach et al., 2003). Auch hier käme es nicht zur Ausbildung der Myotuben als Folge der Fusion der Myoblasten. Des Weiteren wird in Myoblasten auch Panx1 mRNA exprimiert. Ob auch das Panx1 Protein in diesen Zellen gebildet wird, ist aufgrund des Fehlens spezifischer Antikörper nicht bekannt. Durch die Gap Junction Blocker werden auch Pannexin Kanäle, Hemi- oder Vollkanäle inhibiert (Locovei et al., 2006). Durch Verwendung der spezifischen siRNS konnte jetzt allerdings gezeigt werden, dass die durch Cx43 gebildeten Gap Junction Kanäle für die Fusion der Myoblasten in Zellkultur essentiell sind. *In vivo* scheint eine Deletion des Gja1 Gens (Cx43) nicht zu einer Verhinderung der Myotuben-Bildung zu führen. Mäuse mit einer Deletion des Cx43 Gens versterben nach der Geburt aufgrund einer Herzdefekts (Reaume et al., 1995). Die Muskeln weisen allerdings keine apparenten Veränderungen auf, so dass von einer zumindest partiellen Kompensation durch andere Connexine ausgegangen werden muss.

5.1.5 Untersuchungen zur Redundanz der Connexine während der Muskelregeneration

Zur Untersuchung der funktionellen Redundanz der Connexine während der Muskelregeneration wurden Cx43^{Cx26/Cx26} (Winterhager et al., 2007) und Cx43^{Cx32/Cx32}

(Plum et al., 2000) Mäuse eingesetzt. Die kodierende Region des Gja1 Gens (Cx43) ist hier auf beiden Allelen durch die cDNS Sequenz des Cx26 bzw. Cx32 ersetzt. Ein Vergleich der Histologie des Tibialis anterior Muskels ließ keine signifikanten Unterschiede der Muskeln der Cx43^{Cx26/Cx26} bzw. Cx43^{Cx32/Cx32} Mäuse im Vergleich zu heterozygoten oder WT Geschwistertieren erkennen (vgl. Abschnitt 4.1.4.1). Bei Betrachtung des Verlaufs der Muskelregeneration zeigten sich allerdings Unterschiede zwischen den Cx43^{Cx26/Cx26} bzw. Cx43^{Cx32/Cx32} Tieren und ihren heterozygoten Kontrolltieren (vgl. Abschnitt 4.1.4.2). Durch die Injektion von BaCl₂ in den Tibialis anterior Muskel wird eine lokale Zerstörung des Muskels ausgelöst. Beide transgene Linien zeigten eine beschleunigte Muskelregeneration nach Injektion von BaCl₂. In Wildtyp Tieren wurde die stärkste Expression des Cx43 zwischen Tag 5 und 7 des Regenerationsprozesses nachgewiesen (Araya et al., 2005). In den Cx43^{Cx26/Cx26} und Cx43^{Cx32/Cx32} Tieren hingegen liegt das Expressionsmaximum des Cx26 bzw. Cx32 zwischen Tag 3 und Tag 5, während beide Connexine in Wildtyp Tieren während des Regenerationsprozesses des Muskels nicht exprimiert werden. Auch unterscheidet sich der Zeitpunkt des Expressionsmaximums des Markerproteins Myogenin, es liegt hier zwischen Tag 3 und Tag 5, bei Wildtyp Tieren hingegen an Tag 5. Diese Resultate unterscheiden sich von den Ergebnissen von Araya et al., (2005). Bei einem Verlust der Expression des Cx43 durch Verwendung induzierter Cx43^{fl/fl}:Mx-Cre Mäuse wurde die Expression des Myogenin bis zu Tag 14 des Regenerationsprozesses nachgewiesen. Der Ersatz des Cx43 durch Cx26 bzw. Cx32 scheint also zu einer beschleunigten Regeneration des Skelettmuskels zu führen. Hierfür könnten zum einen die unterschiedlichen elektrophysiologischen und metabolischen Eigenschaften der durch die verschiedenen Connexine gebildeten Gap Junction Kanäle verantwortlich sein, zum anderen unterschiedliche Transportwege. Für Cx43 wurde eine Oligomerisierung im trans-Golgi Netzwerk beschrieben, während Cx32 bereits im endoplasmatischen Retikulum zu Halbkanälen oligomerisiert (Koval, 2006; Saez et al., 2003). Durch die bereits im endoplasmatischen Retikulum stattfindende Oligomerisierung könnte es zu einer zeitlich früheren Ausbildung der Gap Junction Kanäle in der Membran und damit zu einem früheren Austausch sekundärer Botenstoffe zwischen den aktivierten Satellitenzellen und den verletzten Muskelfasern kommen.

Die durch Cx43 bzw. Cx26 und Cx32 gebildeten Gap Junction Kanäle unterscheiden sich auch in ihrer Permeabilität für IP_3 . Messungen an transfizierten HeLa Zellen haben gezeigt, dass Cx26 und Cx32 Gap Junction Kanäle wesentlich permeabler für IP_3 sind als Cx43 Gap Junction Kanäle (Niessen et al., 2000). Durch die erhöhte Permeabilität für IP_3 in Satellitenzellen der Cx43^{Cx26/Cx26} bzw. Cx43^{Cx32/Cx32} Mäuse könnte es zu einer beschleunigten Weiterleitung des IP_3 zwischen den Satellitenzellen und auch den daraus entstehenden myogenen Zellen kommen. Die dadurch schneller erhöhte intrazelluläre IP_3 -Konzentration könnte über Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum zur beschleunigten Aktivierung der Transkription von Myogenin und anderen Transkriptionsfaktoren führen, die den Prozess der Muskelregeneration antreiben. Sind die Zellen hingegen defizient für Cx43, kommt es zu einer verlangsamten Regeneration des Skelettmuskels (Araya et al., 2005). Hier könnten die auch hier vorhandenen ATP-abhängigen P2X-Kanäle eine Ca^{2+} -Weiterleitung zwischen den Zellen bewirken, durch den es zu einer Aktivierung der Phospholipase δ und somit zur Erhöhung der intrazellulären IP_3 -Konzentration kommt, wodurch die Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum erfolgen könnte.

5.2 Transplantation Cx43 exprimierender Skelettmuskelzellen in das adulte Mausherz

Während einer Ischämie im adulten Herzen kommt es zum Absterben der Zellen und in der Folge zu einer Narbenbildung. Durch die Narbenbildung kann es zu Herzrhythmus-Störungen kommen, da das vernarbte Gewebe nicht an der Kontraktion des Herzens beteiligt ist (Laflamme und Murry, 2005).

Die Transplantation verschiedener Zelltypen stellt hierbei einen möglichen Therapieansatz dar, da reife Kardiomyozyten terminal differenziert sind und nur zu einem sehr geringen Maß wieder in den Zellzyklus eintreten (Soonpaa und Field, 1998). Myoblasten eignen sich für die Transplantation, da der Skelettmuskel gegenüber einer Ischämie resistenter als der Herzmuskel ist (Wolff und Stiller, 1993) und sich aus den Myoblasten wieder Satellitenzellen bilden können, die eine Stammzellpopulation für zukünftige Selbsterneuerung darstellen (Murry et al., 1996). Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Skelettmuskelzellen zur Transplantation besteht in der Möglichkeit der Isolierung von Satellitenzellen aus Muskelbiopsien des

Spencers und somit zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen. Die Zellen des Myokards sind über Gap Junction Kanäle (Cx43) elektrisch miteinander gekoppelt, wodurch eine koordinierte mechanische Aktivität im Myokard gewährleistet wird (Coppen et al., 1999). Die transplantierten Myoblasten exprimieren zwar Cx43, doch sind adulte Muskelfasern elektrisch voneinander isoliert. Nach Differenzierung der transplantierten Myoblasten zu Muskelfasern im Empfänger-Myokard sind diese ebenfalls elektrisch vom Myokard isoliert (Reinecke et al., 2000), wodurch es vermutlich zu Herzrhythmusstörungen kommt.

Werden den Mäusen nach Auslösung einer Ischämie durch Vereisung des linken Ventrikels Myoblasten transplantiert, hat dies aufgrund der fehlenden elektrischen Kopplung nur einen geringen positiven Effekt (Murry et al., 2004; Leobon et al., 2003). Durch die fehlende elektrische Kopplung der transplantierten Zellen mit den Kardiomyozyten des verletzten Herzbereichs kommt es vermehrt zum Auftreten ventrikulärer Tachykardien. Durch Verwendung von Myoblasten (Cx43^{tetOeGFP}:MCKtTA), die auch nach ihrer Differenzierung zu Myotuben Cx43 exprimieren, konnte das Auftreten ventrikulärer Tachykardien nahezu verhindert werden (vgl. Abschnitt 4.2.2). Dieser Effekt ist vermutlich auf die elektrische Kopplung zwischen den transplantierten Zellen und den Kardiomyozyten zurückzuführen, wodurch es zu einer Weiterleitung der Erregungsausbreitung im Herzen kommt und auch der Bereich des Herzens an der Kontraktion beteiligt ist, der durch die Ischämie geschädigt wurde.

Für die Transplantation wurden Myoblasten aus Cx43^{tetOeGFP}/MCKtTA Mäusen eingesetzt, die Cx43 und eGFP unter Kontrolle des bidirektionalen CMV-Promotors mit Hilfe des TetOFF Systems in Myotuben und adulten Skelettmuskelzellen exprimieren (vgl. Abschnitt 4.2.1). Die Cx43^{tetOeGFP}:MCKtTA Mäuse wurden durch Immunfluoreszenz-Analysen charakterisiert. Im adulten Skelettmuskel war sowohl die Expression des Cx43 wie auch des Reportergens eGFP nachweisbar. Auch im Embryo konnte eGFP in den Myotuben nachgewiesen werden, so dass für die Transplantationsexperimente die Tiere ausgewählt werden konnten, die eine Expression des eGFP zeigten. Die Myoblasten wurden aus den embryonalen Skelettmuskeln extrahiert und für die Transplantationsexperimente eingesetzt. Zum Nachweis der Expression des Cx43 in Myotuben wurde ein Aliquot der eingesetzten

Zellen in Zellkultur zu Myotuben differenziert. Hier konnten sowohl das eGFP wie auch das Cx43 Protein in der Plasmamembran nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 4.2.1). Auch die transplantierten Myoblasten differenzierten im Empfänger-Myokard und zeigten sowohl die Expression des eGFP als auch des Cx43. Durch Cx43 gebildete Gap Junctions waren sowohl zwischen den aus den transplantierten Myoblasten entstandenen Myotuben wie auch zwischen den Myotuben und den Kardiomyozyten nachweisbar (vgl. Abschnitt 4.2.2). Hierdurch ist vermutlich eine elektrische Kopplung sowohl zwischen den transplantierten Zellen als auch zwischen den transplantierten Zellen und dem Empfänger-Myokard gegeben.

Die Verwendung von Myoblasten bei ischämischen Herzveränderungen ist ein möglicher Therapieansatz. Allerdings muss eine elektrische Kopplung über Gap Junctions der transplantierten Zellen auch nach ihrer Differenzierung zu Myotuben mit dem Empfängergewebe gegeben sein. Dies wäre durch Transfektion der Myoblasten mit Cx43 cDNS in Zellkultur erreichbar. Ein Vorteil dieser Methode läge in der Möglichkeit, Spender-eigene Zellen einzusetzen, z.B. Satellitenzellen des adulten Skelettmuskels, die zu myogenen Zellen differenziert werden können. Als Promotor für die transgene Expression des Cx43 in Myotuben könnte der MCK Promotor eingesetzt werden. Allerdings können unerwünschte Nebeneffekte wie z.B. die Deletion eines Gens, die durch die Insertion des Konstruktes zur Expression des Cx43 in Myotuben entstehen, nicht ausgeschlossen werden. Eine umfangreiche Charakterisierung der transfizierten Myoblasten ist zum einen schwierig, zum anderen zeitaufwändig. Die Transplantation der Myoblasten sollte möglichst bald nach dem Infarkt durchgeführt werden, damit eine Integration dieser Zellen in das Empfängermyokard im Bereich des Infarkts vor der Narbenbildung gegeben ist.

5.3 Erzeugung einer Cx39 defizienten Mauslinie

Zur weiteren Analyse der Funktion des Cx39 während der Muskelentwicklung und -regeneration wurden Mäuse erzeugt, bei denen die kodierende Region des Gjd4 Gens (Cx39) durch die Sequenz des eGFP ersetzt wurde. Es wurde ein konventioneller Ansatz gewählt, da aufgrund der spezialisierten Expression des Cx39 in Myotuben nicht von einem embryonal letalen Phänotyp ausgegangen werden muss.

Zur Erzeugung Cx39 defizienter Mäuse wurde ein Austauschvektor kloniert, der eingerahmt von den homologen Bereichen des Gjd4 Gens (Cx39) das eGFP Reportergen anstelle der kodierenden Region des Cx39 sowie eine durch frt-Stellen flankierte Neomycin-Resistenzkassette zur Selektion in embryonalen Stammzellen trägt (vgl. Abschnitt 4.3.1). Nach erfolgreicher homologer Rekombination wird das eGFP Reportergen unter der Kontrolle des Gjd4 Promotors exprimiert. Bei der Klonierung wurde darauf geachtet, dass die Kozak-Sequenz des Gjd4 Gens (Cx39) sowie das endogene polyA Signal des Gjd4 (Cx39) verwendet werden. Es wurde lediglich die kodierende Region des Gjd4 Gens einschließlich des Introns entfernt. Durch diese geringen Veränderungen des genomischen Locus sollte eine möglichst ähnliche Expression des eGFP Reportergens im Vergleich zu Cx39 gegeben sein. Hierdurch sollten keine potentiellen Bindungsstellen für miRNS oder Transkriptionsfaktoren entfernt werden, die zu einer veränderten Expression des eGFP oder benachbarter Gene führen könnten. Es wurde die gesamte kodierende Region des Gjd4 Gens entfernt, da am Ende des Exon1 ein Spleißdonor und am Beginn des Exon2 ein Spleißakzeptor liegen (von Maltzahn 2003, Diplomarbeit). Es wurde sich für das Reportergen eGFP entschieden, da es im Gewebe direkt nachweisbar ist und eine geringe Halbwertszeit von 8 – 12 Stunden aufweist (Li et al., 1998). Die eGFP exprimierenden Zellen können somit auch im lebenden Gewebe nachgewiesen werden, die relativ kurze Halbwertszeit des eGFP verhindert das Auftreten falsch positiver Ergebnisse in Entwicklungsprozessen.

Nach erfolgreicher homologer Rekombination in ES-Zellen und Charakterisierung der resultierenden Zellklone durch Southern Blot und Karyotyp Analysen wurden zwei Klone zur Blastozysteninjektion eingesetzt (vgl. Abschnitt 4.3.2). Die hieraus entstandenen Chimären mit einem Chimerismusgrad von 80 – 100 % wurden mit C57BL/6 Mäusen verpaart, um heterozygote Cx39 defiziente Tiere ($Cx39^{GFPneo/+}$) zu erhalten. Der durch die Fellfarbe reflektierte Chimerismusgrad stimmt mit der prozentualen Verteilung integrierter, homolog rekombinierter ES-Zellen in anderen Geweben und Organen überein (Mystkowska et al., 1979). Zur Deletion der durch frt-Stellen flankierten Neomycin-Resistenzkassette wurden die heterozygoten Nachkommen mit deleter-Flp Tieren (Rodriguez et al., 2000) verpaart.

Parallel wurden die heterozygoten Tiere ($Cx39^{GFPneo/+}$) miteinander verpaart, um den Effekt der Deletion des Cx39 Gens möglichst schnell analysieren zu können. Die

Cx39 defizienten Tiere werden im erwarteten Mendel'schen Verhältnis geboren, sie sind lebensfähig. Bislang können keine Aussagen über einen möglichen Phänotyp gemacht werden, da aufgrund der geringen Tierzahlen noch keine weitergehenden Untersuchungen wie Messung der Muskelkraft oder Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Muskelregeneration durchgeführt wurden (vgl. Abschnitt 6.2). Der Nachweis der Deletion des Cx39 auf Proteinebene kann wegen der spezialisierten Expression des Cx39 nur während der Embryogenese oder während der Regeneration des Skelettmuskels erfolgen. Daher wurden Immunfluoreszenz-Analysen mit gegen Cx39 gerichteten Antikörpern an Cx39^{GFPneo/GFPneo} Embryonen (ED17.5) und heterozygoten Geschwistertieren durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.3.3). In den Cx39^{GFPneo/GFPneo} Embryonen war das Cx39 Protein wie erwartet nicht nachweisbar, in den heterozygoten Tieren konnte Cx39 im Interkostalmuskel nachgewiesen werden. Dies entspricht der Expression des Cx39 in C57BL/6 Embryonen (von Maltzahn et al., 2004). Mit dieser Analyse wurde die Abwesenheit des Cx39 Proteins nach Deletion des Gjd4 Gens nachgewiesen.

5.4 Erzeugung einer Cx45eGFP exprimierenden Mauslinie

Zur weiteren Charakterisierung der Expression des Cx45 Proteins in der Maus wurden transgene Mäuse erzeugt, die ein Fusionsprotein aus Cx45 und eGFP exprimieren. Mit den bisher beschriebenen Reportergermäusen war lediglich die Aktivität des Promotors, nicht aber die Lokalisation des Proteins nachweisbar. Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit keine spezifischen Antikörper gegen Cx45 vorhanden waren, konnte kein spezifischer Nachweis des Cx45 in der Maus durch Immunfluoreszenz-Analysen erfolgen.

5.4.1 Vergleich der verschiedenen transgenen Linien

Für die Erzeugung der Cx45eGFP Mäuse wurde die BAC-Technik eingesetzt (Yang et al., 1997), da mit Hilfe dieser Technik eine Expression des Cx45eGFP unter der Kontrolle des Gjc1 Promotors (Cx45) möglich ist. Die stromaufwärts und stromabwärts des Gjc1 Gens (Cx45) gelegenen regulativen Elemente sind ebenfalls im BAC integriert, so dass es zu einer Expression des Cx45eGFP unabhängig vom

Integrationsort kommt (Heintz, 2001). Bei Verwendung eines transgenen Ansatzes mit Hilfe eines kleineren Vektorkonstrukts wäre zum einen die Expression unter der Kontrolle des Gjc1 Promotors einschließlich aller Verstärker- und Kontrollregionen nicht möglich, zum anderen wäre eine Abhängigkeit der Expression vom Integrationsort gegeben. Ein anderer Ansatz zur Erzeugung einer Cx45eGFP Mauslinie stellt das System der homologen Rekombination in ES-Zellen dar, welches allerdings wesentlich zeitaufwändiger ist. Ein weiterer Vorteil der BAC-Technik besteht darin, dass verschiedene transgene Linien erzeugt werden können, die sich in der Expressionsstärke des Fusionsproteins aufgrund unterschiedlich häufiger Integrationen in das Genom unterscheiden können (Heintz, 2001). Eine starke Expression ist gerade bei schwach exprimierten Genen von Vorteil.

Durch homologe Rekombination in *E.coli* entstand in zwei Schritten der Cx45eGFP BAC, der die Sequenz für das Gjc1 Gen (Cx45) fusioniert mit der Sequenz für das eGFP enthält (vgl. Abschnitt 4.4.1). Die erfolgreiche Rekombination und damit auch die Deletion des Stopp-Codons des Gjc1 Gens (Cx45) wurde durch Southern Blot Analysen sowie Sequenzierung des Übergangsbereichs zwischen Cx45 und eGFP überprüft. Die Verbindungssequenz („linker“) zwischen Cx45 und eGFP wurde zuvor in HeLa Zellen überprüft (Euwens, Dissertation 2007). Das Fusionsprotein zeigte die charakteristische Fluoreszenz sowie den Transport zur Plasmamembran und die Ausbildung Gap Junction ähnlicher Strukturen (Euwens, Dissertation 2007).

Durch Oozyteninjektion des Cx45eGFP BAC in Oozyten und anschließenden Transfer in scheinchwangere Weibchen entstanden 7 verschiedene transgene Linien, von denen vier weiter durch Southern Blot und Fluoreszenz Analysen charakterisiert wurden. Bei den Linien 18, 20 und 43 konnten die erwarteten Fragmentgrößen nach Southern Blot Hybridisierung nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 4.4.3). Bei diesen transgenen Linien zeigte sich auch die erwartete Fluoreszenz des Cx45eGFP im Herzen im Bereich des Reizleitungssystems. In diesem Bereich ist die Expression des Cx45 durch Reporteranalysen sowie Immunfluoreszenz-Analysen gut charakterisiert (Coppen et al., 1998; Krüger et al., 2000). Bei Linie 26 entsprachen die Fragmentgrößen nach Southern Blot Hybridisierung nicht den erwarteten Fragmenten, in der Fluoreszenz-Analyse konnte keine Fluoreszenz des Fusionsproteins nachgewiesen werden. Vermutlich hat bei dieser Linie nur eine partielle Integration des Cx45eGFP BAC in das Genom der

Maus stattgefunden, so dass es nicht zur Expression des Cx45eGFP kommt. Diese Linie wurde für die weitergehenden Untersuchungen nicht eingesetzt. Bei Linie 18 sowie bei Linie 20 scheint der Cx45eGFP BAC einfach in das Genom integriert zu sein wie durch Southern Blot und Immunoblot Analysen gezeigt werden konnte (vgl. Abschnitt 4.4.3). Da sich die beiden Linien in der Expression des Cx45eGFP entsprechen, wurde nur die Linie 18 für weitergehende Analysen eingesetzt. Bei Linie 43 scheint es zu einer Mehrfachintegration des Cx45eGFP BAC in das Genom gekommen zu sein wie aus den Southern Blot und Immunoblot-Analysen ersichtlich ist. Diese Mehrfachintegration zeigte sich auch in der Fluoreszenz-Analyse, die Signale wiesen eine wesentlich stärkere Fluoreszenz-Intensität als die Signale der Linie 18 und Linie 20 auf. Trotz der starken Überexpression des Fusionsproteins zeigen die Tiere keine offensichtlichen phänotypischen Auffälligkeiten. Bei einer Überexpression des Cx45 unter der Kontrolle des MHC-Promotors weisen die Mäuse eine erhöhte Empfänglichkeit für ventrikuläre Tachykardien auf (Betsuyaku et al., 2006). Eine solche Empfänglichkeit für ventrikuläre Tachykardien wäre bei einer vollständigen Funktionalität der aus Cx45eGFP gebildeten Gap Junctions bei Linie 43 möglich.

Zur weiteren Untersuchung der Spezifität der Expression des Cx45eGFP im Vergleich zur Expression des Cx45 wurden RT-PCR Analysen verschiedener Gewebe, Immunoblot- sowie Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.4.3 und 4.4.4). Es konnte gezeigt werden, dass das Cx45eGFP Transkript und das Cx45eGFP Fusionsprotein in den gleichen Zelltypen exprimiert wird, die auch das endogene Cx45 exprimieren. Zur Klärung der Frage, ob das Cx45eGFP Protein die gleiche Lokalisation wie das Cx45 Protein aufweist, wurden Immunfluoreszenz-Analysen des reizleitenden Systems des adulten Herzens durchgeführt. Das Cx45eGFP Fusionsprotein kolokalisiert mit dem endogenen Cx45 Protein (vgl. Abschnitt 4.4.4). Daher ist davon auszugehen, dass das Cx45eGFP Protein die gleiche Lokalisation wie das Cx45 Protein aufweist und die Cx45eGFP Expression der des endogenen Cx45 entspricht.

5.4.2 Lokalisation des Cx45eGFP im adulten Herzen

Das Cx45 Protein wurde in den beiden Schrittmacherzentren des Herzens – dem Sinus-Knoten und dem AV-Knoten – sowie seinen posterioren Ausläufern, dem

His'schen Bündel und den Purkinje-Fasern nachgewiesen (Coppen et al., 1999; Dobrzynski et al., 2003). Über die Expression des Cx45 im Arbeitsmyokard und in den Atrien gibt es hingegen widersprüchliche Angaben in der Literatur (van Veen et al., 2001). Mit Hilfe der Cx45eGFP Mauslinie sollte geklärt werden, ob auch hier Cx45 exprimiert wird.

Das Cx45eGFP Protein war sowohl im Sinus-Knoten, in den Purkinjefasern wie auch im Arbeitsmyokard und den Atrien durch Immunfluoreszenz Analysen detektierbar (vgl. Abschnitt 4.4.5). Die Kolokalisation mit Cx30.2 im Sinus-Knoten wurde bereits von Kreuzberg et al. (2005) beschrieben und die hieraus gebildeten Kanäle dienen vermutlich der gerichteten Reizweiterleitung im adulten Herzen. Im Atrium und Arbeitsmyokard wurde eine partielle Kolokalisation mit Cx43 nachgewiesen. Die Funktion des Cx45 im adulten Herzen könnte in der Verlangsamung der Erregungsausbreitung und somit einer sequentiellen Kontraktion der Atrien und Ventrikel liegen. Die durch Cx45 gebildeten Gap Junction Kanäle weisen in Zellkultur eine geringe elektrische Leitfähigkeit auf (Veenstra et al., 1994; Moreno et al., 1995; van Veen et al., 2000). Für heterotypische Kanäle aus Cx45 und Cx40 bzw. Cx43 und Cx30.2 wurde eine asymmetrische Leitfähigkeit in Zellkultur bestimmt (Rackauskas et al., 2007). Dies spricht für eine Funktion des Cx45 als Gleichrichter der Erregungsausbreitung im adulten Herzen.

5.4.3 Expression des Cx45eGFP im Cerebellum adulter Mäuse

Die Expression des Cx45 wurde im adulten Gehirn durch Reporteranalysen in Neuronen und cerebralen Arterien nachgewiesen (Maxeiner et al., 2003; Li et al., 2001). Bislang konnte allerdings die Lokalisation des Cx45 Proteins im adulten Gehirn nicht nachgewiesen werden. Durch Verwendung gegen eGFP gerichteter Antikörper ist der Nachweis des Cx45eGFP im adulten Gehirn möglich. Aufgrund der starken Hintergrundfluoreszenz des adulten Gehirns ist ein direkter Beweis des Cx45eGFP nicht möglich. Das Cx45eGFP Protein wurde an Parvalbumin-positiven sowie Calbindin-positiven Zellen des Cerebellums gefunden (vgl. Abschnitt 4.4.8). Vermutlich handelt es sich hierbei um unterschiedliche Typen von Interneuronen. Die durch Cx45 gebildeten Gap Junction Kanäle könnten der elektrischen Kopplung der Neurone mit den Interneuronen des Cerebellums dienen.

Das Cx45eGFP Protein wurde in der Nähe chemischer Synapsen des Gehirns sowohl im Cerebellum (vgl. Abschnitt 4.4.8) wie auch im Cerebrum (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen. In Mauthner Zellen der Goldfisch Retina wurden gemischte Synapsen (elektrisch und chemisch) nachgewiesen (Cachope et al, 2007), wodurch es zu einer durch Endocannabinoide ausgelösten Langzeit-Verstärkung der synaptischen Transmission zwischen „Club endings“ und lateralen Dendriten der M-Zellen kommt. An diesen gemischten Synapsen ist das Cx35 beteiligt, welches dem Cx36 der Maus homolog ist. Gemischte Synapsen wurden auch zwischen aus Cx45 gebildeten Gap Junctions und glutaminergen Synapsen im Bulbus olfactorius adulter Mäuse nachgewiesen (Rash et al., 2005). Durch die räumliche Nähe der chemischen und elektrischen Synapsen kommt es vermutlich sowohl bei der chemischen wie auch bei der elektrischen Weiterleitung zu einer Verstärkung der Signalweiterleitung (Connors und Long, 2004). Weitere gemischte Synapsen wurden im Rückenmark sowie im Neocortex und Hirnstamm der Säuger gefunden (Rash et al., 1996; Fukuda und Kosaka, 2003; Rash et al., 2000).

5.4.4 Expression des Cx45eGFP während der adulten Neurogenese

Während der Entwicklung des Gehirns wird Cx45 stark exprimiert (Maxeiner et al., 2003; Cina et al., 2007). Daher wurde die Expression des Cx45eGFP in der Subventrikularzone, dem Bereich des adulten Gehirns, in dem die adulten Stammzellen lokalisiert sind (Vescovi et al., 2006), untersucht (vgl. Abschnitt 4.4.9). Nach ihrer Teilung und Differenzierung wandern die Neurone über den rostralen Migrationsstrom („rostral migratory stream“) in den Bulbus olfactorius, wo sie als Interneurone in die corticalen Schichten integriert werden (Ninkovic und Götz, 2007). Das Cx45eGFP Protein wurde in GFAP-positiven, S100 β -positiven und Nestin-positiven Zellen im Bereich der Subventrikularzone nachgewiesen. Ferner konnte das Cx45eGFP Protein partiell mit Cx43, u.a. im Ependym, kolokalisiert werden (vgl. Abschnitt 4.4.9). Bei den Cx45eGFP exprimierenden Zellen handelt es sich vermutlich – neben den ependymalen Zellen – um Neuroblasten. Diese Neuroblasten sind durch die Expression der Marker-Proteine GFAP und Nestin gekennzeichnet (Curtis et al., 2007) und entstehen durch Teilung der adulten Stammzellen in der Subventrikularzone (Ninkovic und Götz, 2007). Eine mögliche Funktion der Gap Junctions in diesem Gehirnbereich könnte die Aufrechterhaltung des

Stammzellcharakters sein wie dies für embryonale Stammzellen beschrieben wurde (Wörsdörfer et al., 2007; Todorova et al., 2008). Generell senden endotheliale Zellen Signale an Stammzellen, die zu deren Selbsterneuerung führen (Shen et al., 2004). Im Gegensatz dazu senden Astrozyten Botenstoffe aus, die zu einer Differenzierung der Stammzellen in Neurone führen (Song et al., 2002). Auch hier ist eine Beteiligung der Gap Junctions an der Weiterleitung dieser Signale denkbar.

Eine weitere Funktion der Gap Junction Kanäle könnte die Versorgung der Stammzellen mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren aus der Cerebrospinal-Flüssigkeit des Ventrikels über die ependymalen Zellen darstellen (Ninkovic und Götz, 2007). Des Weiteren ist eine Beteiligung der Gap Junction vermittelten Kopplung wie auch der Gap Junction vermittelten Adhäsion an der Migration der Zellen entlang des rostralen Migrationsstroms analog zur Wanderung der Neuralleistenzellen denkbar (Huang et al., 1998; Eliot und Kriegstein, 2007).

Durch Farbstoffinjektionen wurde die metabolische Kopplung zwischen glialen Zellen und Neuroblasten gezeigt, welche auf die Anwesenheit homotypischer und heterotypischer Gap Junction Kanäle schließen lässt (Menezes et al., 2000; Menezes et al., 2002). Die Bedeutung der Gap Junction vermittelten Kopplung wird durch Untersuchungen unterstützt, die nach Applikation von Gap Junction Blockern die Inhibierung der Migration und Proliferation postnataler Zellen der Subventrikularzone beschreiben (Marins et al., 2001). Die Zellen der Subventrikularzone migrieren vermutlich ähnlich wie die Neuralleistenzellen als Kohorten (Froes und Menezes, 2002), was eine Funktion der Gap Junctions bei der Zelladhäsion vermuten lässt. Anders als bei der radialen Migration im embryonalen Cortex, wo eine Entkopplung der Zellen ein mögliches Startsignal für die Migration darstellt, ist die Kopplung zwischen den Zellen in der Subventrikularzone vermutlich eine Hauptkomponente für die Initiation der Migration entlang des rostralen Migrationsstroms (Bittman et al., 1997; Menezes et al., 2002).

Es wurde auch die Expression des Cx45eGFP Proteins während der Embryonalentwicklung des Gehirns untersucht (vgl. Abschnitt 4.4.7). Das Cx45eGFP Protein wird in S100 β -positiven Zellen in der Subventrikularzone sowie im Cortex des Gehirns neonataler Mäuse exprimiert. Die Expression des Cx45eGFP im neonatalen Cortex entspricht den Studien von Cina et al. (2007) und Maxeiner et al. (2003), die die Expression des Cx45 Proteins bzw. lacZ Reportergens im Cortex an Tag 18.5 der

Embryonalentwicklung nachgewiesen haben. Die zelluläre Zusammensetzung der neonatalen Subventrikularzone unterscheidet wenig von der adulten Subventrikularzone, allerdings stellen die radialen Gliazellen die zelluläre Hauptkomponente der neonatalen Subventrikularzone dar, die in der adulten Subventrikularzone fehlen (Doetsch et al., 1997; Alves et al., 2002). Auch in der neonatalen Subventrikularzone wurde Gap Junction vermittelte Kopplung zwischen Neuroblasten und radialen Glia-Zellen nachgewiesen (Menezes et al., 2000). Die Zellen liegen in einem Cluster vor, in dem die Zellen durch Gap Junctions miteinander verbunden sind (Roerig und Feller, 2000), wobei die Gap Junction vermittelte Kopplung von der Phase des Zellzyklus abhängig ist (Bittman et al., 1997; Turco und Kriegstein, 1995); v.a. die Neuroblasten weisen eine starke Gap Junction vermittelte Zellkopplung auf (Turco und Kriegstein, 1991). Nach der letzten Mitose-Phase wird die Gap Junction vermittelte Kopplung unterbrochen und die postmitotischen Neurone wandern in die sich entwickelnde cortikale Platte ein (Turco und Kriegstein, 1995). Das Maß der Gap Junction vermittelten Kopplung scheint mit der Differenzierung der Zellen abzunehmen (Roerig und Feller, 2000). Die Gap Junction vermittelte Kopplung korreliert vermutlich mit der Zellproliferation und der Migration in der Subventrikularzone.

5.4.5 Expression des Cx45eGFP in der adulten Niere

In der adulten Niere werden neben Cx45, dessen Expression durch lacZ-Reportergermäuse (Krüger et al., 2000) nachgewiesen wurde, die Connexine Cx37, Cx40 und Cx43 exprimiert (Wagner, 2008). Das Cx45eGFP Protein wurde in den Glomeruli, den afferenten und efferenten Arteriolen sowie im Bereich der Henle'schen Schleife der adulten Niere detektiert (vgl. Abschnitt 4.4.10). Die Kontrolle des Blutflusses durch die Niere wird von sympathischen Nerven sowie autoregulatorischen Mechanismen gesteuert (Wagner, 2008). Die Aktivierung der autoregulatorischen Mechanismen erfolgt über eine Depolarisation, die zu einer Öffnung spannungsabhängiger Kanäle führt, in deren Folge es zu einem Ca^{2+} -Fluss kommt. Die Ausbreitung dieser Ca^{2+} -Welle geschieht vermutlich über Gap Junction Kanäle (Rummery und Hill, 2004). Eine weitere Regulation der Kontraktion der glatten Muskelzellen erfolgt über NO (Wagner, 2008). Ob die Interaktion über

myoendotheliale Gap Junctions erfolgt, an denen auch Cx45 beteiligt sein könnte, ist allerdings umstritten (de Wit et al., 2006; Beny et al., 2006).

Die Filtrationsrate der Niere wird im Bereich der Glomeruli über die tubuloglomeruläre Rückkopplungsschleife reguliert. Hierfür sind die Zellen der Macula densa mit den afferenten Arteriolen des entsprechenden Nephrons verbunden (Briggs und Schnermann, 1987). Die Macula densa Zellen sind in der Lage, ansteigende NaCl Konzentrationen im Lumen der Tubuli wahrzunehmen und über Aussendung von Signalen an die glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole zur Vasokonstriktion zu führen, wodurch sich der Durchmesser der Arteriole verkleinert (Goligorsky et al., 1997). Hierdurch verringert sich die glomeruläre Filtration des dazugehörigen Nephrons (Navar et al., 1996). An diesem Prozess des zur Vasokonstriktion führenden Signaltransfers sind vermutlich Gap Junction Kanäle beteiligt (Ren et al., 2002). Die Bestimmung des Zelltyps, in dem Cx45eGFP in der Niere exprimiert wird, ist allerdings für weitere Aussagen unerlässlich.

5.4.6 Expression des Cx45eGFP in der glatten Muskulatur

Das Cx45eGFP Fusionsprotein wurde in der glatten Muskulatur verschiedener adulter Gewebe wie Lunge, Darm und Uterus nachgewiesen (vgl. Abschnitt 4.4.11). In der Lunge tritt eine partielle Kolokalisation des Cx45eGFP mit Cx40 und Cx43 in den Bronchien auf.

Im Darm dient die Gap Junction vermittelte Kopplung der durch die Tunica muscularis ausgeübten koordinierten Kontraktion (Wang und Daniel, 2001). Physiologische Untersuchungen der Muskelkontraktion an Mäusen mit einer Defizienz für Cx43 in der glatten Muskulatur des Darms zeigten eine verstärkte, unkoordinierte Kontraktion sowie eine Reduktion des Futtertransits (Döring et al., 2007). Durch Untersuchungen zur Muskelkontraktion in Mäusen mit einer Defizienz für Cx45 in der glatten Muskulatur des Darms könnte die Funktion des Cx45 im Darm weiter untersucht werden. Ähnliche Studien haben gezeigt, dass es bei diesen Tieren nicht zu einer Reduktion des Futtertransits kommt (Maxeiner, Dissertation). Dies könnte in einer Kompensation des Verlusts des Cx45 durch Cx43 begründet sein.

Die Expression des Cx45 Proteins im Uterus konnte bereits 1996 von Albrecht et al. gezeigt werden. Zu Beginn der Schwangerschaft kann Cx45 noch nachgewiesen

werden, mit fortschreitender Schwangerschaft nimmt die Expression des Cx45 allerdings ab, während die Expression des Cx43 zunimmt (Döring, Dissertation 2005). Die in der glatten Muskulatur der Lunge nachgewiesenen Gap Junction Kanäle dienen vermutlich der Synchronisierung der Zellen bei der Atmung, so dass es zu einem geregelten Austausch von O₂ und CO₂ kommt. Die Beteiligung heterotypischer oder heteromerer Kanäle aus Cx45/Cx40 und Cx45/Cx43 liegt aufgrund ihrer partiellen Kolokalisation nahe.

5.5 Funktioneller Ersatz des Cx45 durch Cx45eGFP

Zur Untersuchung der funktionellen Ersetzbarkeit des Cx45 durch Cx45eGFP *in vivo* sollten Mäuse erzeugt werden, die nur Cx45eGFP, aber kein Cx45 mehr exprimieren (vgl. Abschnitt 4.4.12). Hierzu wurden Cx45^{lacZ/+} (Krüger et al., 2000) und Cx45eGFP Tiere (vgl. Abschnitt 4.4.4) eingesetzt. Cx45^{lacZ/lacZ} Tiere versterben an Tag 10.5 der Embryonalentwicklung aufgrund eines Herzdefekts (Krüger et al., 2000). Zur Überwindung der embryonalen Letalität wurden Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/+} Mäuse mit Cx45^{lacZ/+} Mäusen verpaart. Aus dieser Verpaarung sollten mit einer Wahrscheinlichkeit von 12,5 % Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/lacZ} Tiere hervorgehen. Es konnten allerdings keine adulten Tiere dieses Genotyps nachgewiesen werden. Aufgrund der embryonalen Letalität bei einer ubiquitären Cx45 Defizienz wurden Embryonen an Tag 10.5 der Embryonalentwicklung präpariert. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung wurde ein Embryo mit dem Genotyp Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/lacZ} nachgewiesen, allerdings nur bei Verwendung der transgenen Linie 43; bei Verwendung der Linie 18 konnte kein solcher Embryo nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz könnte in Zusammenhang mit dem Integrationsort des Cx45eGFP BAC bei Linie 18 stehen. Falls es bei Linie 18 zu einer Integration auf Chromosom 11 gekommen ist (nicht untersucht), auf dem auch das Gjc1 Gen lokalisiert, ist das Vorliegen des Genotyps Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/lacZ} praktisch ausgeschlossen.

Es scheint zu keiner funktionellen Ersetzbarkeit des Cx45 Proteins durch das Cx45eGFP Fusionsprotein zu kommen. Diese fehlende Redundanz könnte zum einen in unterschiedlichen Kanaleigenschaften der entstehenden Gap Junctions, zum anderen in gestörten Interaktionen mit anderen Proteinen oder Problemen beim Proteintransport begründet sein. Durch das Fehlen des endogenen Cx45 Proteins könnte es zu Problemen beim Transport oder bei der Oligomerisierung der

Connexine im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat kommen (Koval, 2006). Es wäre aber auch eine geringere Stabilität des Cx45eGFP Proteins in der Membran und damit ein beschleunigter Abbau denkbar. Dies ließe sich mit Immunfluoreszenz-Analysen an Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/lacZ} Embryonen sowie Pulse-Chase Experimenten in Zellkultur (z.B. Kardiomyozyten) analysieren (vgl. Abschnitt 6.4).

Für Cx45 wurden bislang nur zwei Interaktionspartner beschrieben, ZO-1 und TSG101 (Laing et al., 2001; T. Auth, persönliche Mitteilung). Die Interaktion des ZO-1 mit Cx45 findet vermutlich an den letzten zehn Aminosäuren des C-Terminus des Cx45 Proteins statt (Laing et al., 2001). Untersuchungen mit C-terminal verkürzten Varianten des Cx45 haben gezeigt, dass es bei Verlust der ZO-1 Bindung aufgrund des verkürzten C-Terminus in den Zellen zu einer veränderten Membranlokalisation des Cx45 kommt (Laing et al., 2005). Durch die Anhängung des eGFP an den C-Terminus des Cx45 könnte es in den transgenen Tieren zu einer Verhinderung der Interaktion mit ZO-1 oder anderen Proteinen kommen.

Eine weiterer Grund für die embryonale Letalität der Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/lacZ} Mäuse könnte in den veränderten Kanaleigenschaften liegen, die aufgrund der Anhängung des eGFP entstehen. Es wurden die Kanaleigenschaften des Cx45 fusioniert mit CFP in HeLa Zellen untersucht, hierbei stellten sich allerdings keine Unterschiede in der Leitfähigkeit im Vergleich zu Cx45 Kanälen heraus (F.Bukauskas, persönliche Mitteilung). Bei HeLa Zellen handelt es sich allerdings um ein artifizielles System zur Analyse der Gap Junction Kanäle, so dass Unterschiede in den Kanaleigenschaften im Vergleich zu den Eigenschaften *in vivo* wahrscheinlich sind. Es ist von anderen Connexinen (z.B. Cx43) bekannt, dass sich die Kanaleigenschaften in Zellen nach Anfügen des eGFP verändern (Lin et al., 2008).

Die Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/lacZ} Embryonen weisen vermutlich den gleichen zur embryonalen Letalität führenden Herzdefekt wie die Cx45^{lacZ/lacZ} Embryonen auf (Krüger et al., 2000), dies muss aber in weitergehenden Analysen bestätigt werden.

Das Cx45eGFP Protein eignet sich trotz der fehlenden funktionellen Redundanz als Reporterprotein *in vivo*, da seine Lokalisation mit der des endogenen Cx45 übereinstimmt und in vielen Geweben auch ein Nachweis der Fluoreszenz des Cx45eGFP ohne Antikörper möglich ist.

6 Ausblick

6.1 Connexin-Expression während der Muskelentwicklung und –regeneration

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der Myogenese die zeitliche Abfolge der Expression des Cx43 und Cx39 eine entscheidende Rolle spielt. Weitergehende Analysen zur Permeabilität der Gap Junctions für sekundäre Botenstoffe während der Myogenese könnten weitere Einblicke in ihre Funktion in Myoblasten und Myotuben geben. Eine Möglichkeit der Analyse wäre die Messung des interzellulären Ca^{2+} -Transfers nach Beladung der Zellen mit Fluo-4FF, einem Ca^{2+} -Sensor (Bedner et al., 2006). Die Analysen könnten zum einen in C_2C_{12} Zellen, zum anderen in primären Myoblasten der verschiedenen Genotypen ($\text{Cx43}^{\text{del/del}}$, $\text{Cx39}^{\text{GFP/GFP}}$, $\text{Cx43}^{\text{del/del}}//\text{Cx39}^{\text{GFP/GFP}}$) durchgeführt werden.

Die Expression des Cx39 während der Myogenese konnte im Verlauf dieser Arbeit nachgewiesen werden. Durch Herunterregulation der Expression des Cx39 mit Hilfe spezifischer siRNS in Zellkultur oder durch Verwendung Cx39 defizienter Mäuse könnte die Bedeutung der durch Cx39 vermittelten Gap Junction Kopplung während der Muskelentwicklung und -regeneration weiter untersucht werden. Zum einen könnte der Differenzierungs- und Regenerationsprozess anhand verschiedener Markerproteine (MyoD, Myogenin, Myf5) und die Muskeltextur mit Hilfe histologischer Färbungen analysiert werden.

Es wurden auch geringe Cx45 Transkriptmengen in C_2C_{12} Zellen nachgewiesen. Auch während der Muskelregeneration wurde eine gesteigerte Expression des Cx45 nachgewiesen (Araya et al., 2005). Zur Untersuchung der Funktion des Cx45 während der Muskelregeneration könnten Regenerationsexperimente an $\text{Cx45}^{\text{fl/fl}};\text{Mx-Cre}$ Tieren nach Induktion des Mx-Cre Promotors durchgeführt werden. Kürzlich wurde die positive Regulation der Cx43 Expression durch Sphingosin-1-Phosphat und damit einhergehend die Differenzierung der Myoblasten beschrieben (Squecco et al., 2006). Eine Regulation der Expression durch Sphingosin-1-Phosphat wäre für Cx39 denkbar, die in C_2C_{12} Zellen wie auch in primären Myoblasten untersucht werden könnte.

Bislang wurde die funktionelle Redundanz der Connexine bei der Muskelregeneration an $\text{Cx43}^{\text{Cx26/Cx26}}$ und $\text{Cx43}^{\text{Cx32/Cx32}}$ Mäusen untersucht. Hierbei

zeigte sich, dass eine beschleunigte Regeneration des Skelettmuskels bei den Cx43^{Cx26/Cx26} und Cx43^{Cx32/Cx32} Tieren auftritt, die auf eine erhöhte Permeabilität für IP₃ zurückgeführt werden könnte. Die Eigenschaften der gebildeten Gap Junction Kanäle und damit die Bestätigung dieser Hypothese ließen sich in primären Myoblasten aus Mäusen mit den verschiedenen Genotypen durch Messung des interzellulären IP₃ Transfers (Bedner et al., 2006) untersuchen.

6.2 Weitere Analyse der Cx39 defizienten Mauslinie

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden Cx39 defiziente Mäuse erzeugt. Nach einer Charakterisierung der verschiedenen Genotypen durch Southern Blot und Immunoblot Analysen sollten Untersuchungen des Verlaufs der Muskelentwicklung und -regeneration durchgeführt werden, da Cx39 während beider Prozesse exprimiert wird (von Maltzahn et al., 2004; Belluardo et al., 2005). Bislang wurden aufgrund der geringen Tierzahlen keine phänotypischen Analysen der Cx39 defizienten Tiere durchgeführt. Eine Analyse der Muskeltextur durch Trichrom-Färbungen verschiedener adulter Skelettmuskeln, eine Messung der ausgebildeten Muskelkraft durch isometrische Kontraktionsmessungen sowie eine „Walking Pattern“ Analyse zur Analyse des Bewegungsablaufs könnten Aufschluß über die Auswirkungen der Deletion im adulten Tier geben. Die Untersuchung der Funktion des Cx39 während des Muskelregenerationsprozesses wäre durch Injektion von BaCl₂ oder Kardiotoxin in den Tibialis anterior Muskel und anschließende Untersuchung des Verlaufs der Regeneration möglich.

Da Cx39 während der Embryogenese exprimiert wird, sollte auch der Verlauf der Myogenese im Embryo untersucht werden. Hierfür könnten histologische Färbungen und Immunfluoreszenz-Analysen mit myogenen Markern wie MyoD und Myogenin an Dünnschnitten von Embryonen verschiedener Embryonalstadien durchgeführt werden. Ferner sollte die Expression des Cx43 in Cx39 defizienten Tieren während der Myogenese untersucht werden, da es zu einer Kompensation des Fehlens des Cx39 durch Cx43 kommen könnte.

Während der Myogenese werden Cx43 und Cx39 in einer zeitlichen Abfolge exprimiert. Zur weiteren Untersuchung der Bedeutung der Gap Junction vermittelten Kopplung *in vivo* könnten Mäuse erzeugt werden, die Cx39 defizient und

Skelettmuskel-spezifisch Cx43 defizient sind, da eine ubiquitäre Deletion des Cx43 zu neonataler Letalität führt (Reaume et al., 1995). Für die Erzeugung dieser Mauslinie könnten Cx43^{fl/fl} Mäuse eingesetzt werden, bei denen nach Cre-vermittelter Deletion des Gja1 Gens (Cx43) das CFP (cyan fluorescent protein) exprimiert wird (J. Degen, unveröffentlicht). Zur Deletion des Gja1 Gens könnte die Myo-Cre Linie eingesetzt werden (Li et al., 2005), die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Myogenin Promotors exprimiert. Die entstehenden Tiere könnten im Hinblick auf die Vollständigkeit und den zeitlichen Verlauf Myogenese und eventuell auch des Muskelregenerationsprozesses anhand histologischer Schnitte und der Expression des Markerproteins Myogenin untersucht werden.

6.3 Weitere Analyse der Cx45eGFP Mauslinie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Mauslinie erzeugt und charakterisiert, die ein Cx45eGFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des Gjc1 Promotors (Cx45) exprimiert. Bislang ist die Analyse der Lokalisation des Cx45 Proteins in Blutgefäßen aufgrund des Fehlens spezifischer Antikörper gegen Cx45 nicht möglich. Durch Immunfluoreszenz-Analysen mit gegen eGFP gerichteten Antikörpern wäre eine Bestimmung der Lokalisierung des Cx45eGFP in Blutgefäßen und auch eine weitere Charakterisierung der Expression in der adulten Niere möglich.

Die Expression des Cx45 wurde zumeist mit Hilfe verschiedener Reporter-gen-Mäuse (Krüger et al., 2000; Maxeiner et al., 2003) im adulten Gehirn sowie während der Neurogenese beschrieben. Durch diese Analysen kann allerdings nur auf die Aktivität des Promotors, nicht aber auf die Lokalisation des Proteins geschlossen werden. Durch Fluoreszenz-Analysen des Gehirns ist die Lokalisation des Cx45eGFP Proteins nun möglich, dies gibt weitere Informationen über die elektrische Verschaltung im adulten Gehirn. Die Injektion von Biozytin in Cx45eGFP exprimierende Neurone würde weitere Informationen über die neuronale Verschaltung im adulten Gehirn liefern. Des Weiteren ist die Untersuchung der Wanderung Cx45 exprimierender Neurone entlang des rostralen Migrationsstroms aus der Subventrikularzone in den Bulbus olfactorius anhand der Cx45eGFP Fluoreszenz mit diesen Mäusen möglich.

6.4 Ersatz des Cx45 durch Cx45eGFP

Im Laufe dieser Arbeit wurden Mäuse erzeugt, die zwar Cx45eGFP, aber kein Cx45 exprimieren. Diese Tiere versterben embryonal, allerdings ist der Zeitpunkt des Todes bisher nicht bestimmt. Cx45 defiziente Tiere versterben an Tag 10.5 der Embryonalentwicklung aufgrund eines Herzdefekts (Krüger et al., 2000). Ob es zu einem partiellen Ersatz des Cx45 durch Cx45eGFP kommt, könnte durch die Bestimmung des Todeszeitpunkts und histologische Analysen der Embryonen untersucht werden. Des Weiteren würden Messungen der Erregungsausbreitung im embryonalen Herzen an diesen Tieren Informationen über die elektrische Leitfähigkeit der Cx45eGFP Kanäle *in vivo* liefern. Weitere Erkenntnisse über die Kanaleigenschaften der Cx45eGFP Kanäle könnten Mikroinjektionsexperimente mit verschiedenen Farbstoffen in primäre Kardiomyozyten dieser Tiere bringen.

Durch Immunfluoreszenz-Analysen an Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/lacZ} Tieren sollte die Lokalisation des Cx45eGFP bestimmt werden, da es in Folge des Fehlens des endogenen Cx45 zu einer Misslokalisierung des Cx45eGFP kommen könnte. Ein Pulse-Chase Experiment würde Aufschluss über eine veränderte Halbwertszeit als Folge der Anhängung des eGFP geben.

Durch die Anhängung des eGFP könnte der C-Terminus des Cx45 maskiert werden, an welchem die Interaktion mit ZO-1 (Laing et al., 2001) stattfindet. Durch Co-Immunpräzipitationsexperimente könnte diese These bestätigt werden.

Die Ursache für die embryonale Letalität der Cx45eGFP//Cx45^{lacZ/lacZ} Tiere kann durch histologische Schnitte weiter analysiert werden. Es könnte ein Vergleich mit Cx45^{lacZ/lacZ} und Cx45^{36/36} (Döring, Dissertation 2005) Tieren durchgeführt werden.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression und Funktion der Connexine während der Myogenese untersucht. Die Myoblasten sind durch die Expression des Connexin43 (Cx43) gekennzeichnet, während in Myotuben nur das Connexin39 (Cx39) Protein nachgewiesen werden konnte. Durch die Verwendung spezifischer siRNS gegen Cx43 sowie verschiedener Gap Junction Blocker wurde gezeigt, dass die Gap Junction vermittelte Kopplung für die Fusion der Myoblasten entscheidend ist. Ferner wurde der Verlauf der Muskelregeneration in Cx43^{Cx26/Cx26} und Cx43^{Cx32/Cx32} Tieren untersucht. Bei beiden transgenen Linien wurde ein beschleunigter Regenerationsverlauf im Vergleich zu Wildtyp Tieren beobachtet.

Zur weiteren Charakterisierung der Funktion des Cx39 während der Myogenese wurde durch homologe Rekombination eine Cx39 defiziente Mauslinie erzeugt, die anstelle der kodierenden Region des Gjd4 Gens (Cx39) das eGFP Reporter-gen exprimiert. Die Cx39 Defizienz nach Deletion des Gjd4 Gens wurde durch Immunfluoreszenz-Analysen nachgewiesen. Die Cx39 defizienten Tiere wurden im erwarteten Mendel'schen Verhältnis geboren, d.h. es ergaben sich keine Hinweise auf embryonale Letalität.

Eine Möglichkeit der Behandlung der Folgen einer Ischämie des Herzens besteht in der Transplantation von Myoblasten. Hierbei kommt es allerdings infolge fehlender interzellulärer Kopplung zu ventrikulären Tachykardien. Durch Transplantation transgener Myoblasten (Cx43^{tetOeGFP}:MCKtTA), die auch nach ihrer Differenzierung zu Myotuben und Muskelfasern Cx43 exprimieren, wurde das Auftreten ventrikulärer Tachykardien vermieden.

Zur Charakterisierung der Expression des Cx45 wurde mit Hilfe der BAC-Technik eine transgene Mauslinie erzeugt, die ein Cx45eGFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des Gjc1 (Cx45) Promotors exprimiert. Durch Analysen der Expression des Cx45eGFP im adulten Herzen konnte die Expression im Reizleitungssystem bestätigt und die bis dahin strittige Expression im Atrium und Arbeitsmyokard nachgewiesen werden. In der Subventrikularzone des adulten Gehirns sowie in der glatten Muskulatur wurde Cx45eGFP ebenfalls nachgewiesen. Obwohl das Cx45eGFP Protein Cx45 *in vivo* funktionell nicht ersetzen kann, ist mit dieser Mauslinie die Untersuchung der Lokalisation des Cx45 Proteins in adulten wie auch embryonalen Geweben möglich.

8 Literaturverzeichnis

Ahmad A, Brinson M, Hodges BL, Chamberlain JS, Amalfitano A. (2000). Mdx mice inducibly expressing dystrophin provide insights into the potential of gene therapy for duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 9:2507-15.

Alcoléa S, Théveniau-Ruissy M, Jarry-Guichard T, Marics I, Tzouanacou E, Chauvin JP, Briand JP, Moorman AF, Lamers WH, Gros DB. (1999). Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circ Res.* 84:1365-79.

Alderton JM, Steinhardt RA. (2000). How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc Med.* 10:268-72.

Altevogt BM, Kleopa KA, Postma FR, Scherer SS, Paul DL. (2002). Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci.* 22:6458-70.

Altevogt BM, Paul DL. (2004). Four classes of intercellular channels between glial cells in the CNS. *J Neurosci.* 24:4313-23.

Alves JA, Barone P, Engelender S, Fróes MM, Menezes JR. (2002). Initial stages of radial glia astrocytic transformation in the early postnatal anterior subventricular zone. *J Neurobiol.* 52:251-65.

Anderson C, Catoe H, Werner R. (2006). MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development. *Nucleic Acids Res.* 34:5863-71.

Anderson CL, Zundel MA, Werner R. (2005). Variable promoter usage and alternative splicing in five mouse connexin genes. *Genomics.* 85:238-44.

Andrés V, Walsh K. (1996). Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J Cell Biol.* 132:657-66.

Araya R, Eckardt D, Maxeiner S, Krüger O, Theis M, Willecke K, Sáez JC. (2005). Expression of connexins during differentiation and regeneration of skeletal muscle: functional relevance of connexin43. *J Cell Sci.* 118:27-37.

Araya R, Eckardt D, Riquelme MA, Willecke K, Sáez JC. (2003). Presence and importance of connexin43 during myogenesis. *Cell Commun Adhes.* 10:451-6.

Araya R, Riquelme MA, Brandan E, Sáez JC. (2004). The formation of skeletal muscle myotubes requires functional membrane receptors activated by extracellular ATP. *Brain Res Brain Res Rev.* 47:174-88.

Asakura A, Komaki M, Rudnicki M. (2001). Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation.* 68:245-53.

Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S, Panchin Y. (2004) The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*. 83:706-16.

Barrio LC, Capel J, Jarillo JA, Castro C, Revilla A. (1997). Species-specific voltage-gating properties of connexin-45 junctions expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys J*. 73:757-69.

Bauer R, Löer B, Ostrowski K, Martini J, Weimbs A, Lechner H and Hoch M. (2005) Intercellular communication: the *Drosophila* innexin multiprotein family of gap junction proteins. *Chem Biol*. 12(5):515-26.

Bedner P, Niessen H, Odermatt B, Kretz M, Willecke K, Harz H. (2006). Selective permeability of different connexin channels to the second messenger cyclic AMP. *J Biol Chem*. 281:6673-81.

Belcastro AN, Shewchuk LD, Raj DA. (1998). Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol Cell Biochem*. 179:135-45.

Belluardo N, Trovato-Salinaro A, Mudò G, Condorelli DF. (2005). Expression of the rat connexin 39 (rCx39) gene in myoblasts and myotubes in developing and regenerating skeletal muscles: an in situ hybridization study. *Cell Tissue Res*. 320:299-310.

Bennett MV, Zukin RS. (2004). Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron*. 41:495-511.

Bény JL, Koenigsberger M, Sauser R. (2006). Role of myoendothelial communication on arterial vasomotion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291:H2036-8.

Betsuyaku T, Nnebe NS, Sundset R, Patibandla S, Krueger CM, Yamada KA. (2006). Overexpression of cardiac connexin45 increases susceptibility to ventricular tachyarrhythmias in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 290(1):H163-71.

Beyer, E.C., Kistler, J., Paul, D.L., and Goodenough, D.A. (1989). Antisera directed against connexin43 peptides react with a 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium and other tissues. *J. Cell Biol*. 108, 595-605.

Bittman K, Owens DF, Kriegstein AR, LoTurco JJ. (1997). Cell coupling and uncoupling in the ventricular zone of developing neocortex. *J Neurosci*. 17:7037-44.

Blaveri K, Heslop L, Yu DS, Rosenblatt JD, Gross JG, Partridge TA, Morgan JE. (1999). Patterns of repair of dystrophic mouse muscle: studies on isolated fibers. *Dev Dyn*. 216:244-56.

Bradley A, Zheng B, Liu P. (1998). Thirteen years of manipulating the mouse genome: a personal history. *Int J Dev Biol*. 42:943-50.

- Briggs JP, Schnermann J. (1987). The tubuloglomerular feedback mechanism: functional and biochemical aspects. *Annu Rev Physiol.* 49:251-73.
- Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13644-9.
- Bruzzone R, Ressot C. (1997). Connexins, gap junctions and cell-cell signalling in the nervous system. *Eur J Neurosci.* 9:1-6.
- Buchholz F, Angrand PO, Stewart AF. (1998) Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol* 16:657-662.
- Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat.* 202:59-68.
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-380.
- Cachope R, Mackie K, Triller A, O'Brien J, Pereda AE. (2007). Potentiation of electrical and chemical synaptic transmission mediated by endocannabinoids. *Neuron.* 56:1034-47.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 263:802-5.
- Chargé SB, Rudnicki MA. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.*84:209-38.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159.
- Christie JM, Bark C, Hormuzdi SG, Helbig I, Monyer H, Westbrook GL.(2005). Connexin36 mediates spike synchrony in olfactory bulb glomeruli. *Neuron.* 46:761-72.
- Cina C, Bechberger JF, Ozog MA, Naus CC. (2007). Expression of connexins in embryonic mouse neocortical development. *J Comp Neurol.* 504:298-313.
- Connors BW, Long MA. (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci.* 27:393-418.
- Constantin B, Cognard C, Raymond G. (1996). Myoblast fusion requires cytosolic calcium elevation but not activation of voltage-dependent calcium channels. *Cell Calcium.* 19:365-74.

Constantin B, Cronier L, Raymond G. (1997). Transient involvement of gap junctional communication before fusion of newborn rat myoblasts. *C R Acad Sci III.* 320:35-40.

Constantin B, Cronier L, Raymond G. (1997). Transient involvement of gap junctional communication before fusion of newborn rat myoblasts. *C R Acad Sci III.* 320:35-40.

Constantin B, Cronier L. (2000). Involvement of gap junctional communication in myogenesis. *Int Rev Cytol.* 196:1-65.

Coppen,S.R., Dupont,E., Rothery,S., and Severs,N.J. (1998). Connexin45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart. *Circ. Res.* 82, 232-243.

Coppen,S.R., Kodama,I., Boyett,M.R., Dobrzynski,H., Takagishi,Y., Honjo,H., Yeh,H.I., and Severs,N.J. (1999a). Connexin45, a major connexin of the rabbit sinoatrial node, is coexpressed with connexin43 in a restricted zone at the nodal-crista terminalis border. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 907-918.

Coppen,S.R., Severs,N.J., and Gourdie,R.G. (1999b). Connexin45 (alpha 6) expression delineates an extended conduction system in the embryonic and mature rodent heart. *Dev. Genet.* 24, 82-90.

Cossu G, Tajbakhsh S. (2007). Oriented cell divisions and muscle satellite cell heterogeneity. *Cell.* 129:859-61.

Curtis MA, Faull RL, Eriksson PS. (2007). The effect of neurodegenerative diseases on the subventricular zone. *Nat Rev Neurosci.* (9):712-23.

Dahl E, Winterhager E, Traub O, Willecke K. (1995). Expression of gap junction genes, connexin40 and connexin43, during fetal mouse development. *Anat Embryol (Berl).* 191:267-78.

De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, Ponzetto C, Cossu G. (1999). Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol.* 147:869-78.

De Sousa PA, Valdimarsson G, Nicholson BJ, Kidder GM. (1993). Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos. *Development.* 117:1355-67.

de Wit C, Hoepfl B, Wölfle SE. (2006). Endothelial mediators and communication through vascular gap junctions. *Biol Chem.* 387:3-9.

Dedek K, Schultz K, Pieper M, Dirks P, Maxeiner S, Willecke K, Weiler R, Janssen-Bienhold U. (2006). Localization of heterotypic gap junctions composed of connexin45 and connexin36 in the rod pathway of the mouse retina. *Eur J Neurosci.* 24:1675-86.

Dedieu S, Dourdin N, Dargelos E, Poussard S, Veschambre P, Cottin P, Brustis JJ. (2002). Calpain and myogenesis: development of a convenient cell culture model. *Biol Cell*. 94:65-76.

Degen J, Meier C, Van Der Giessen RS, Söhl G, Petrasch-Parwez E, Urschel S, Dermietzel R, Schilling K, De Zeeuw CI, Willecke K. (2004). Expression pattern of lacZ reporter gene representing connexin36 in transgenic mice. *J Comp Neurol*. 473:511-25.

Delmar M, Coombs W, Sorgen P, Duffy HS, Taffet SM. (2004). Structural bases for the chemical regulation of Connexin43 channels. *Cardiovasc Res*.62:268-75.

Desplantez T, Halliday D, Dupont E, Weingart R. (2004). Cardiac connexins Cx43 and Cx45: formation of diverse gap junction channels with diverse electrical properties. *Pflugers Arch*. 448:363-75.

Dillon N, Grosveld F. (1993). Transcriptional regulation of multigene loci: multilevel control. *Trends Genet*. 9:134-7.

Dobrowolski R, Sommershof A, Willecke K. (2006) Some oculodentodigital dysplasia-associated Cx43 mutations cause increased hemichannel activity in addition to deficient gap junction channels. *J Membr Biol*. 219:9-17.

Dobrzynski,H., Nikolski,V.P., Sambelashvili,A.T., Greener,I.D., Yamamoto,M., Boyett,M.R., and Efimov,I.R. (2003). Site of origin and molecular substrate of atrioventricular junctional rhythm in the rabbit heart. *Circ. Res*. 93, 1102-1110.

Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*. 17:5046-61.

Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 97:703-16.

Döring,B. (2005). Erzeugung und Charakterisierung verschiedener Mauslinien zur zelltypspezifischen Deletion, Expression und Substitution von Connexingenen. Dissertation. Universität Bonn.

Döring B, Shynlova O, Tsui P, Eckardt D, Janssen-Bienhold U, Hofmann F, Feil S, Feil R, Lye SJ, Willecke K. (2006). Ablation of connexin43 in uterine smooth muscle cells of the mouse causes delayed parturition. *J Cell Sci* 119:1715-22.

Döring B, Pfitzer G, Adam B, Liebrechts T, Eckardt D, Holtmann G, Hofmann F, Feil S, Feil R, Willecke K. (2007). Ablation of connexin43 in smooth muscle cells of the mouse intestine: functional insights into physiology and morphology. *Cell Tissue Res*. 327:333-42.

Dourdin N, Balcerzak D, Brustis JJ, Poussard S, Cottin P, Ducastaing A. (1999). Potential m-calpain substrates during myoblast fusion. *Exp Cell Res*. 246:433-42.

- Eiberger J, Degen J, Romualdi A, Deutsch U, Willecke K, Söhl G. (2001) Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell Commun Adhes.* 8:163-5.
- Elfang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., Hulser, D.F., and Willecke, K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* 129, 805-817.
- Euwens C. (2007), Herstellung einer genetisch veränderten Maus mit einem Fusionsprotein aus Connexin 45 und CFP oder GFP Dissertation, Universität Bonn
- Evans MJ, Kaufman MH. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 292:154-156.
- Falk MM, Lauf U. (2001). High resolution, fluorescence deconvolution microscopy and tagging with the autofluorescent tracers CFP, GFP, and YFP to study the structural composition of gap junctions in living cells. *Microsc Res Tech.* 52:251-62.
- Feigenspan A, Janssen-Bienhold U, Hormuzdi S, Monyer H, Degen J, Söhl G, Willecke K, Ammermüller J, Weiler R. (2004). Expression of connexin36 in cone pedicles and OFF-cone bipolar cells of the mouse retina. *J Neurosci.* 24:3325-34.
- Filippov MA, Hormuzdi SG, Fuchs EC, Monyer H. (2003). A reporter allele for investigating connexin 26 gene expression in the mouse brain. *Eur J Neurosci.* 18:3183-92.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391:806-11.
- Francis D, Stergiopoulos K, Ek-Vitorín JF, Cao FL, Taffet SM, Delmar M. (1999). Connexin diversity and gap junction regulation by pHi. *Dev Genet.* 24:123-36.
- Friday BB, Horsley V, Pavlath GK. (2000). Calcineurin activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation. *J Cell Biol.* 149:657-66.
- Fróes MM, Menezes JR. (2002). Coupled heterocellular arrays in the brain. *Neurochem Int.* 41:367-75.
- Fukuda T, Kosaka T. (2003). Ultrastructural study of gap junctions between dendrites of parvalbumin-containing GABAergic neurons in various neocortical areas of the adult rat. *Neuroscience.* 120:5-20.
- Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Bouwer J, Tour O, Laird DW, Sosinsky GE, Tsien RY, Ellisman MH. (2002). Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science.* 296:503-7.
- Giepmans BN, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM, Moolenaar WH. Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol.* 2001;11:1364-1368.

Goldberg GS, Valiunas V, Brink PR. (2004). Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta.*1662:96-101.

Goligorsky MS, Iijima K, Krivenko Y, Tsukahara H, Hu Y, Moore LC. (1997). Role of mesangial cells in macula densa to afferent arteriole information transfer. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 24:527-31.

Gorbe A, Krenacs T, Cook JE, Becker DL. (2007). Myoblast proliferation and syncytial fusion both depend on connexin43 function in transfected skeletal muscle primary cultures. *Exp Cell Res.* 313:1135-48.

Gordon JW, Ruddle FH. (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science.* 214:1244-6.

Gourdie,R.G., Severs,N.J., Green,C.R., Rothery,S., Germroth,P., and Thompson,R.P. (1993). The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system. *J. Cell Sci.* 105, 985-991.

Gros DB, Alcoléa S, Dupays L, Meysen S, Théveniau-Ruissy M, Teunissen BEJ, Bierhuizen MFA (2005). Connexins in Cardiac Development: Expression, Role, and Transcriptional Control. In: *Gap Junctions in Development and Disease*, Winterhager E (ed). Springer, pp. 29–56.

Grounds MD. (2002) Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: a central role for IGF-1 signalling. *Biogerontology.* 3:19-24.

Hamilton CM, Aldea M, Washburn BK, Babitzke P, Kushner SR. (1989) New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 171:4617-22.

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166: 557-80.

Hansson,E., Muyderman,H., Leonova,J., Allansson,L., Sinclair,J., Blomstrand,F., Thorlin,T., Nilsson,M., and Ronnback,L. (2000). Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem. Int.* 37, 317-329.

Hawke TJ, Garry DJ. (2001).Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol.* 2001 Aug;91(2):534-51. Review. Erratum in: *J Appl Physiol* 91:2414.

Heintz N. (2001).BAC to the future: the use of bac transgenic mice for neuroscience research. *Nat Rev Neurosci.* 2:861-70.

Hoess RH, Abremski K. (1984) Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81:1026-1029.

Hombach S, Janssen-Bienhold U, Söhl G, Schubert T, Büssow H, Ott T, Weiler R, Willecke K. (2004). Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina.

Eur J Neurosci. 19:2633-40.

Hormuzdi SG, Filippov MA, Mitropoulou G, Monyer H, Bruzzone R. (2004). Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. Biochim Biophys Acta. 1662:113-37.

Horsley V, Friday BB, Matteson S, Kegley KM, Gephart J, Pavlath GK. (2001). Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATC2-dependent pathway. J Cell Biol. 153:329-38.

Horsley V, Pavlath GK. (2004). Forming a multinucleated cell: molecules that regulate myoblast fusion. Cells Tissues Organs. 176:67-78.

Huang GY, Cooper ES, Waldo K, Kirby ML, Gilula NB, Lo CW. (1998). Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. J Cell Biol. 143:1725-34.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. Science. 293:834-8.

Hutvagner G, Zamore PD. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. Science. 297:2056-60.

Ioannou PA, Amemiya CT, Garnes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer MA, de Jong PJ. (1994). A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. Nat Genet. 6:84-9.

Jaenisch R. (1988). Transgenic animals. Science. 240:1468-74.

Jones HW Jr, McKusick VA, Harper PS, Wu KD. (1971). George Otto Grey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. Obstet Gynecol. 38: 945-49.

Jordan K, Chodock R, Hand AR, Laird DW. (2001). The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. J Cell Sci. 114: 763-73.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. Principles of neural science. Appleton & Lange, third edition.

Kennison JA. (1993). Transcriptional activation of Drosophila homeotic genes from distant regulatory elements. Trends Genet. 9:75-9.

King TJ, Lampe PD. (2005). Temporal regulation of connexin phosphorylation in embryonic and adult tissues. Biochim Biophys Acta. 1719:24-35.

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

Koval M. (2006). Pathways and control of connexin oligomerization. *Trends Cell Biol.* 16:159-66.

Kreuzberg MM, Deuchars J, Weiss E, Schober A, Sonntag S, Wellershaus K, Draguhn A, Willecke K. (2008). Expression of connexin30.2 in interneurons of the central nervous system in the mouse. *Mol Cell Neurosci.* 37:119-34.

Kreuzberg MM, Söhl G, Kim JS, Verselis VK, Willecke K, Bukauskas FF. (2005). Functional properties of mouse connexin30.2 expressed in the conduction system of the heart. *Circ Res.* 96:1169-77.

Krüger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, Willecke K. (2000) Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development.* 127:4179-93.

Krysko DV, Leybaert L, Vandenabeele P, D'Herde K. (2005). Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals. *Apoptosis.* 10:459-69.

Kühn R, Schwenk F.(1997). Advances in gene targeting methods. *Curr. Opin. Immunol.* 9:183-188

Kumai,M., Nishii,K., Nakamura,K., Takeda,N., Suzuki,M., and Shibata,Y. (2000). Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development.* 127, 3501-3512.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-05.

Laflamme MA, Murry CE. (2005). Regenerating the heart. *Nat Biotechnol.* 23:845-56.

Laing JG, Koval M, Steinberg TH. (2005). Association with ZO-1 correlates with plasma membrane partitioning in truncated connexin45 mutants. *J Membr Biol.* 207:45-53.

Laing JG, Manley-Markowski RN, Koval M, Civitelli R, Steinberg TH. (2001). Connexin45 interacts with zonula occludens-1 in osteoblastic cells. *Cell Commun Adhes.* 8:209-12.

Laird DW. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J.* 394:527-43.

Lampe PD, Lau AF. (2000). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:1171-86.

- Landisman CE, Long MA, Beierlein M, Deans MR, Paul DL, Connors BW. (2002). Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *J Neurosci.* 22:1002-9.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *425:415-9.*
- Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S. (2003). Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:7808-11.
- Lewandoski M.(2001) Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* 2:743-755
- Li S, Czubyrt MP, McAnally J, Bassel-Duby R, Richardson JA, Wiebel FF, Nordheim A, Olson EN (2005). Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *PNAS* 102: 1082-87.
- Li X, Simard JM. (2001). Connexin45 gap junction channels in rat cerebral vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*281(5):H1890-8.
- Ling Y, Appelt D, Kelly AM, Franzini-Armstrong C. (1992).Differences in the histogenesis of EDL and diaphragm in rat. *Dev Dyn.* 193:359-69.
- Litvin O, Tiunova A, Connell-Alberts Y, Panchin Y, Baranova A. (2006). What is hidden in the pannexin treasure trove: the sneak peek and the guesswork. *J Cell Mol Med.* 10:613-34.
- Locovei S, Bao L, Dahl G. (2006). Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:7655-9.
- Locovei S, Wang J, Dahl G. (2006) Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett.* 580:239-44.
- Magin,T.M., McWhir,J., and Melton,D.W. (1992). A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res.* 20, 3795- 3796.
- Marins M, Moura Neto V, Fróes MM & Menezes JR (2001). Gap junctions are involved in the migration and proliferation of postnatal subventricular zone cells. *Society for Neuroscience Abstracts*, 27: 248.5.
- Martin AO, Mathieu MN, Chevillard C, und Guerineau NC. (2001). Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca²⁺ increases between chromaffin cells in adrenal slices: A role in catecholamine release. *J Neurosci* 21:5397-5405.

- Martin GR. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.78:7634-7638.
- Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC. (2002). Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res*. 90:1100-7.
- Maxeiner S, Krüger O, Schilling K, Traub O, Urschel S, Willecke K. (2003). Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience*. 119:689-700.
- Meister G, Tuschl T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 431:343-9.
- Menezes JR, Fróes MM, Moura Neto V, Lent R. (2000). Gap junction-mediated coupling in the postnatal anterior subventricular zone. *Dev Neurosci*. 22:34-43.
- Menezes JR, Marins M, Alves JA, Froes MM, Hedin-Pereira C. (2002). Cell migration in the postnatal subventricular zone. *Braz J Med Biol Res*. 35:1411-21.
- Meşe G, Richard G, White TW (2007). Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*. 127:2516-24.
- Minkoff R, Bales ES, Kerr CA, Struss WE. (1999). Antisense oligonucleotide blockade of connexin expression during embryonic bone formation: evidence of functional compensation within a multigene family. *Dev Genet*. 24:43-56.
- Moorman,A.F. and Christoffels,V.M. (2003). Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Rev*. 83, 1223-1267.
- Moreno AP, Laing JG, Beyer EC, Spray DC. (1995). Properties of gap junction channels formed of connexin 45 endogenously expressed in human hepatoma (SKHep1) cells. *Am J Physiol*. 268:C356-65.
- Mullis KB, Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 155: 335-50.
- Murry CE, Field LJ, Menasché P. (2005). Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation*. 112:3174-83.
- Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. (2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 428:664-8.
- Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. (1996). Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest*.98:2512-23.

Musil LS, Le AC, VanSlyke JK, Roberts LM. (2000). Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem.* 275:25207-15.

Mystkowska ET, Ozdzeński W, Niemierko A. (1979). Factors regulating the degree and extent of experimental chimaerism in the mouse. *J Embryol Exp Morphol.* 51:217-25.

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

Nagy A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis.* 26:99-109.

Navar LG, Inscho EW, Majid SA, Imig JD, Harrison-Bernard LM, Mitchell KD. (1996). Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev.* 76:425-536.

Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J. (2005) Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature.* 434:83-8.

Netter, F.H. (1993). *Atlas der Anatomie des Menschen.* Ciba Geigy, fourth edition.

Nicholson BJ, Weber PA, Cao F, Chang H, Lampe P, Goldberg G. (2000). The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Braz J Med Biol Res* 33:369-78.

Niessen, H., Harz, H., Bedner, P., Kramer, K., and Willecke, K. (2000). Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Cell Sci.* 113, 1365-1372.

Ninkovic J, Götz M. (2007). Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks. *Curr Opin Neurobiol.* 17:338-44.

Nishii, K., Kumai, M., Egashira, K., Miwa, T., Hashizume, K., Miyano, Y., and Shibata, Y. (2003). Mice lacking connexin45 conditionally in cardiac myocytes display embryonic lethality similar to that of germline knockout mice without endocardial cushion defect. *Cell Commun. Adhes.* 10, 365-369.

O'Connor M, Peifer M, Bender W. (1989). Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science.* 244:1307-12.

Odermatt B, Wellershaus K, Wallraff A, Seifert G, Degen J, Euwens C, Fuss B, Büssow H, Schilling K, Steinhäuser C, Willecke K. (2003). Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS. *J Neurosci.* 23:4549-59.

- Ordahl CP, Williams BA, Denetclaw W. (2000). Determination and morphogenesis in myogenic progenitor cells: an experimental embryological approach. *Curr Top Dev Biol.* 48:319-67.
- Panchin YV. (2005) Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. *J Exp Biol.* 208:1415-9.
- Parker MH, Seale P, Rudnicki MA. (2003). Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet.*4:497-507.
- Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, Innis JW, Dinulos MB, Christian C, Hannibal MC, Jabs EW. (2003). Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet.* 72:408-18.
- Peracchia C, Sotkis A, Wang XG, Peracchia LL, Persechini A. (2000). Calmodulin directly gates gap junction channels. *J Biol Chem.* 275:26220-4.
- Peracchia C. (2004). Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochim Biophys Acta.*1662:61-80.
- Pereda A, O'Brien J, Nagy JI, Bukauskas F, Davidson KG, Kamasawa N, Yasumura T, Rash JE. (2003).Connexin35 mediates electrical transmission at mixed synapses on Mauthner cells. *J Neurosci.* 23:7489-503.
- Pereda A, O'Brien J, Nagy JI, Smith M, Bukauskas F, Davidson KG, Kamasawa N, Yasumura T, Rash JE. (2003). Short-range functional interaction between connexin35 and neighboring chemical synapses. *Cell Commun Adhes.* 10:419-23.
- Perkins GA, Goodenough DA, Sosinsky GE. (1998). Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30 degree rotation for interdigitating two apposing connexons. *J Mol Biol.* 277:171-7.
- Phelan P. (2005) Innexins: members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1711:225-45.
- Plum A, Hallas G, Magin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher B, Wolpert C, Kim JS, Lamers WH, Evert M, Meda P, Traub O, Willecke K. (2000). Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol.* 10:1083-1091.
- Pourquié O. (2001). Vertebrate somitogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:311-50.
- Przybylski RJ, Sziget V, Davidheiser S, Kirby AC. (1994). Calcium regulation of skeletal myogenesis. II. Extracellular and cell surface effects. *Cell Calcium.* 15:132-42.
- Rackauskas M, Kreuzberg MM, Pranevicius M, Willecke K, Verselis VK, Bukauskas FF. (2007). Gating properties of heterotypic gap junction channels formed of connexins 40, 43, and 45. *Biophys J.* 92:1952-65..

Rackauskas M, Verselis VK, Bukauskas FF. (2007). Permeability of homotypic and heterotypic gap junction channels formed of cardiac connexins mCx30.2, Cx40, Cx43, and Cx45. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293:H1729-36.

Rash JE, Davidson KG, Kamasawa N, Yasumura T, Kamasawa M, Zhang C, Michaels R, Restrepo D, Ottersen OP, Olson CO, Nagy JI. (2005) Ultrastructural localization of connexins (Cx36, Cx43, Cx45), glutamate receptors and aquaporin-4 in rodent olfactory mucosa, olfactory nerve and olfactory bulb. *Neurocytol.* 34:307-41.

Rash JE, Dillman RK, Bilhartz BL, Duffy HS, Whalen LR, Yasumura T. (1996). Mixed synapses discovered and mapped throughout mammalian spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:4235-9.

Rash JE, Staines WA, Yasumura T, Patel D, Furman CS, Stelmack GL, Nagy JI. (2000). Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:7573-8.

Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J. (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science.*267:1831-1834.

Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD, Murry CE. (2000). Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol.* 149:731-40.

Reinecke H, Minami E, Virag JI, Murry CE. (2004). Gene transfer of connexin43 into skeletal muscle. *Hum Gene Ther.* 15:627-36.

Ren Y, Carretero OA, Garvin JL. (2002). Role of mesangial cells and gap junctions in tubuloglomerular feedback. *Kidney Int.* 62:525-31.

Revel JP, Karnovsky MJ. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol.* 33: C7-12.

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, 139-140.

Roell W, Fan Y, Xia Y, Stoecker E, Sasse P, Kolossov E, Bloch W, Metzner H, Schmitz C, Addicks K, Hescheler J, Welz A, Fleischmann BK. (2002). Cellular cardiomyoplasty in a transgenic mouse model. *Transplantation.* 73:462-5.

Roell W, Lewalter T, Sasse P, Tallini YN, Choi BR, Breitbach M, Doran R, Becher UM, Hwang SM, Bostani T, von Maltzahn J, Hofmann A, Reining S, Eiberger B, Gabris B, Pfeifer A, Welz A, Willecke K, Salama G, Schrickel JW, Kotlikoff MI, Fleischmann BK. (2007). Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature.* 450:819-24.

Roerig B, Feller MB. (2000). Neurotransmitters and gap junctions in developing neural circuits. *Brain Res Brain Res Rev.* 32:86-114.

Rouach N, Segal M, Koulakoff A, Giaume C, Avignone E. (2003). Carbenoxolone blockade of neuronal network activity in culture is not mediated by an action on gap junctions. *J Physiol.* 553:729-45.

Rummery NM, Hill CE. (2004). Vascular gap junctions and implications for hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 31:659-67.

Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. (2003) Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.* 83:1359-400.

Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA. (2000). Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. *Circ Res.*86:723-8.

Scherer SS, Deschênes SM, Xu YT, Grinspan JB, Fischbeck KH, Paul DL. (1995). Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci.* 15:8281-94.

Schlieker C. Reinigung der C-terminalen Domäne des Ratten Connexin43 Proteins nach Expressionsklonierung in Bakterien, Hefen und Insektenzellen. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. 2000.

Schwarz HJ, Chang YS, Hennemann H, Dahl E, Lalley PA, Willecke K. (1992). Chromosomal assignments of mouse connexin genes, coding for gap junctional proteins, by somatic cell hybridization. *Somat Cell Mol Genet.* 18:351-9.

Seigneurin-Venin S, Parrish E, Marty I, Rieger F, Romey G, Villaz M, Garcia L. (1996). Involvement of the dihydropyridine receptor and internal Ca²⁺ stores in myoblast fusion. *Exp Cell Res.* 223:301-7.

Severs NJ, Dupont E, Coppens SR, Halliday D, Inett E, Baylis D, Rothery S. (2004). Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease. *Biochim Biophys Acta.* 1662:138-48.

Shashikant CS, Ruddle FH. (2003). Impact of transgenic technologies on functional genomics. *Curr Issues Mol Biol.* 5:75-98.

Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S. (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science.* 304:1338-40.

Shestopalov VI and Panchin Y. (2008) Pannexins and gap junction protein diversity. *Cell Mol Life Sci.* 65:376-94.

- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:8794-7.
- Söhl G, Degen J, Teubner B, Willecke K. (1998). The murine gap junction gene *connexin36* is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. *FEBS Lett.* 428:27-31.
- Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. (2005). Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci.* 6:191-200.
- Söhl G, Willecke K. (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes.*10:173-80
- Song H, Stevens CF, Gage FH. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature.* 417:39-44.
- Soonpaa MH, Field LJ. (1998). Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res.*83:15-26.
- Southern EM. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98: 503-17.
- Spray DC, Burt JM. (1990). Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am J Physiol.* 258:C195-205.
- Squecco R, Sassoli C, Nuti F, Martinesi M, Chellini F, Nosi D, Zecchi-Orlandini S, Francini F, Formigli L, Meacci E. (2006). Sphingosine 1-phosphate induces myoblast differentiation through Cx43 protein expression: a role for a gap junction-dependent and -independent function. *Mol Biol Cell.* 17:4896-910.
- Stout C, Goodenough DA, Paul DL. (2004). Connexins: functions without junctions. *Curr Opin Cell Biol.* 16:507-12.
- Suzuki K, Brand NJ, Allen S, Khan MA, Farrell AO, Murtuza B, Oakley RE, Yacoub MH. (2001). Overexpression of connexin 43 in skeletal myoblasts: Relevance to cell transplantation to the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 122:759-66.
- Takeda Y, Ward SM, Sanders KM, Koh SD. (2005). Effects of the gap junction blocker glycyrrhetic acid on gastrointestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 288:G832-41.
- Theis M, Magin TM, Plum A, Willecke K. (2000). General or cell type-specific deletion and replacement of connexin-coding DNA in the mouse. *Methods.* 20:205-18.
- Theis M, Söhl G, Eiberger J, Willecke K. (2005). Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci.* 28:188-95.

- Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RH. (2002). The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet.* 36:489-519.
- Todorova MG, Soria B, Quesada I. (2008). Gap junctional intercellular communication is required to maintain embryonic stem cells in a non-differentiated and proliferative state. *J Cell Physiol.* 214:354-62.
- Tronche F, Casanova E, Turiault M, Sahly I, Kellendonk C. (2002). When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice. *FEBS Lett.* 529:116-121.
- Tsien RY. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 67:509-44.
- Turco JJ, Kriegstein AR.(1991). Clusters of coupled neuroblasts in embryonic neocortex. *Science.* 252:563-6.
- Turco JJ, Kriegstein AR. (1995). Clusters of coupled neuroblasts in embryonic neocortex. *Science.*252:563-6.
- Unwin PN, Ennis PD. (1983). Calcium-mediated changes in gap junction structure: evidence from the low angle X-ray pattern. *J Cell Biol.*97:1459-66.
- Valiunas V. (2002). Biophysical properties of connexin-45 gap junction hemichannels studied in vertebrate cells. *J Gen Physiol.* 119:147-64.
- Valiunas V, Polosina YY, Miller H, Potapova IA, Valiuniene L, Doronin S, Mathias RT, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS, Brink PR. (2005) Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J Physiol.* 568:459-68.
- van Veen AA, van Rijen HV, Opthof T. (2001).Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res.* 51: 217-29.
- van Veen TA, van Rijen HV, Jongsma HJ. (2000). Electrical conductance of mouse connexin45 gap junction channels is modulated by phosphorylation. *Cardiovasc Res.* 46:496-510.
- Veenstra RD, Wang HZ, Beyer EC, Brink PR. (1994). Selective dye and ionic permeability of gap junction channels formed by connexin45. *Circ Res.* 75: 483-90.
- Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. (2006). Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer.* 6:425-36.
- Vogt A, Hormuzdi SG, Monyer H. (2005). Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 141:113-20.
- von Maltzahn, Julia (2003). Ausprägung des Connexin39 Gens der Maus, Diplomarbeit, Universität Bonn

- von Maltzahn J, Euwens C, Willecke K, Söhl G. (2004). The novel mouse connexin39 gene is expressed in developing striated muscle fibers. *J Cell Sci.* 117:5381-92.
- von Maltzahn J, Willecke K (2005). Essential role of gap junctions during development and regeneration of skeletal muscle. In: *Gap Junctions in Development and Disease*, Winterhager E (ed). Springer, pp. 13–27.
- von Maltzahn J, Wulf V, Willecke K. (2006). Spatiotemporal expression of connexin 39 and -43 during myoblast differentiation in cultured cells and in the mouse embryo. *Cell Commun Adhes.* 13:55-60
- Wagner C. (2008). Function of connexins in the renal circulation. *Kidney Int.* 73:547-55.
- Wang YF, Daniel EE. (2001). Gap junctions in gastrointestinal muscle contain multiple connexins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281:G533-43.
- Wellershaus K, Degen J, Deuchars J, Theis M, Charollais A, Caille D, Gauthier B, Janssen-Bienhold U, Sonntag S, Herrera P, Meda P, Willecke K. (2008). A new conditional mouse mutant reveals specific expression and functions of connexin36 in neurons and pancreatic beta-cells. *Exp Cell Res.* 314:997-1012.
- Wigmore PM, Dunglison GF. (1998). The generation of fiber diversity during myogenesis. *Int J Dev Biol.* 42:117-25.
- Willecke, K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M, Deutsch U, Söhl G. (2002). Structural and Functional Diversity of Connexin Genes in the Mouse and Human Genome. *Biol Chem.* 383: 725-737.
- Willecke K, Eiberger J and von Maltzahn J (2005). Connexin and Pannexin Genes in the Mouse and Human Genome. In: *Gap Junctions in Development and Disease*, Winterhager E (ed). Springer, pp. 1–12.
- Winterhager E, Pielensticker N, Freyer J, Ghanem A, Schrickel JW, Kim JS, Behr R, Grümmner R, Maass K, Urschel S, Lewalter T, Tiemann K, Simoni M, 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.
- Wolff KD, Stiller D. (1993). Ischemia tolerance of free-muscle flaps: an NMR-spectroscopic study in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 91:485-91.
- Wörsdörfer P, Maxeiner S, Markopoulos C, Kirfel G, Wulf V, Auth T, Urschel S, von Maltzahn J, Willecke K. (2008). Connexin expression and functional analysis of gap junctional communication in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* 26:431-9.
- Wulf V. (2006). Untersuchungen zur Überexpression von Connexin43 in der Skelettmuskulatur transgener Mäuse. Diplomarbeit, Universität Bonn

Yaffe D, Saxel O. (1977). A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation*. 7:159-66.

Yang XW, Model P, Heintz N. (1997). Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat Biotechnol*. 15:859-65.

Zappalà A, Cicero D, Serapide MF, Paz C, Catania MV, Falchi M, Parenti R, Pantò MR, La Delia F, Cicirata F. (2006). Expression of pannexin1 in the CNS of adult mouse: cellular localization and effect of 4-aminopyridine-induced seizures. *Neuroscience*. 141:167-78.

Zappalà A, Li Volti G, Serapide MF, Pellitteri R, Falchi M, La Delia F, Cicirata V, Cicirata F. (2007). Expression of pannexin2 protein in healthy and ischemized brain of adult rats. *Neuroscience*. 148:653-67.

Zhang YW, Kaneda M, Morita I. (2003). The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *J Biol Chem*. 278:44852-6.

Zimmer R, Verrinder Gibbins AM. (1997). Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics*. 42:217-26.

Zoidl G, Dermietzel R. (2002) On the search for the electrical synapse: a glimpse at the future. *Cell Tissue Res*. 310:137-42.

Publikationsliste

von Maltzahn J, Euwens C, Willecke K, Söhl G. (2004). The novel mouse connexin39 gene is expressed in developing striated muscle fibers. *J Cell Sci.* 117:5381-92.

von Maltzahn J, Willecke K (2005). Essential role of gap junctions during development and regeneration of skeletal muscle. In: *Gap Junctions in Development and Disease*, Winterhager E (ed). Springer, pp. 13–27.

Willecke K, Eiberger J and **von Maltzahn J** (2005). Connexin and Pannexin Genes in the Mouse and Human Genome. In: *Gap Junctions in Development and Disease*, Winterhager E (ed). Springer, pp. 1–12.

von Maltzahn J, Wulf V, Willecke K. (2006). Spatiotemporal expression of connexin 39 and -43 during myoblast differentiation in cultured cells and in the mouse embryo. *Cell Commun Adhes.* 13:55-60

Roell W, Lewalter T, Sasse P, Tallini YN, Choi BR, Breitbach M, Doran R, Becher UM, Hwang SM, Bostani T, **von Maltzahn J**, Hofmann A, Reining S, Eiberger B, Gabris B, Pfeifer A, Welz A, Willecke K, Salama G, Schrickel JW, Kotlikoff MI, Fleischmann BK. (2007). Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature.* 450:819-24.

Wörsdörfer P, Maxeiner S, Markopoulos C, Kirfel G, Wulf V, Auth T, Urschel S, **von Maltzahn J**, Willecke K. (2008). Connexin expression and functional analysis of gap junctional communication in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* 26:431-9.

Hanner F, **von Maltzahn J**, Maxeiner S, Toma I, Sipos A, Krüger O, Willecke K and Peti-Peterdi J (2008). Connexin45 is expressed in the juxtaglomerular apparatus and is involved in the regulation of renin secretion and blood pressure. *Am J Physiol-Reg I.* Zur Veröffentlichung eingereicht.