# Expression und Lokalisation von Pannexinen und Connexinen in der äußeren Retina der Maus

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) angenommene Dissertation

von Petra Bolte

geboren am 06.06.1974 in Leer

Gutachter: Prof. Dr. Reto Weiler

Zweitgutachter: Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch

1

Tag der Disputation: 30.11.2011

### Erklärung

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

Petra Bolte

### Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Reto Weiler für die Überlassung des interessanten Themas und das Vertrauen, das mir ein selbstständiges Bearbeiten der Fragestellung und das Verfolgen eigener Ideen erlaubte. Trotz der überlassenen Freiheit war Reto jederzeit für ein Gespräch bereit und hat mich durch viele wertvolle Ratschläge, aufmunternde Worte und anregende Diskussionen sehr unterstützt.

Herrn Prof. Karl-Wilhelm Koch danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Vielen Dank an Dr. Karin Dedek für das kritische Lesen dieser Arbeit und der Unterstützung bei der Publikation der Daten. Karin stand immer für ein Gespräch zur Verfügung und hat mich sowohl fachlich als auch persönlich durch wertvolle Ratschläge und Tipps unterstützt.

Bei apl. Prof. Ulrike Janssen-Bienhold möchte ich mich für die fachliche Beratung, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

Einen ganz herzlichen Dank an apl. Prof. Josef Ammermüller, Dr. Konrad Schultz, Regina Herrling, Katharina Schmidt, Susanne Wallenstein, Bettina Kewitz, Hoto Meyer, Gerrit Hilgen und alle anderen Mitglieder der AG Neurobiology in Oldenburg für die Unterstützung im Labor, viele hilfreiche Diskussionen und eine sehr gute Zusammenarbeit.

Mein größter Dank geht an meinen Mann Christian, der mir immer zugehört und mich ermutigt hat, mit mir über meine Ergebnisse diskutierte und mich in schwierigen Phasen immer wieder motivierte.

### Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	DNA-Kopie einer mRNA
Сх	Connexin
DAB	Diaminobenzidin
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: -acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et altera
ETOH	Ethanol
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
КО	Knock-out
Μ	molar
mGluR6	metabotroper Glutamatrezeptor
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA
Panx	Pannexin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-
	Kettenreaktion)
RT	reverse Transkriptase
WT	Wildtyp

### Anglizismen

Antisense-Sonde	RNA-Einzelstrang-Sonde, mit einer zum Sinnstrang
	komplementären Sequenz
Accession-Number	Identifikationsnummer von Datenbank-Sequenzen
Alignment	Sequenzvergleich
Amplifikation	Vervielfältigung von DNA-Fragmenten
Amplikon	durch eine PCR vervielfältigtes DNA-Fragment
Annealing-Temperatur	Temperatur, bei der die Primer einer PCR an die
	Matrizen-DNA hybridisieren
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool; Suchwerkzeug
	einer Sequenzdatenbank
Forward Primer	Vorwärts- <i>Primer</i>
Insert	vektorfremde, einklonierte DNA
Kit	kommerziell erhältliche Reagenzien-Kombinationen für
	spezifische Versuchsmethoden
Knock-out-Maus	Maus, in der ein Gen ausgeschaltet wurde
Multiple Cloning Site	Klonierungsstelle innerhalb eines Vektors, an der sich
	Erkennungssequenzen für verschiedene
	Restriktionsenzyme befinden
Nested-PCR	verschachtelte PCR
Primer	Oligonukleotide als Start-DNA bei der PCR
Reverse	rückwärts
Sense-Sonde	RNA-Einzelstrang-Sonde, mit einer zum Sinnstrang
	identischen Sequenz
Template	Matrizen-DNA einer PCR
Unit	Einheit

# Inhaltsverzeichnis

1	EIN	ILEITUNG	1
1.1	R	Retinitis pigmentosa und die <i>Bystander</i> -Hypothese	1
1.2	G	Gap-Junction-Proteine	2
1	.2.1	Connexine	3
1	.2.2	Pannexine	6
1.3	G	Sap Junctions und die Retina	8
1	.3.1	Die Säugetier-Retina	8
1	.3.2	Photorezeptor-Signalwege	10
1	.3.3	Connexine in der Retina	10
1	.3.4	Gap Junctions zwischen Stäbchen und Zapfen	12
1	.3.1	Pannexine in der Retina	15
1.4	z	ielsetzung	16
2	MA	TERIAL UND METHODEN	17
2.1	N	laterial	17
2	.1.1	Versuchstiere und Bakterienstämme	17
2	.1.2	Zelllinien und Antikörper	17
2	.1.3	Vektoren und Primer	19
2	.1.4	DNA-Größenstandard	20
2	.1.5	Geräte und Reagenzien	20
2.2	Ρ	Puffer und Lösungen	23
2	.2.1	Puffer für die In-situ-Hybridisierung:	23
2	.2.2	Puffer für die Herstellung von Gefrierschnitten	24
2	.2.3	Lösungen für die Präparation von Plasmid-DNA	24
2	.2.4	Lösungen für die Agarosegelelektrophorese	25
2	.2.5	Medien für die Klonierung	25
2	.2.6	Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie	25
2	.2.7	Lösungen und Medien für die Immunhistochemie	26
2.3	N	lolekularbiologische Methoden	27
2	.3.1	Präparation von Gewebe	27
2	.3.2	Herstellung von Gewebeschnitten	27
2	.3.3	Präparation von Plasmid-DNA	27

2.3.4	Reinigung und Extraktion von DNA	
2.3.5	Isolierung von genomischer DNA und RNA	
2.3.6	Isolierung von mRNA aus retinalen Zellen	
2.3.7	DNase-Behandlung von mRNA	29
2.3.8	Reverse Transkription	29
2.3.9	Primer-Design	30
2.3.10	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>PCR</i> )	30
2.3.11	Nested-RT-PCR	31
2.3.12	3'- <i>RACE-PCR</i>	32
2.3.13	Agarosegel-Elektrophorese	32
2.3.14	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	
2.3.15	Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen	32
2.3.16	Zielgerichtete Mutagenese	32
2.3.17	In-situ-Hybridisierung und Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung	33
2.3.18	Ligation von DNA-Fragmenten	35
2.3.19	Transformation von DNA-Fragmenten	35
2.3.20	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	36
	wata in his shawis	
2.4 P	roteindiochemie	
2.4 P 2.5 F	unktionelle Expressionsstudien	
2.4 P 2.5 F 2.5.1	unktionelle Expressionsstudien Zellkultur	
<ul> <li>2.4 P</li> <li>2.5 F</li> <li>2.5.1</li> <li>2.5.2</li> </ul>	roteinbiochemie unktionelle Expressionsstudien Zellkultur Transiente Transfektion	
2.4 P 2.5 F 2.5.1 2.5.2 2.5.3	roteinbiochemie unktionelle Expressionsstudien Zellkultur Transiente Transfektion Immunzytochemie	
2.4 P 2.5 F 2.5.1 2.5.2 2.5.3 2.5.4	roteinbiochemie unktionelle Expressionsstudien Zellkultur Transiente Transfektion Immunzytochemie Elektrophysiologie	
<ul> <li>2.4 P</li> <li>2.5 F</li> <li>2.5.1</li> <li>2.5.2</li> <li>2.5.3</li> <li>2.5.4</li> <li>2.6 In</li> </ul>	roteinbiochemie unktionelle Expressionsstudien Zellkultur Transiente Transfektion Immunzytochemie Elektrophysiologie	
<ul> <li>2.4 P</li> <li>2.5 F</li> <li>2.5.1</li> <li>2.5.2</li> <li>2.5.3</li> <li>2.5.4</li> <li>2.6 In</li> <li>2.6.1</li> </ul>	unktionelle Expressionsstudien         Zellkultur         Transiente Transfektion         Immunzytochemie         Elektrophysiologie         nmunhistochemie         Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung	
<ul> <li>2.4 P</li> <li>2.5 F</li> <li>2.5.1</li> <li>2.5.2</li> <li>2.5.3</li> <li>2.5.4</li> <li>2.6 In</li> <li>2.6.1</li> <li>2.6.2</li> </ul>	unktionelle Expressionsstudien         Zellkultur         Transiente Transfektion         Immunzytochemie         Elektrophysiologie         nmunhistochemie         Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung         Elektronenmikroskopie	
<ul> <li>2.4 P</li> <li>2.5 F</li> <li>2.5.1</li> <li>2.5.2</li> <li>2.5.3</li> <li>2.5.4</li> <li>2.6 In</li> <li>2.6.1</li> <li>2.6.2</li> <li>3 FR</li> </ul>	unktionelle Expressionsstudien         Zellkultur         Transiente Transfektion         Immunzytochemie         Elektrophysiologie         nmunhistochemie         Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung         Elektronenmikroskopie	
<ul> <li>2.4 P</li> <li>2.5 F</li> <li>2.5.1</li> <li>2.5.2</li> <li>2.5.3</li> <li>2.5.4</li> <li>2.6.1</li> <li>2.6.2</li> <li>3 ER</li> </ul>	unktionelle Expressionsstudien         Zellkultur         Transiente Transfektion         Immunzytochemie         Elektrophysiologie         nmunhistochemie         Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung         Elektronenmikroskopie	
<ul> <li>2.4 P</li> <li>2.5 F</li> <li>2.5.1</li> <li>2.5.2</li> <li>2.5.3</li> <li>2.5.4</li> <li>2.6.1</li> <li>2.6.2</li> <li>3 ER</li> <li>3.1 E</li> </ul>	unktionelle Expressionsstudien         Zellkultur         Transiente Transfektion         Immunzytochemie         Elektrophysiologie         nmunhistochemie         Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung         Elektronenmikroskopie         GEBNISSE         tablierung der Versuchsbedingungen	
<ul> <li>2.4 P</li> <li>2.5 F</li> <li>2.5.1</li> <li>2.5.2</li> <li>2.5.3</li> <li>2.5.4</li> <li>2.6.1</li> <li>2.6.2</li> <li>3 ER</li> <li>3.1 E</li> <li>3.1.1</li> </ul>	unktionelle Expressionsstudien         Zellkultur         Transiente Transfektion         Immunzytochemie         Elektrophysiologie         nmunhistochemie         Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung         Elektronenmikroskopie         GEBNISSE         tablierung der Versuchsbedingungen         Kontrollen der Templates	
<ul> <li>2.4 P</li> <li>2.5 F</li> <li>2.5.1</li> <li>2.5.2</li> <li>2.5.3</li> <li>2.5.4</li> <li>2.6.1</li> <li>2.6.2</li> <li>3 ER</li> <li>3.1 E</li> <li>3.1.1</li> <li>3.2 K</li> </ul>	unktionelle Expressionsstudien         Zellkultur         Transiente Transfektion         Immunzytochemie         Elektrophysiologie         nmunhistochemie         Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung         Elektronenmikroskopie         GEBNISSE         tablierung der Versuchsbedingungen         Kontrollen der Templates         zeine Expression von Cx36 in Stäbchen	
<ul> <li>2.4 P</li> <li>2.5 F</li> <li>2.5.1</li> <li>2.5.2</li> <li>2.5.3</li> <li>2.5.4</li> <li>2.6.1</li> <li>2.6.2</li> <li>3 ER</li> <li>3.1.1</li> <li>3.2 K</li> <li>3.2.1</li> </ul>	unktionelle Expressionsstudien         Zellkultur         Transiente Transfektion         Immunzytochemie         Elektrophysiologie         nmunhistochemie         Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung         Elektronenmikroskopie         GEBNISSE         tablierung der Versuchsbedingungen         Kontrollen der Templates         immunhistochemischer Nachweis	
<ul> <li>2.4 P</li> <li>2.5 F</li> <li>2.5.1</li> <li>2.5.2</li> <li>2.5.3</li> <li>2.5.4</li> <li>2.6.1</li> <li>2.6.2</li> <li>3 ER</li> <li>3.1.1</li> <li>3.2 K</li> <li>3.2.1</li> <li>3.2.1</li> <li>3.2.2</li> </ul>	unktionelle Expressionsstudien         Zellkultur         Transiente Transfektion         Immunzytochemie         Elektrophysiologie         nmunhistochemie         Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung         Elektronenmikroskopie         GEBNISSE         tablierung der Versuchsbedingungen         Kontrollen der Templates         Teine Expression von Cx36 in Stäbchen         Immunhistochemischer Nachweis         Ultrastruktureller Nachweis	
<ul> <li>2.4 P</li> <li>2.5 F</li> <li>2.5.1</li> <li>2.5.2</li> <li>2.5.3</li> <li>2.5.4</li> <li>2.6.1</li> <li>2.6.2</li> <li>3 ER</li> <li>3.1.1</li> <li>3.2 K</li> <li>3.2.1</li> <li>3.2.2</li> <li>3.2.3</li> </ul>	unktionelle Expressionsstudien         Zellkultur         Transiente Transfektion         Immunzytochemie         Elektrophysiologie         nmunhistochemie         Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung         Elektronenmikroskopie         GEBNISSE         tablierung der Versuchsbedingungen         Kontrollen der Templates         Zeine Expression von Cx36 in Stäbchen         Immunhistochemischer Nachweis         Ultrastruktureller Nachweis         Keine 3'-Spleißvariante von Cx36 in Photorezeptoren	

3	3.3.1	Cx23, Cx26 und Cx29	51
З	3.3.2	Cx30, Cx30.3 und Cx31.1	53
З	3.3.3	Cx30.2 und Cx31	54
3	3.3.4	Cx32 und Cx33	56
3	3.3.5	Cx37 und Cx39	58
3	3.3.6	Cx40 und Cx43	59
З	3.3.7	Cx45 und Cx46	61
3	3.3.8	Cx47, Cx50 und Cx57	64
3	3.3.9	Analyse mit degenerierten Connexin-Primern	70
3	3.3.10	RACE-PCR mit degenerierten Connexin-Primern	73
3	3.3.11	Panx1	74
3.4	в	ildet Panx2 in Photorezeptoren mit Cx36 Gap-Junction-Kanäle?	79
З	3.4.1	Detektion von Panx2-mRNA in Photorezeptoren	79
3	3.4.2	Detektion der retinalen Panx2-Sequenz	81
3	3.4.3	Charakterisierung des Panx2-Antikörpers	82
3	3.4.4	Keine Kolokalisation von Cx36 und Panx2 in Photorezeptoren	86
3	3.4.5	Immunzytochemische Expressionsanalysen mit Panx2	87
3	3.4.6	Elektrophysiologische Expressionsanalysen mit Panx2	94
3.5	S	ubzelluläre Panx2-Expression in der Maus-Retina	98
3	3.5.1	Panx2-mRNA in Horizontal- und Müllerzellen mittels RT-PCR	98
3	3.5.2	Analyse der retinalen Panx2-Lokalisation mit einer RNA-Sonde	99
З	3.5.3	Lokalisation des Panx2-Proteins in Photorezeptoren	101
3	3.5.4	Lokalisation von Panx2-Proteinen in Horizontalzellen	104
3	3.5.5	Lokalisation von Panx2 in Bipolarzellen	105
3	3.5.6	Lokalisation des Panx2-Proteins in Müllerzellen	107
4	DIS	KUSSION	108
4.1	А	nalvse des Cx36-Kopplungspartners in Stäbchen	108
4	ŧ.1.1	Keine Expression von Cx36 in Stäbchen	
4	1.1.2	Keine Expression bekannter Connexine in Stäbchen	110
4	1.1.3	Stäbchen exprimieren Panx2, bilden aber keine Panx2-Gap-Junctions	114
4	1.1.4	Kein unbekanntes Connexin in Stäbchen	116
4	1.1.5	Ein unbekanntes Protein als Partner für Cx36 in Stäbchen?	117
42	S	ubzelluläre I okalisation von Panx2 in der Maus-Retina	118
	1.2.1	Plasmamembrankanäle aus Panx2 in Photorezeptoren	
4	1.2.2	Keine heteromeren Kanäle aus Panx2 und Panx1	
4	1.2.3	Panx2 in Plasmamembran und endoplasmatischem Retikulum?	

4	.2.4	Panx2-Kanäle in einem ephaptischen Mechanismus?	124
4	.2.5	Panx2 als ATP-freisetzender Kanal in der Retina	125
4.3	С	connexine und Panx2 im Zusammenhang mit Retinitis pigmentosa	127
5	ZUS	SAMMENFASSUNG	129
6	SUI	MMARY	132
7	LIT	ERATUR	134
8	AN	HANG	146
8.1	V	/ektorkarten	146
8.2	S	equenzierungen	147
8.3	Ρ	Primer-Sequenzen	154
8.4	G	Gensequenzen mit Primer- und Antikörperbindestellen	161
8.5	K	Collaborationen	174
8.6	L	ebenslauf	175

\_\_\_\_X

## 1 Einleitung

Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren der Säugetier-Retina sind über Gap-*Junction*-Kanäle miteinander verbunden. Die molekulare Identifikation der Gap-*Junction*-bildenden Proteine zwischen Stäbchen und Zapfen ist von großer Bedeutung für ein besseres Verständnis der Funktion dieser Kanäle im retinalen Netzwerk. Sie könnte außerdem einen Ansatz schaffen, retinale Krankheiten zu behandeln.

### 1.1 Retinitis pigmentosa und die Bystander-Hypothese

Durch Gap Junctions können möglicherweise Zelltod-induzierende Faktoren von degenerierten Stäbchen auf gesunde Zapfen übertragen werden (Abbildung 1-1). Bei Patienten, die an der Krankheit Retinitis pigmentosa leiden, könnte ein solcher "Bystander"-Effekt zum Absterben der Photorezeptoren und damit zur Erblindung führen (Ripps, 2002). Im Verlauf dieser Krankheit kommt es aufgrund eines Gendefekts zu einer Degeneration der Stäbchen-Photorezeptoren, die später auf genetisch gesunde Zapfen-Photorezeptoren übergreift (Berson, 1993; Travis, 1998). Sollten Gap Junctions zwischen Stäbchen und Zapfen einen Übertragungsweg für Zelltod-induzierende Faktoren bilden, könnte das Blockieren der Kanäle die Zapfen vor dem Absterben schützen und so eine Erblindung verhindern. Beispiele in anderen Geweben zeigen, dass die Weitergabe von endogenen Substanzen über Gap-Junction-Kanäle zwischen gesunden und apoptotischen Zellen zum Zelltod der gesunden Zellen führen kann. Zum Beispiel übertragen sterbende Gliazellen über Gap Junctions Todessignale auf ihre gesunden Nachbarzellen (Lin et al., 1998; Budd und Lipton, 1998). Auch die Ausbreitung eines ischämischen Infarkts erfolgt durch die Weitergabe von Ionen und sekundären Botenstoffen von sterbenden auf gesunde Astrozyten über Gap-Junction-Kanäle (Cotrina et al., 1998). Ein Blockieren dieser Kanäle reduzierte die Ausbreitung der Apoptose auf die benachbarten Zellen (Rawanduzy et al., 1997; Nodin et al., 2005).



**Abbildung 1-1. Die Bystander-Hypothese bei retinaler Degeneration.** Zelltod-induzierende Faktoren können möglicherweise über *Gap-Junction-*Kanäle von degenerierten Stäbchen auf gesunde Zapfen übertragen werden (Abbildung verändert nach Wässle, 2004).

#### 1.2 Gap-Junction-Proteine

*Gap-Junction*-Kanäle verbinden das Zytoplasma benachbarter eukaryotischer Zellen miteinander. Jede der miteinander verbundenen Zellen bildet dabei einen Halbkanal, der aus sechs Protein-Untereinheiten besteht und sich im Interzellularraum mit dem Halbkanal einer benachbarten Zelle verbindet. Die dadurch entstehende Pore ermöglicht den Austausch von Substanzen mit einer Größe von bis zu 1 kDa wie Ionen, Nukleotide, Aminosäuren, Wasser und Glukose.

Gap-Junction-Kanäle kommen in fast allen Körperzellen vor. Unter anderem ermöglichen sie in schwach durchbluteten Geweben wie der Augenlinse den Transport von Nährstoffen (Paul, 1995) und sind im Herzmuskel und im Nervengewebe an der schnellen Weiterleitung von Aktionspotentialen beteiligt (Spray und Dermietzel, 1995; Söhl et al., 2005). Meistens treten Gap-Junction-Kanäle in Plagues auf, die aus Tausenden einzelner Kanäle bestehen (Kumar und Gilula, 1986). Die ersten identifizierten Gap-Junction-Proteine waren die Connexine (Goodenough, 1974; Paul, 1986), die ausschließlich in Wirbeltieren zur Expression kommen. Die Innexine wurden erst wesentlich später als Gap-Junction-Proteine der Invertebraten identifiziert (Phelan et al., 1998). Connexine und Innexine besitzen keine homologen Sequenzen, zeigen jedoch dieselbe Membrantopologie mit vier membrandurchspannenden Domänen, zwei extrazellulären Schleifen, einer zytoplasmatischen Schleife und jeweils einer zytoplasmatischen amino- und carboxyterminalen Region (Abbildung 1-2 A). Eine zu den Innexinen homologe Proteinfamilie mit den gleichen Membraneigenschaften wurde im Jahr 2000 in Wirbeltieren gefunden und Pannexine genannt (Panchin et al., 2000; Baranova et al., 2004). Die Mitglieder dieser Familie wurden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten zu Connexinen und ihrer Sequenzhomologie zu den Innexinen ebenfalls als Gap-Junction-Proteine bezeichnet. Es ist jedoch umstritten, ob Pannexine tatsächlich in der Lage sind, interzelluläre Kanäle auszubilden (Shestopalov und Panchin, 2008).

Pannexin- und Connexin-Proteine finden sich in Vertebraten, während Invertebraten Innexine exprimieren. Vergleichende Sequenzanalysen ergaben allerdings, dass die Genome der Echinodermaten (Litvin *et al.*, 2006; Shestopalov und Panchin, 2008) und der Schwämme (Litvin *et al.*, 2006) weder Connexin- noch Innexin- bzw. Pannexinsequenzen besitzen (Abbildung 1-2 B). Da physiologische Daten zeigen, dass *Gap-Junction-*Kanäle in diesen Tieren existieren (Yazaki *et al.*, 1999; Mire *et al.*, 2000), könnte noch eine weitere Familie von Proteinen existieren, die in Schwämmen, Echinodermaten und vielleicht auch in Wirbeltieren *Gap-Junction*-Kanäle ausbildet (Litvin *et al.*, 2006; Shestopalov und Panchin, 2008).



**Abbildung 1-2. Struktur und Vorkommen von Pannexinen, Connexinen und Innexinen. (A)** Proteine der Connexin-, Innexin- und Pannexin-Familie besitzen vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Schleifen, eine zytoplasmatische Schleife und einen zytoplasmatischen Amino- und Carboxy-Terminus. Bei Innexinen und Connexinen formen sechs Protein-Untereinheiten einen Halbkanal, der sich mit dem Halbkanal einer benachbarten Zelle zu einem *Gap-Junction*-Kanal verbindet. **(B)** Vertebraten besitzen sowohl Pannexin- als auch Connexin-Proteine, Invertebraten exprimieren Innexine. Einige Tierstämme wie die Schwämme und die Echinodermaten besitzen funktionelle *Gap Junction*s, exprimieren aber keines der bekannten *Gap-Junction*-Proteine (Abbildungen verändert nach A: Laird, 2009; B: Shestopalov und Panchin, 2008).

#### 1.2.1 Connexine

Im Maus-Genom wurden zwanzig Connexine beschrieben (Söhl und Willecke, 2003). Sie wurden nach Sequenzhomologie und Länge der zytoplasmatischen Schleife in  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Subgruppen unterteilt. Dieses System kürzt die Connexine mit "Gj" ab, gefolgt von dem Buchstaben der jeweiligen Subgruppe und aufsteigender Nummerierung in Reihenfolge ihrer Entdeckung (Söhl und Willecke, 2003). In der vorliegenden Arbeit wird die älteste und gängigste Nomenklatur zur Einteilung der Connexine verwendet (Beyer *et al.*, 1987). Sie verwendet die Abkürzung "Cx" mit der daran angehängten Molekülmasse in kDa. Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich im Folgenden um Connexine der Maus.

Connexine werden durch zahlreiche Kombinationsmöglichkeiten zu interzellulären Kanälen mit unterschiedlichen Eigenschaften zusammengesetzt. Homomere Connexin-Halbkanäle (Connexone) bestehen aus sechs identischen Untereinheiten, während sich heteromere Connexone aus unterschiedlichen Connexinen zusammensetzen (Gemel *et al.*, 2008). Zwei identische Connexone verbinden sich zu einem homotypischen Kanal, verschiedene Connexone zu heterotypischen Gap

*Junction*s (Kumar und Gilula, 1996; Abbildung 1-3 A). Einige Connexine bilden ausschließlich homomere, homotypische *Gap Junction*s, während andere mit zahlreichen Connexinen interagieren können (Elfgang *et al.*, 1995; White *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1998). Am häufigsten finden Interaktionen zwischen stark konservierten Connexinen statt, deren Proteinsequenzen viele übereinstimmende Bereiche enthalten (Yeager und Nicholson 2000). Konservierte Regionen finden sich in den Transmembranregionen, dem N-Terminus und den extrazellulären Schleifen. Jede der zwei extrazellulären Schleifen enthält bei fast allen Connexinen drei konservierte Cysteinreste, die durch Ausbildung von Disulfid-Brücken die Kopplung zwischen zwei Connexonen stabilisieren (Dahl *et al.*, 1994). Die zytoplasmatische Schleife und der C-Terminus zeigen dagegen divergente Sequenzen (Abbildung 1-3 B).



Abbildung 1-3. Aufbau von Connexin-Gap-Junction-Kanälen. (A) Zwei Connexone in den Plasmamembranen benachbarter Zellen bilden Gap-Junction-Kanäle aus. Homomere Connexone setzen sich aus sechs gleichen, heteromere Connexone aus unterschiedlichen Connexinen zusammen. Homotypische Gap-Junction-Kanäle bestehen aus identischen, heterotypische aus verschiedenen Connexonen. (B) Connexine weisen in der zytoplasmatischen Schleife und im C-Terminus stark divergente Sequenzen auf. Alle anderen Bereiche der Connexin-Proteine enthalten mehr oder weniger stark konservierte Regionen (Abbildung verändert nach Bloomfield und Völgyi, 2009).

Bei fast allen Connexinen liegt die für das Protein codierende Region auf einem einzelnen Exon (Abbildung 1-4 A). Dabei wird meist ein untranslatiertes erstes Exon am 5'-Ende des Connexin-Gens von einem zweiten Exon durch ein Intron getrennt. Das zweite Exon enthält die codierende Sequenz und die 3' untranslatierte Region. Abweichend davon enthalten Cx30 (Söhl und Willecke, 2003) und Cx32 (Neuhaus *et al.*, 1995; Söhl *et al.*, 1996) mehrere 5' untranslatierte Exon1-Sequenzen, die je nach Gewebe unterschiedlich gespleißt werden. Cx45 besitzt drei Exons, die codierende Sequenz liegt auf dem dritten Exon (Jacob und Beyer, 2001). Es sind vier Connexine bekannt, deren codierende Sequenz auf verschiedenen Exons liegt (Abbildung 1-4 B). Bei Cx36 (Condorelli *et al.*, 1998; Söhl *et al.*, 1998) und Cx39 (Söhl und Willecke,

4

2003) codiert das erste Exon für den N-terminus des Proteins, die übrige Aminosäuresequenz liegt auf dem zweiten Exon. Die codierende Sequenz der retinalen Cx57-Form liegt auf Exon2 und Exon3 (Hombach, 2004), während die codierende Cx23-Sequenz wahrscheinlich durch zwei Introns auf drei Exons verteilt wird (Söhl und Willecke, 2003).



Abbildung 1-4. Genstruktur der Connexine. (A) Die codierende Sequenz liegt bei Connexinen in der Regel auf einem einzigen Exon (E). Die allgemeine Genstruktur besteht aus zwei Exonen, wobei die codierende Region (dunkelgrau) auf dem zweiten Exon liegt. Abweichend davon wird die 5' untranslatierte Region bei Cx30 und Cx32 alternativ gespleißt oder enthält wie bei Cx45 mehrere Exons. (B) Bei Cx36, Cx39, Cx57 und Cx23 liegt die codierende Region auf mehreren Exons. Sie befindet sich bei Cx36 und Cx39 auf Exon1 und Exon2, bei der retinalen Cx57-Sequenz auf Exon2 und Exon3 sowie bei Cx23 auf Exon1, Exon2 und Exon3 (Abbildung verändert nach Beyer und Berthoud, 2009; Söhl und Willecke, 2003).

Die Öffnungswahrscheinlichkeit der Gap-Junction-Kanäle und die Größe der Gap-Junction-Plaques kann durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert werden (Lampe und Lau, 2000). In den Nervenzellen der Retina werden Phosphorylierungen durch Neuromodulatoren wie Dopamin und Retinsäure aktiviert (Weiler et al., 2000). Bei einer Absenkung des intrazellulären pH-Wertes und einer Erhöhung der zytosolischen Kalzium-Konzentration schließen sich die Kanäle (Peracchia, 2004). Ein mechanischer Reiz und eine Absenkung der Spannungsdifferenz zwischen den Zellen öffnen die Gap-Junction-Kanäle und erhöhen damit die Signalübertragung. Neben interzellulären Kanälen bilden zahlreiche Connexine funktionelle Halbkanäle, die das Zytoplasma mit dem extrazellulären Raum verbinden (Valiunas, 2002; Schock et al., 2008; Song et al., 2010). Cx43, Cx37, Cx35, Cx32, Cx26 spielen möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung von Kalzium-Wellen durch die Freisetzung von ATP (Cotrina et al., 2000; Stout et al., 2002; Goodenough und Paul, 2003). Bei der interzellulären Ausbreitung von Kalzium-Wellen bindet das freigesetzte Purin ATP an purinerge Rezeptoren in der Membran der Nachbarzelle. Die durch ATP aktivierte zytosolische Phospholipase C lässt die Konzentration von intrazellulärem IP<sub>3</sub> und Kalzium ansteigen, woraufhin Membrankanäle sich öffnen und ATP freisetzen. Die resultierende Kalziumwelle kann im Nervengewebe die Freisetzung von Glutamat

Einleitung

bewirken und damit neuronale Interaktionen beeinflussen (Parpura und Haydon, 2000). Allerdings bleiben nur wenige Connexin-Halbkanäle, wie Cx32 und Cx30.2, bei einer Anhebung der intrazellulären Kalzium-Konzentration und einer physiologischen extrazellulären Kalzium-Konzentration geöffnet (Saez *et al.*, 2005; Bukauskas *et al.*, 2006; DeVuyst *et al.*, 2006). Connexin-Halbkanäle werden nur unter starker Depolarisation oder bei einer Reduktion des extrazellulären Kalziums auf unter 0,5 mM aktiviert (Ebihara, 2003). Eine Aktivität von Connexin-Halbkanälen unter normalen physiologischen Bedingungen, unter denen Kalzium-Wellen auftreten, ist deshalb unwahrscheinlich.

#### 1.2.2 Pannexine

Zunächst wurde angenommen, dass neben den Connexinen auch die Pannexine *Gap-Junction*-Kanäle ausbilden, da sie Sequenzhomologien zu den Innexinen besitzen, die in Invertebraten *Gap-Junction*-Kanäle aufbauen, und eine ähnliche Membranstruktur wie die Connexine aufweisen, die in Vertebraten interzelluläre Kanäle ausbilden. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Proteinfamilien besteht darin, dass Pannexine und Innexine nur zwei und nicht wie die Connexine drei Cysteine in ihren extrazellulären Schleifen aufweisen (Panchin, 2005; Shestopalov und Panchin, 2008).

Erste Expressionsstudien an *Xenopus*-Oozyten deuteten darauf hin, dass Panx1, nicht jedoch Panx2 und Panx3, homomere *Gap-Junction*-Kanäle ausbildet. Die gleichzeitige Expression von Panx2 und Panx1 veränderte die Eigenschaften der Panx1-Kanäle, was zu der Annahme führte, dass Panx2 zusammen mit Panx1 interzelluläre Kanäle ausbildet (Bruzzone *et al.*, 2003). Die Bildung von funktionellen *Gap-Junction*-Kanälen durch Pannexine konnte jedoch in nachfolgenden Experimenten nicht bestätigt werden (Boassa *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007). Panx1 besitzt im Gegensatz zu Connexinen und Innexinen Glykosylierungsstellen in den extrazellulären Schleifen (Boassa *et al.*, 2007; Penuela *et al.*, 2007; Boassa *et al.*, 2008), die eine Verbindung zu dem Halbkanal einer benachbarten Zelle unwahrscheinlich machen. Mittlerweile nimmt man an, dass Pannexine, im Unterschied zu Innexinen und Connexinen, keine *Gap Junctions* ausbilden.

Einige Studien wiesen darauf hin, dass Pannexine Kanäle ausbilden, die das Zytoplasma mit dem extrazellulären Raum verbinden (Locovei *et al.*, 2006b; Locovei *et al.*, 2007; Scemes *et al.*, 2007). Die Untersuchung von Panx1-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten ergab eine starke Leitfähigkeit von 475 pS (Bruzzone *et al.*, 2003; Bao *et al.*, 2004). Panx1-Kanäle sind durchlässig für ATP und andere Moleküle bis

6

zu einer Größe von 1,5 kDa (Wang et al., 2007), und sie spielen möglicherweise bei der Freisetzung von ATP im Zusammenhang mit purinergen Rezeptoren eine Rolle (Spray et al., 2006; Locovei et al., 2006a; Locovei et al., 2007). Purinerge ionoptrope P2X-Rezeptoren sind ATP-gesteuerte Ionenkanäle, die bei Aktivierung eine selektive Durchlässigkeit für Kationen ermöglichen, die zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration und damit zur Depolarisation führt (Edwards, 1994; Khakh et al., 2001). Die Aktivierung von purinergen metabotropen P2Y-Rezeptoren aktiviert sekundäre Botenstoffe, wobei durch die Bildung von IP<sub>3</sub> oder cAMP intrazelluläres Kalzium freigesetzt und Proteinkinasen aktiviert werden können (Ralevic und Burnstock, 1998). Purinerge Rezeptoren regulieren Funktionen wie Differenzierung, Zelltod, Wachstum und die Freisetzung von Neurotransmittern, Hormonen und Zytokinen. Panx1-Kanäle sind bei Ruhepotential geschlossen und öffnen bei einer Depolarisation, bei mechanischem Stress und bei einem Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration (Bao et al., 2004). Außerdem öffnen sich Panx1-Kanäle bei einer erhöhten extrazellulären ATP-Konzentration, wenn sie zusammen mit purinergen Rezeptoren exprimiert werden (Locovei et al., 2006a; Locovei et al., 2007). Aufgrund dieser Eigenschaften besitzt Panx1 eine potentielle Funktion als ATP-freisetzender Kanal bei der Entstehung von Kalzium-Wellen (Spray et al., 2006), wie es bereits für Connexin-Halbkanäle hypothetisiert wurde.

Über die Funktion von Panx2 ist wenig bekannt. Zunächst deuteten Versuche mit Xenopus-Oozyten darauf hin, dass Panx2 zusammen mit Panx1 heteromere Gap-Junction-Kanäle ausbildet (Bruzzone et al., 2003). Mittlerweile gilt dies als unwahrscheinlich, weil eine Glykosylierung in der extrazellulären Schleife von Panx1 die Ausbildung von Gap Junctions sterisch behindert (Penuela et al., 2007; Boassa et al., 2007). Expressionsstudien in Zelllinien von Säugetieren deuteten an, dass Panx1 möglicherweise mit Panx2 heteromere Kanäle in der Plasmamembran ausbildet (Penuela et al., 2009). Es konnte jedoch bisher weder im Gewebe (Wang et al., 2009) noch durch Expression in Zelllinien (Lai et al., 2009) gezeigt werden, dass Panx1 und Panx2 kolokalisiert vorliegen. Studien im Gehirn zeigten, dass Panx1 und Panx2 während der Entwicklung gegensätzlich reguliert werden (Vogt et al., 2005). Zusammen mit dem Befund, dass heteromere Panx1/Panx2-Kanäle bei Überexpression zwar gebildet werden, aber instabil sind (Ambrosi et al., 2010), deuten alle diese Studien an, dass Panx2 keine heteromeren Kanäle mit Panx1 ausbildet. Expressionsstudien in Säugerzellen zeigten Panx2 vorwiegend in intrazellulären Zellkompartimenten, jedoch nicht in der Plasmamembran (Penuela et *al.*, 2009; Lai *et al.*, 2007). Neuere Expressionsstudien in *Xenopus*-Oozyten zeigten, dass Panx2-Proteine homomere Kanäle aus acht Panx2-Untereinheiten ausbilden, welche die Plasmamembran mit dem extrazellulären Raum verbinden (Ambrosi *et al.*, 2009).

Während Panx1 in zahlreichen Geweben zur Expression kommt und Panx3 ausschließlich in der Haut und im Knorpel gefunden wurde, wird Panx2 vor allem im zentralen Nervensystem exprimiert (Baranova *et al.*, 2004; Vogt *et al.*, 2005; Zappala *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Swayne *et al.*, 2010). Dieser Umstand deutet darauf hin, dass die Eigenschaften für Panx2 in neuronen-spezifischen Funktionen von Bedeutung sind. Eine physiologische Funktion von Panx2 im Nervensysten konnte allerdings noch nicht demonstriert werden. Einige Studien lassen vermuten, dass Panx2 die Differenzierung neuronaler Zellen steuert (Swayne *et al.*, 2010) und als Tumorsuppressor in der Gliomagenese von Bedeutung ist (Litvin *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2009).

#### 1.3 Gap Junctions und die Retina

#### 1.3.1 Die Säugetier-Retina

Sinneseindrücke werden in der Retina zu elektrischen Impulsen verarbeitet. Die 200 µm dicke Retina enthält beim Menschen etwa 120 Millionen Nervenzellen, die in drei Kernschichten und zwei plexiformen Schichten angeordnet sind (Abbildung 1-5). In der äußeren Kernschicht liegen die Zellkörper der Photorezeptoren. Die innere Kernschicht enthält die Somata der Horizontalzellen, Bipolarzellen und Amakrinzellen, die Ganglienzellschicht die Kerne einiger Amakrinzellen und die der Ganglienzellen. In der äußeren und der inneren plexiformen Schicht finden die elektrischen und chemischen Verschaltungen zwischen den Nervenzellen statt. Bei den Müllerzellen handelt es sich um Gliazellen, die alle retinalen Schichten durchspannen.

Die Photorezeptoren verwandeln einen eintreffenden Lichtreiz in ein elektrisches Signal. Stäbchen-Photorezeptoren sind leicht erregbar und ermöglichen dadurch das Sehen bei schwachem Licht (Rieke and Baylor, 1998). Zapfen-Photorezeptoren sind weniger lichtempfindlich und lassen sich in verschiedene Typen einteilen, die bei unterschiedlichen Wellenlängen Licht absorbieren (McNaughton, 1990). Mäuse besitzen zum Beispiel ausschließlich blau-sensitive und grün-sensitive Zapfen (Szel *et al.*, 1992). Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren hyperpolarisieren als Reaktion auf einen Lichtreiz und setzen an ihren Synapsen Glutamat frei. An diesen Synapsen werden die Signale auf Bipolar- und Horizontalzellen übertragen. Horizontalzellen

wirken durch negative Rückkopplung auf Photorezeptoren zurück (Thoreson *et al.*, 2008) und modulieren die Signalweiterleitung von Photorezeptoren zu Bipolarzellen (Zhang und Wu, 2009).

In der Maus-Retina gibt es elf Zapfen-gesteuerte Bipolarzelltypen, die sich in fünf OFF- und sechs ON-Zapfen-Bipolarzellen aufteilen lassen, und eine Stäbchengesteuerte ON-Bipolarzelle (Wässle et al., 2009). OFF-Bipolarzellen besitzen ionotrope Glutamatrezeptoren und hyperpolarisieren bei einem Lichtreiz, ON-Bipolarzellen reagieren durch metabotrope Glutamatrezeptoren mit einer Depolarisation auf einen Lichtreiz (Wässle and Boycott, 1991). ON-Bipolarzellen bilden Synapsen mit den ON-Ganglienzellen, OFF-Ganglienzellen werden von OFF-Bipolarzellen kontaktiert. Während Zapfen-gesteuerte Bipolarzellen direkte Kontakte mit den Ganglienzellen ausbilden, erregen Stäbchen-gesteuerte Bipolarzellen durch Glutamatfreisetzung die All-Amakrinzellen, einen spezifischen Amakrinzelltyp. Die All-Amakrinzellen leiten das Signal an ON- und OFF-Bipolarzellen des Zapfen-Signalwegs weiter. Die All-Amakrinzelle erregt über Gap Junctions bei Licht die ON-Bipolarzellen des Zapfen-Signalwegs und inhibiert über die Freisetzung von Glyzin die OFF-Bipolarzellen (Kolb und Famiglietti, 1974; Wässle et al., 1991). Ganglienzell-Dendriten übermitteln die Signale der Bipolar- und Amakrinzellen an das Gehirn.



**Abbildung 1-5. Die Säugetier-Retina. (A)** Das lichtmikroskopische Bild der vertikalen Maus-Retina zeigt die geschichtete Struktur der neuronalen Zellen. **(B)** Die schematische Darstellung der vertikalen Retina zeigt die Kontakte der retinalen Nervenzelltypen in den plexiformen Schichten und die Lokalisation der neuronalen Zellkörper in den Kernschichten (A: Maßstab 30 µm. B: Abbildung verändert nach Webvision; Kolb, Fernandez und Nelson).

#### 1.3.2 Photorezeptor-Signalwege

Durch die Übertragung von Zapfen-Signalen an verschiedene Zapfen-Bipolarzellen photopischen Signale über verschiedene Übertragungswege werden die weitergeleitet. Obwohl nur ein Stäbchen-Bipolarzelltyp in der Retina zur Verfügung steht, wird auch die skotopische Information der Stäbchen über unterschiedliche Signalwege verarbeitet (Bloomfield und Dacheux, 2001; Völgyi et al., 2004). Im primären Stäbchen-Signalweg werden die Signale über Stäbchen-Bipolarzellen auf All-Amakrinzellen übertragen. Gap-Junction-Kanäle zwischen All-Amakrinzellen und ON-Zapfen-Bipolarzellen vermitteln die Weiterleitung von Stäbchen-Signalen in den Zapfen-Signalweg (Dedek et al., 2006; Maxeiner et al., 2005). Durch chemische Synapsen werden die skotopischen Signale von All-Amakrinzellen auf OFF-Zapfen-Bipolarzellen übertragen (Strettoi et al., 1990). ON- und OFF-Bipolarzellen übermitteln die Signale der Stäbchen auf ON- bzw. OFF-Ganglienzellen. Über einen anderen Übertragungsweg werden die Signale von den Stäbchen über chemische Synapsen an OFF-Zapfen-Bipolarzellen weitergeleitet, welche die Signale an OFF-Ganglienzellen übermitteln (Soucy et al., 1998). Bei einem weiteren Übertragungsweg werden die Signale der Stäbchen über Gap Junctions auf Zapfen übertragen und über ON- und OFF-Zapfen-Bipolarzellen an die Ganglienzellen weitergeleitet (Trümpler et al., 2008).

#### 1.3.3 Connexine in der Retina

*Gap-Junction*-Kanäle spielen bei der Signalverarbeitung der Retina eine wichtige Rolle. Die Kopplung zwischen All-Amakrinzellen und *ON*-Zapfen-Bipolarzellen ermöglicht zum Beispiel die Übertragung von Stäbchen-Signalen in den Zapfen-Signalweg (Dedek *et al.*, 2006; Maxeiner *et al.*, 2005). Die Connexone dieses heterotypischen *Gap-Junction*-Kanals bestehen aus Cx36-Proteinen in den All-Amakrinzellen (Feigenspan *et al.*, 2001) und aus Cx45-Proteinen in den Axonterminalien der *ON*-Zapfen-Bipolarzellen (Maxeiner *et al.*, 2005). Cx45 wurde außerdem zwischen bistratifizierenden Ganglienzellen gefunden (Schubert *et al.*, 2005b). Cx36-Proteine wurden zusätzlich zu ihrer Expression in Amakrinzellen in Bipolarzellen (Feigenspan *et al.*, 2004; Han und Massey, 2005; Lin *et al.*, 2005; Hilgen *et al.*, 2011), in Dendriten von A-Typ-Ganglienzellen (Hidaka *et al.*, 2004; Schubert *et al.*, 2005a), sowie in Zapfen detektiert (Abbildung 1-6). Auf die Kopplung zwischen Photorezeptoren wird in Abschnitt 1.3.4 näher eingegangen. In der Kaninchen-Retina sind axonlose A-Typ-Horizontalzellen durch homologe Cx50-*Gap-Junctions* gekoppelt (O'Brien *et al.*, 2006), während Horizontalzellen der Maus Cx57 exprimieren (Hombach et al., 2004; Shelley et al., 2006; Janssen-Bienhold et al., 2009). Cx43-Proteine wurden in Müllerzellen des Kaninchens (Johansson et al., 1999; Zahs et al., 2006) und der Maus (Kihara et al., 2006) nachgewiesen. Kürzlich Cx30.2 wurde mit ein weiteres retinales Connexin in verschiedenen Ganglienzelltypen identifiziert. Diese Studien an Mäusen, deren codierende Cx30.2-Region durch ein LacZ-Reportergen ersetzt wurde, zeigten eine Cx30.2-vermittelte Kopplung zwischen Ganglienzellen des RG<sub>A1</sub>-Typs und deplatzierten Amakrinzellen. Dass eine Cx30.2-Reportergen-Expression in RG<sub>A1</sub>-Zellen, jedoch nicht in deplatzierten Amakrinzellen nachgewiesen werden konnte, weist auf heterotypische Gap Junctions zwischen diesen beiden neuronalen Zelltypen hin (Müller et al., 2010). Obwohl in Wirbeltieren fast alle retinalen Neurone gekoppelt vorliegen (Vaney et al., 1991; Cook et al., 1995), konnten in der Säugetier-Retina bisher keine weiteren Connexine eindeutig einem neuronalen Zelltyp zugordnet werden (Söhl et al., 2000; Güldenagel et al., 2000; Söhl et al., 2010).



**Abbildung 1-6. Connexine in der Maus-Retina.** Zwischen Zapfen (cones, C), All-Amakrinzellen (AII), *OFF*-alpha-Ganglienzellen ( $\alpha$ -GC) und *OFF*-Zapfen-Bipolarzellen (*OFF* CB) bildet Cx36 homotypische, interzelluläre Kanäle aus. Horizontalzellen sind über Cx57-*Gap-Junction*-Kanäle und verschiedene Ganglienzelltypen über Cx30.2-Kanäle gekoppelt. Heterotypische *Gap-Junction*-Kanäle befinden sich zwischen Cx36-exprimierenden All-Amakrinzellen und Cx45-exprimierenden *ON*-Zapfen-Bipolarzellen und wahrscheinlich zwischen Cx36-exprimierenden Zapfen und Stäbchen (rods, R) und zwischen deplatzierten Amakrinzellen und Cx30.2-exprimierenden RGA1-Ganglienzellen (Abbildung verändert nach Söhl *et al.*, 2005).

#### 1.3.4 Gap Junctions zwischen Stäbchen und Zapfen

Die informationsübertragende Terminalie der Zapfen wird als Pedikel, die des Spherule Pedikel Stäbchens als bezeichnet. besitzen kleine Fortsätze (Telodendrien), welche die Terminalien benachbarter Photorezeptoren kontaktieren (Abbildung 1-7 A). Die Gap-Junction-Kanäle der Zapfen können direkt in den Membranen der Pedikel oder in den Telodendrien lokalisiert sein (Abbildung 1-7 B). Gap-Junction-Kanäle zwischen Zapfen-Terminalien wurden ultrastrukturell in Kaninchen, Makake und Maus gezeigt (Tsukamoto et al, 2001; Raviola und Gilula, 1973; Abbildung 1-7 B). Die Kanäle zwischen zwei Zapfen sind aus Cx36-Proteinen aufgebaut (Dang et al., 2004; Deans et al., 2004; Feigenspan et al., 2004). Elektrophysiologische Untersuchungen an gekoppelten Zapfen ergaben eine Leitfähigkeit von mehreren hundert pS; das entspricht einer Anzahl von etwa zehn bis hundert Cx36-Gap-Junction-Kanälen (DeVries et al., 2002; Hornstein et al., 2004; Li und DeVries, 2004). Schätzungen zufolge verbessert die Kopplung benachbarter Zapfen das Signal-Rausch-Verhältnis um bis zu 70% (DeVries et al., 2002).

Eine Kopplung zwischen Stäbchen-Photorezeptoren durch *Gap-Junction*-Kanäle wurde in der Maus-, Salamander- und Primatenretina gefunden (Hornstein *et al.*, 2005; Zhang und Wu, 2004; Tsukamoto *et al*, 2001; Abbildung 1-7 C). Die Proteine, die die *Gap-Junction*-Kanäle zwischen Stäbchen ausbilden, konnten noch nicht identifiziert werden. Diese Kopplung zwischen Stäbchen verbessert wahrscheinlich, genau wie die Kopplung der Zapfen, das Signal-Rausch-Verhältnis. Neben der Kopplung zwischen Zapfen und der zwischen Stäbchen gibt es eine Kopplung von Stäbchen und Zapfen durch heterotypische *Gap-Junction*-Kanäle.



**Abbildung 1-7.** *Gap Junctions* zwischen Photorezeptoren. (A) Zapfen können über *Gap-Junctions* in Telodendrien benachbarte Zapfen-Pedikel (ZP) kontaktieren. (B) Die elektronenmikroskopische Aufnahme der Makaken-Retina zeigt *Gap-Junction*-Kanäle zwischen zwei Zapfen (Pfeile). Die *Gap-Junction*-Kanäle befinden sich hier zwischen der Pedikel-Membran des einen Zapfens (links) und dem Telodendrium des anderen Zapfens (rechts). (C) Ultrastrukturelle Aufnahme gekoppelter Stäbchen-*Spherules* (Pfeile). (Abbildungen verändert nach A: Rodiek, 1998; B: Raviola und Gilula, 1973; C: Tsukamoto *et al.*, 2001).

Bei etwa 2,5 Photonen in der Sekunde pro Stäbchen sind Stäbchen-Bipolarzellen gesättigt (Dunn and Rieke, 2006), bei Zapfen liegt die Sättigung dagegen bei 30 Photonen pro Sekunde (Deans et al., 2002). Über Gap Junctions können Stäbchen-Signale auf den Zapfen-Signalweg übertragen werden, so dass Signale weitergeleitet werden, die sonst über den Stäbchen-Signalweg verloren gehen würden (Smith et al., 1986). Wahrscheinlich sind die Gap-Junction-Kanäle zwischen Stäbchen und Zapfen bei Lichtintensitäten im mesopischen Bereich geöffnet und schließen bei steigender Belichtung (Heikkinen et al., 2011). Der zirkadiane Rhythmus der Retina kontrolliert die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen und ermöglicht den Zapfen, sehr schwache Lichtsignale in der Nacht, aber nicht am Tage zu empfangen (Ribelayga et al., 2008, Li et al., 2009; Mangel und Ribelayga, 2010). In Säugetieren gibt es ultrastrukturelle Nachweise für Gap Junctions zwischen Stäbchen und Zapfen in Kaninchen und Makake (Raviola und Gilula, 1973), Katze (Smith et al., 1986) und Maus (Tsukamoto et al, 2001; Abbildung 1-8 A). Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten die Übertragung von Stäbchen-Signalen auf Zapfen von Makake (Schneeweis und Schnapf, 1995; Schneeweis und Schnapf, 1999; Hornstein et al., 2005), Katze (Nelson, 1977) und Maus (Trümpler et al., 2008). Neurobiotin-Injektionen in Zapfen von Makaken ergaben sechs gekoppelte Stäbchen pro injiziertem Zapfen (Hornstein et al., 2005; Abbildung 1-8 B).



1-8. Junctions zwischen Stäbchen Zapfen. Abbildung Gap und (A) Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt Gap-Junction-Kanäle in der Membran zwischen Stäbchen (S) und Zapfen (Z) der Maus. (B) Das in einen Zapfen der Makaken-Retina injizierte Neurobiotin diffundiert über Gap-Junction-Kanäle in die umliegenden Stäbchen (Mitte). Ein Zapfen, der in Anwesenheit des Gap-Junction-Blockers Carbenoxolon injiziert wurde, zeigte keine Kopplung mit benachbarten Stäbchen (rechts). (Abbildungen verändert nach A: Tsukamoto et al., 2001; B: Hornstein et al., 2005).

Obwohl *Gap-Junction*-Kanäle zwischen Stäbchen und Zapfen in zahlreichen Spezies beschrieben wurden, konnten die kanalbildenden Proteine noch nicht identifiziert werden. Wahrscheinlich besteht das Connexon dieses Kanals auf der Zapfenseite zumindest teilweise aus Cx36-Proteinen, da Zapfen Cx36 exprimieren (Deans *et al.*, 2004; Feigenspan *et al.*, 2004; Dang *et al.*, 2004). Außerdem konnte gezeigt werden,

dass die direkte Signalübertragung zwischen Stäbchen und Zapfen in Cx36defizienten Mäusen unterbrochen ist (Trümpler et al., 2008). In Mäusen, in denen die wurde, wurde Cx36 zunächst sowohl in Zapfen als auch in Stäbchen identifiziert (Deans et al., 2002). In der Retina des Tigersalamanders kommt Cx35, ein Cx36-Ortholog, in Membranen zwischen kontaktierenden Stäbchen vor (Zhang und Wu, 2004). RT-PCR-Analysen deuteten darauf hin, dass Cx36-mRNA in Zapfen, aber nicht in Stäbchen der Maus zur Expression kommt (Feigenspan et al., 2004). In transgenen Mäusen, die ein Fusionsprotein aus Cx36 und GFP exprimierten, lagen die GFP-Signale in der äußeren Kernschicht jedoch so dicht, dass eine Expression von Cx36 in Stäbchen nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte (Feigenspan et al., 2004). Eine eindeutige Zuordnung der Cx36-Signale zu Stäbchen- und Zapfen-Halbkanälen kann durch immunhistochemische und elektronenmikroskopische Analysen erfolgen. Ultrastrukturelle Untersuchungen mit Cx36-Antikörpern, die das Vorliegen von Cx36 in Zapfen, aber nicht in Stäbchen zeigen, gibt es von der Meerschweinchen-Retina (Lee et al., 2003; Abbildung 1-9 B), nicht jedoch von der Maus-Retina. Wie in Abschnitt 1.2.1 erläutert, besteht die codierende Sequenz einiger Connexine aus verschiedenen Exonen. Um vollständig ausschließen zu können, dass der Kanal zwischen Stäbchen und Zapfen ausschließlich aus Cx36 besteht, muss getestet werden, ob in Stäbchen eine Cx36-Spleißvariante zur Expression kommt, die möglicherweise nicht von dem verwendeten Antikörper erkannt wird.



**Abbildung 1-9. Cx36-Expression in Gap-Junction-Kanälen zwischen Stäbchen und Zapfen.** (A) Der Gap-Junction-Kanal liegt im Bereich der Stäbchenmembranen, die von Zapfen-Telodendrien kontaktiert werden. (B) Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt Cx36-Immunoreaktivität in der Zapfen-Membran eines Meerschweinchens (Pfeile). Gap-Junction-Kanäle zwischen einem Zapfen-Telodendrium und dem benachbarten Stäbchen-Spherule (S) zeigen ausschließlich auf der Seite des Zapfens Cx36-Immunoreaktivität. Maßstab: 0,5 μm. (Abbildungen verändert nach A: Rodiek, 1998; B: Lee *et al.*, 2003).

Einige Daten lassen vermuten, dass Mäuse der *C57BL/6*-Linie, die keinen zirkadianen Rhythmus besitzen, keine oder nur wenig *Gap Junction*s zwischen Stäbchen und Zapfen ausbilden (Trümpler *et al.*, 2008). Die Lichtantworten der Horizontalzell-Somata in *129/Sv*-Mäusen zeigten den Eingang von Stäbchen-Signalen, die auf eine Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen zurückgeführt wurde. Die elektrophysiologischen Untersuchungen von Horizontalzellen Cx36-defizienter Mäuse zeigten dagegen keinen Stäbchen-Eingang. In *C57BL/6*-Mäusen erhielten nur wenige Horizontalzellen einen Eingang von Stäbchen-Signalen (Trümpler *et al.*, 2008). Prof. Botond Roska vom Friedrich-Miescher-Institut in Basel konnte mit der Ableitung von Zapfen-Bipolarzellen in *C57BL/6*-Mäusen keinen Eingang von Stäbchen-Signalen finden (mündliche Aussage, RETICIRC *Mid-term meeting* Luzern 2010).

### 1.3.1 Pannexine in der Retina

Es gibt nur wenige Studien über die Expression von Pannexinen in der Maus-Retina. Panx3 kommt nicht im Nervengewebe vor und wird deshalb wahrscheinlich nicht in der Retina exprimiert (Baranova et al., 2004). Die Expression von Panx1- und Panx2-mRNA wurde in der Retina mit In-situ-Hybridisierung und durch guantitative RT-PCR-Analysen nachgewiesen. Dabei zeigte sich eine Anreicherung beider Proteine in den Ganglienzellen. Immunhistochemische Analysen zeigten Panx1-Proteine in Ganglienzellen, Amakrinzellen und Horizontalzellen. Die Panx1-Expression war neonatal am stärksten und nahm mit zunehmendem Alter ab (Dvoriantchikova et al., 2006). Im Zebrafisch wurde die Expression von Panx1 in Dendriten der Horizontalzellen gezeigt (Prochnow et al., 2009). Es wird spekuliert, ob Panx1-Kanäle möglicherweise in einem sogenannten ephaptischen Mechanismus eine Rolle spielen (Dvoriantchikova et al., 2006; Prochnow et al., 2009). In diesem Mechanismus vermitteln Membrankanäle negative *Feedback*-Signale von Horizontalzellen zu Zapfen (Kamermans et al., 2001; Kamermans and Fahrenfort, 2004; Fahrenfort et al., 2009). Untersuchungen, die Panx2-Proteine in der Retina nachweisen, gibt es bisher noch nicht.

15

#### 1.4 Zielsetzung

In der vorliegenden Dissertation sollte untersucht werden, welche *Gap-Junction*-Proteine an der Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen beteiligt sind. Proteine der Connexin- und der Pannexin-Genfamilie kamen hierfür als Kandidaten in Frage. Da die Expression von Cx36 in Zapfen als gesichert gilt, wurde ein *Gap-Junction*-Protein gesucht, das als Kopplungspartner zu Cx36 den Halbkanal auf der Stäbchenseite ausbildet. Zunächst sollte eindeutig ausgeschlossen werden, dass Cx36 in Stäbchen zur Expression kommt und homotypische *Gap-Junction*-Kanäle zwischen Stäbchen und Zapfen ausbildet. Sollte Cx36 immunhistochemisch in Zapfen, jedoch nicht in Stäbchen nachgewiesen werden, sollte überprüft werden, ob eine Spleißvariante von Cx36 in Stäbchen vorkommt, die nicht vom verwendeten Antikörper erkannt wird.

Sofern die Expression von Cx36 in Stäbchen eindeutig ausgeschlossen werden konnte, sollten andere Connexine und die Pannexine auf ihre Expression in Photorezeptoren durch *RT-PCR* und Immunhistochemie untersucht werden. Die Verwendung genspezifischer und degenerierter *Primer* sollte dabei die Möglichkeit bieten, sowohl bekannte als auch unbekannte Connexinsequenzen zu detektieren. Da die Annahme bestand, dass Mäuse der *C57BL/6*-Linie keine oder nur wenig *Gap-Junction*-Kanäle zwischen Stäbchen und Zapfen ausbilden, sollten die Experimente mit *C57BL/6* und zusätzlich mit *129/Sv*-Mäusen durchgeführt werden.

Auf zweierlei Weise sollte ermittelt werden, ob Cx36 mit einem oder mehreren identifizierten *Gap-Junction*-Proteinen Kanäle bildet: Zunächst sollte eine Expression von Cx36 und dem jeweiligen *Gap-Junction*-Proteinkandidaten in Säugetierzellen erfolgen. Damit sollte überprüft werden, ob das in Photorezeptoren detektierte *Gap-Junction*-Protein in einem Expressionssystem in der Lage ist, mit Cx36 Kanäle auszubilden. Um zu prüfen, ob Cx36 mit dem identifizierten Proteinkandidaten im Bereich der Photorezeptor-Terminalien *Gap-Junction*-Kanäle ausbildet, sollten die beiden Proteine auf eine Kolokalisation in der äußeren plexiformen Schicht untersucht werden.

# 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

### 2.1.1 Versuchstiere und Bakterienstämme

Es wurden *129/Sv*-Mäuse verwendet, die sich im Nachtzyklus befanden. Diese wurden in einem Raum gehalten, in dem der Tag- und der Nachtrhythmus mittels einer Zeitschaltuhr vertauscht wurden. Die Mäuse wurden erst nach einer Umstellung des zirkadianen Rhythmus nach zwölf Tagen für Experimente verwendet. *C57BL/*-Mäuse wurden für eine Stunde dunkeladaptiert.

### Tabelle 2-1: Versuchstiere

Name	Genotyp	Hersteller
C57BL/6	Mus musculus domesticus Black 6; Inzuchtstamm, Fellfarbe schwarz, Blastozysten-Spendertiere und Mausstamm für Rückkreuzungen	Charles River; Wilmington, USA
129/Sv	Mus musculus domesticus; Inzuchtstamm, Fellfarbe braun	Charles River; Wilmington, USA
Panx1KO	Panx1-defizienter Mausstamm, in <i>C57BL/6</i> zurückgekreuzt	Prof. Hannah Monyer; Klinische Neurobiologie Univ. Klinik Heidelberg

### 2.1.2 Zelllinien und Antikörper

### Tabelle 2-2: Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz
N2A-Zellen	Maus-Neuroblastoma-Zelllinie 2A, etabliert aus dem Tumor eines Albino-A- Mausstammes	Klebe und Ruddle, 1969; Olmsted <i>et</i> <i>al</i> ., 1970
HeLa-Wildtyp- Zellen	Humane Zellinie, etabliert aus dem Zervixkarzinom einer 31-jährigen farbigen Frau im Jahre 1951	Gey <i>et al.</i> , 1952; Scherer <i>et al.</i> , 1953; Jones <i>et al.</i> , 1971; Elfgang <i>et</i> <i>al.</i> , 1995
Cx36- exprimierende HeLa-Zellen	HeLa-Wildtyp-Zellen, stabil transfiziert mit Cx36m:pBEHpac18; Resistenzen: Pyromycin, Ampicillin	Horst <i>et al</i> ., 1990

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
One Shot <sup>™</sup> - TOP10- <i>E.coli</i>	$F^-$ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80/acZΔM15 Δ/acX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 ga/U ga/K rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG λ-	Invitrogen, Groningen, NL
JM 109- <i>E.coli</i>	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk–, mk+), relA1, supE44, Δ( <i>lac-pro</i> AB), [F', traD36, proAB, <i>laq</i> lqZΔM15]	Promega, Madison, WI, USA

### Tabelle 2-3: Bakterienstämme

# Tabelle 2-4: Primäre Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Spezies/ Verdünnung	Hersteller
Anti-Cx32; C-Terminus	Ziege 1:500	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg
Anti-Cx36 monoklonal; C- Terminus Aminosäure 286-303	Maus 1:1000	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-Cx36 polyklonal; C-Terminus Aminosäure 286-303	Kaninchen 1:300	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-Cx43; C-Terminus	Kaninchen 1:250	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-Cx45	Kaninchen 1:100	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-Cx50	Maus 1:100	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-Cx53.8 S1; C-terminales Ende von Fisch Cx53.8 CSMSMILELSSIMKK	Kaninchen 1:500	Pineda Antikörper- Service, Berlin
Anti-Panx1	Kaninchen 1:2000	Prof. Dale Laird; University of Western Ontario, London, Ontario, Kanada
Anti-Panx2 S3 C-Terminus DSGPSSAPPAASEKKHTRHF *	Kaninchen 1:200	Pineda Antikörper- Service, Berlin
Anti-Calbindin	Maus 1:5000	Swant, Bellinzona, Schweiz/300
Anti-Cone-Arrestin	Kaninchen 1:1000	Millipore, Billerica, USA
Anti-Glutamin-synthetase	Maus 1:500	BD Transduction Laboratories; Heidelberg
Anti-PKARIIβ	Maus 1: 1000	BD Transduction Laboratories; Heidelberg
Anti-PSD-95	Maus 1:10000	Dianova, Hamburg
Anti- <i>Velis-3</i>	Kaninchen 1:1000	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Antikörper	Spezies/ Verdünnung	Hersteller
Anti-ZNP-1	Maus 1:1000	Zebrafish International Resource Center/081002-25; Eugene: USA

Die Antikörper wurden in TBS/Tx/1% NGS (pH 7,6) verdünnt.

### Tabelle 2-5: Sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie.

Antikörper	Ver- dünnung	Hersteller
Ziege anti Kaninchen IgG Alexa 488	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ziege anti Kaninchen IgG Alexa 568	1:300	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Maus anti Kaninchen IgG Alexa 488	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ziege anti Maus IgG Cy3	1:500	Jackson ImmunoResearch; Suffolk; England
Ziege anti Maus Alexa IgG 568	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Esel anti Ziege IgG Cy3	1:300	Jackson ImmunoResearch; Suffolk; England
Huhn anti Ziege IgG Alexa 488	1:300	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Maus anti Ziege Cy3	1:500	Jackson ImmunoResearch; Suffolk; England

Die Antikörper wurden in TBS/Tx/1% NGS (pH 7,6) verdünnt.

### 2.1.3 Vektoren und Primer

Alle Vektorkarten finden sich im Anhang, Abschnitt 8.1; alle verwendeten *Primer* befinden sich im Anhang, Abschnitt 8.3.

pGEM<sup>®</sup>-T Easy: Ein 3015 Basenpaare großes Plasmid der Firma Promega.

<u>pcDNA3.1+:</u> Eukariotischer Expressionsvektor mit 5400 Basenpaaren der Firma Invitrogen. Das inserierte Gen wird unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert.

<u>*pEGFP-N1*</u>: Ein eukaryotischer Expressionsvektor mit 4700 Basenpaaren der Firma *Clontech*. Die codierende Sequenz des *GFP*-Proteins wird unter der Kontrolle eines *CMV*-Promotors exprimiert.

<u>Cx36m:pBEHpac18</u>: Dieser Vektor wurde von der Arbeitsgruppe Willecke, Institut für Genetik, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt. Er ist ein Abkömmling des Cx36r:pBEHpac18, entstand durch Umklonierung des *Bam/Xba*-Fragmentes und

umfasst 5800 Basenpaare. Die Nucleotidsequenzen des ersten Exons und hinter der *Xba*l-Schnittstelle entsprechen der Cx36-Gensequenz der Ratte, sie codieren jedoch für dieselbe Aminosäurenfolge. Das Plasmid besitzt eine Ampicillin- und eine Pyromycinresistenz.

<u>pCx36EGFP-P</u>: Dieser Vektor wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Willecke, Institut für Genetik, Uni Bonn, zur Verfügung gestellt. Der Vektor besitzt ein pBEHpac18-Rückgrat mit *CMV*-Promotor und ein *GFP*-Protein, das aus pe*GFP*-N1 (*Clontech*) kloniert wurde. Die Cx36-Gensequenz wurde als *PCR*-Produkt nach Entfernen des Stopp-Codons kloniert. Das 7420 Basenpaare große Plasmid besitzt eine Ampicillinund eine Pyromycinresistenz.

<u>pDsRed-Express-N1</u>: Ein eukaryotischer Expressionsvektor mit 4700 Basenpaaren der Firma *Clontech*. Die codierende Sequenz des *GFP*-Proteins wird unter der Kontrolle eines *CMV*-Promotors exprimiert.

### 2.1.4 DNA-Größenstandard

Der *peqGOLD* DNA-Leiter-Mix ist ein Längenstandard für die Größenbestimmung mit den Fragmentgrößen 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1200 bp, 1500 bp, 2000 bp, 2500 bp, 3000 bp, 3500 bp, 4000 bp, 5000 bp, 6000 bp, 8000 bp, 10.000 bp. Der Marker wurde nach Herstellerangaben eingesetzt.

#### 2.1.5 Geräte und Reagenzien

#### Tabelle 2-6: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarosegel Mini und Midi Gelkammern	Biometra, Göttingen
Agar 100-Harz	Plano GmbH, Wetzlar
Axiophot 2 mit Axia Cam MRc	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Elektronenmikroskop 902	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Eletroporationsapparatur Gene-Pulser	Biorad Laboratories, München
Gefriermikrotom Kryocut 5030 Bright	Smuths Thebewn; Cambridgeshire,
Microtome	England
Gelkammer	Biometra, Göttingen
Glaspipettenzieher P-97	Sutter Instruments, Novato, CA, USA
Alphalmager EP mit DE 450	Biozym scientific, Hess. Oldendorf
Hybridisierungsofen	Appligene, Illkirch, Frankreich
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Biochrom AG, Berlin
Inkubator	Heraeus Instruments, Osterode/Harz
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop TCS-SL	Leica Microsystems AG, Wetzlar

Bezeichnung	Hersteller
Kammer zur Lagerung von Säugerzellen	Luigs and Neumann, Ratingen
während einer elektrophysiologischen	
Ableitung	
Kühlzentrifuge Typ J2-21	Beckman Coulter, Krefeld
Magnetrührer	Ikamag RH IKA, Staufen
Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Mikrotom Reichert Jung Ultracut	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Mikroskop für elektrophysiologische	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Untersuchungen	
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schüll GmbH, Dassel
Porendurchmesser 0,45 µm	
Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
Objekttisch für elektrophysiologische	Luigs & Neumann, Ratingen
Ableitungen	
Oszilloskop für elektrophysiologische	Tektronix, Beaverton, USA
Ableitungen	
pH-Meter	WTW, Weilheim
Schüttler	Edmund Bühler, Hechingen
Spannungsgerät Standard Power Pack	Biometra, Göttingen
Steuergerät für den Mikromanipulator	Luigs & Neumann, Ratingen
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge 5147R	Eppendorf, Hamburg
Tisch, schwingungsgedämpft für	TMC, Peabody, MA, USA
elektrophysiologische Ableitungen	
UV Transilluminator	Biometra, Göttingen
Vectastain Elite ABC-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Verstärker PatchMaster für	Heka Elektronik, Lambrecht
elektrophysiologische Ableitungen	
Vortex Reax 2000	Heidolph Instruments, Nürnberg
Vorverstärker EPC-9/2, für	Heka Elektronik, Lambrecht
elektrophysiologische Ableitungen	

### Tabelle 2-7: Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Attractene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Bicarbonat 7,5%	Biochrom AG, Berlin
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DIG RNA-Labeling Mix	Roche, Mannheim
DNA-Größenstandard	Peqlab, Erlangen
DNase I, RNasefrei (10 U/µI)	Roche, Mannheim
DNase I Amplification Grade (1 U/µI)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP Mix (10 mM)	Qiagen, Hilden
DMEM 10 x	Biochrom AG, Berlin
Doppel-Patch-Clamp-Verstärker EPC9	Heka, Lambrecht
ECL-Western-Blot Detection Kit	Amersham Bioscience, Freiburg
<i>Eco</i> RI (10 U/μΙ)	Roche, Mannheim
FBS Fetal Bovine Serum	Biochrom AG, Berlin

Bezeichnung	Hersteller
Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin
Hepes 1 M	Biochrom AG, Berlin
HindIII (10 U/µI)	Roche, Mannheim
HotStar HiFidelity Polymerase (2,5 U/µl)	Qiagen, Hilden
JM109 kompetente Zellen	Promega, Madison, USA
Kryomatrix Tissue-Tek	Sakura Finetek GmbH, Staufen
Kryomikrotom	Bright Instrument Company,
	Cambridgeshire, England
Loading Dye 5 x "GelPilot"	Qiagen, Hilden
Nanofect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Nukleasefreies Wasser	Promega, Madison, WI, USA
NucleoSpin Kit RNA II	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Oligo(dT) <i>Primer</i> (500 μ/μΙ)	Promega, Madison, WI, USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen
pGEM-T-Easy Vector System	Promega, Madison, WI, USA
Plasmid Cx36:pBEHpac18	AG Willecke, Universität Bonn
Plasmid pCx36E <i>GFP</i> -P	AG Willecke, Universität Bonn
Plasmid pcDNA3.1+	Invitrogen, Kalsruhe
Plasmid pe <i>GFP</i> -N1	Clontech, Heidelberg
Plasmid pDsRed-Express-N1	Clontech, Heidelberg
PureYield <sup>IM</sup> Plasmid Midiprep System	Peqlab, Erlangen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange® Multi Site-Directed	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Mutagenesis Kit	
FirstChoice® RLM-RACE Kit	Ambion, Austin, TX, USA
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim
RNasin Plus <sup>®</sup> RNase Inhibitor (40 U/µl)	Promega, Madison, WI, USA
RNAse AWAY	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Superscript <sup>1M</sup> III Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
(200 U/µl)	
Standard-DNA-Leiter	Peqlab, Erlangen
T3 RNA-Polymerase (20 U/μl)	Roche, Mannheim
T7 RNA-Polymerase (20 U/μl)	Roche, Mannheim
TissueTek <sup>®</sup> Compound 4583	Sakura Finetechnical Co. Ltd; Staufen
Transfectin Transfection Reagent	Biorad, Laboratories, München
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
TSA <sup>™</sup> Plus Fluorescence Systems	PerkinElmer, Boston, MA, USA
Vectashield	Vectors Laboratories, Burlingame,
	England
<i>Xho</i> l (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Zellkulturwasser	Promocell GmbH, Heidelberg

### 2.2 Puffer und Lösungen

Lösungen wurden ausschließlich mit deionisiertem Wasser hergestellt und durch Autoklavieren für 20 Minuten bei 121 °C sterilisiert.

### 2.2.1 Puffer für die *In-situ*-Hybridisierung:

Alle Puffer und Lösungen für die *In-situ-*Hybridisierung wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt.

DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1% DEPC (v/v) in ddH <sub>2</sub> O
Hydrolyse-Mix (pH 10,2)	4 mM NaHCO3 60 mM Na2CO3
Neutralisationslösung (pH 1,2)	0,1 M HCI
Carbonatpuffer (pH 10,2)	60 mM Na2CO3 40 mM NaHCO3
10 x PBS (pH 7,4)	1,5 M NaCl 17 mM NaH₂PO₄ 83 mM Na₂HPO₄
20 x SSC (pH 7,4)	3 M NaCl 0,3 M tri-Natriumcitrat
Essigsäureanhydrid/Triethanolamin (pH 8,0)	10 mM Triethanolamin pH mit Essigsäureanhydrid eingestellt
Prähybridisierungspuffer	2,5x Denhardt's <i>solution</i> 50 mM Tris ( pH 7,5) 25 mM EDTA 0,25 mg/ml tRNA 2 mM NaCl 50% Formamid
10 x Hybridisierungspuffer	10x Denhardt's <i>solution</i> 200 mM Tris (pH 7,5) 10 mM EDTA 5 mg/ml tRNA 1 mg/ml poly-A
50 x Denhardt's solution	10 mg/ml BSA 10 mg/ml Ficoll 10 mg/ml Polyvinylpyrollidin (PVP)
P1-Puffer (pH 7,5)	100 mM Tris (pH 7,5) 150 mM NaCl

P3-Puffer (pH 9,5)	100 mM Tris (pH 9,5) 100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
P4-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris (pH 8,0) 1 mM EDTA
MBM	10 mg/ml Blocking Reagent 5 mg/ml BSA Fraktion V in P1-Puffer
Entwicklungspuffer	0,35 mg/ml NBT 0,175 mg/ml BCIP 0,25 mg/ml Levamisol In P3-Puffer (pH 9,5)
TNT	0,05% Tween-20 in P1-Puffer (pH 7,5)
2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 1x PBS (pH 7,4)

### 2.2.2 Puffer für die Herstellung von Gefrierschnitten

30% Sucrose-Lösung	30% Sucrose (w/v) in 0,1 M PB pH 7,4
2% PFA-Fixierlösung	2% Paraformaldehyd (PFA) (w/v) 3% Sucrose (w/v) 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4
0,2 M Phosphatpuffer (PB-Puffer)	4 Teile 0,2 M Na2HPO4 mit 1 Teil 0,2 M NaH2PO4 pH 7,4 einstellen

## 2.2.3 Lösungen für die Präparation von Plasmid-DNA

P1-Resuspensionspuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 μg/ml RNAse A Lagerung bei 4 °C
P2-Lysepuffer	200 mM NaOH 1% SDS
P3-Neutralisationspuffer	2,5 M Kaliumacetat, pH 4,8
# 2.2.4 Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer pH 8,2	89 mM Tris (w/v) 89 mM Borsäure (w/v) 2 mM EDTA (w/v)
Ethidiumbromid-Färbelösung	0,5 μg/ml Ethidiumbromid in 1 x TBE pH 8,2

# 2.2.5 Medien für die Klonierung

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	25 g/L Luria-Bertani-Medium
LB-Agarplatten	25 g/L Luria-Bertani-Medium
	32 g/L Lennox-LB-Agar

Das Flüssigmedium wurde autoklaviert und bei 4 °C gelagert. LB-Agar-Medium wurde autoklaviert und in Petrischalen gegossen. Bei Bedarf wurden dem LB-Agar Antibiotika und/oder X-Gal zugegeben.

# 2.2.6 Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

Homogenisierungspuffer 2, pH 7,4	50 mM Tris/HCl 2 μg/ml Leupeptin 2 mM EGTA 5 μg/ml Aprotinin 2 mM EDTA 2 mM PMSF 0,1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
Bradfordreagenz	0,1 mg/ml Coomassie-Blau G-250 5% Ethanol 8,5% Phosphorsäure
3 x SDS-Probenpuffer	1,9 M Tris/HCl pH 6,8 3 ml Glycerin 0,1% Bromphenolblau 0,3 ml β-Mercaptoethanol 90 mg/ml SDS auf 10 ml auffüllen
SDS-Laufpuffer	14,4 mg/ml Glycin 3 mg/ml Tris 1 mg/ml SDS

Transferpuffer	3 mg/ml Tris 14,4 mg/ml Glycin 0,01% SDS
TBST pH 7,4	20 mM Tris 150 mM NaCl 0,2% Tween 20
Ponceau-S-Lösung	2% Ponceau-S 3% Essigsäure
Stripp-Lösung I (pH 8,8)	0,01 M Tris-HCl pH 6,8 (w/v) 1% SDS (w/v) 10 mM β-Mercaptoethanol (v/v)
Stripp-Lösung II (pH 3)	0,1 M Tris-Natriumcitrat Dihydrat (w/v) 1% SDS (w/v) 10 mM β-Mercaptoethanol (v/v)

# 2.2.7 Lösungen und Medien für die Immunhistochemie

Lösung A	ad 100 ml mit HBSS 0,1 mM EDTA 100 mM Hepes 100 <i>Units</i> Antibiotika
Zellkulturmedium DMEM 1 x	1 x DMEM 7,5% Sodium Bicarbonat 100 Units Penicillin/Streptomycin 200 mM Glutamin 100 mM Hepes
DMEM/FBS/DNase-I-Lösung	25,6 ml DMEM 1 x 10% FBS 100 <i>Units</i> /ml DNase I steril filtrieren
Papain-Lösung 20 Units/ml	20 Units/ml Papain 1 mM Cystein pH 7,3 auf 1 ml auffüllen mit Lösung A
ConA-Lösung (Concanavalin A)	1 mg/ml in 0,1 M PBS

# 2.3 Molekularbiologische Methoden

Alle Inkubationen ohne Temperaturangabe erfolgten bei Raumtemperatur.

### 2.3.1 Präparation von Gewebe

C57BL/6- und 129/Sv-Wildtyp-Mäuse im Alter zwischen acht und 16 Wochen wurden mit Kohlenstoffdioxid betäubt und durch Genickbruch getötet. Das Auge wurde aufgeschnitten und Linse, Glaskörper und Kornea vom Augenbecher abgetrennt. Die Retina wurde dem Augenbecher entnommen. Die Augenbecher wurden in PBS-Puffer (vgl. Abschnitt 2.2.2) mit RNase-freiem Besteck präpariert. Für die Herstellung von Kryoschnitten wurden die Augenbecher mit der darin enthaltenen Retina nach der Präparation sofort fixiert. Dazu wurde das Gewebe zweimal für zehn Minuten in 2% igem Paraformaldehyd (in PBS Puffer) fixiert. Der Augenbecher wurde dreimal für zehn Minuten in 0,1 M PBS gewaschen und danach über Nacht in einer 30%igen Sucrose-Lösung (vgl. Abschnitt 2.2.2) bei 4 °C inkubiert. Neben den Retinen wurden den Versuchstieren in einigen Fällen Gehirn, Herz, Leber und Linse für RT-PCR-Analysen und Gewebeschnitte entnommen. Dabei wurde die Augenlinse zusammen mit der Retina bei einer Augenpräparation isoliert und anschließend fixiert. Zur Präparation von Herz und Leber wurde die Haut der Bauchseite längs aufgeschnitten und die Organe entnommen. Zur Präparation des Gehirnes wurde der Kopf zunächst vom Rumpf abgelöst und die Schädelkapsel freigelegt. Anschließend wurde der Schädelknochen geöffnet und das Hirngewebe entnommen.

## 2.3.2 Herstellung von Gewebeschnitten

Die Gewebe wurden wie in Abschnitt 2.3.1 präpariert und anschließend auf einem -190 °C kalten Metallblock in einer Kryomatrix eingebettet. In einem gekühlten Kryomikrotom wurden bei -20 °C 18 µm dicke Schnitte des Augenbechers hergestellt. Für Hybridisierungsversuche wurden die Schnitte immer frisch hergestellt und auf vorgewärmte Objektträger gebracht. Auf einer Wärmeplatte wurden die Schnitte 15 Minuten getrocknet, bevor sie weiter verarbeitet wurden.

#### 2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA

Klone einer LB-Platte wurden mit 5 ml LB-Medium angeimpft und unter ständigem Schütteln über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das LB-Medium enthielt ein Antibiotikum, für das die verwendeten Plasmide ein Resistenzgen besaßen. Nach der Inkubation wurden die Bakterien zweimal acht Minuten bei 10.000 g in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das

Bakterienpellet in 300 µl P1-Resuspensionspuffer (vgl. Abschnitt 2.2.3) resuspendiert. Danach wurden der Suspension 300 µl P2-Lysepuffer (vgl. Abschnitt 2.2.3) zugesetzt und das Reaktionsgefäß fünf Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl P3-Neutralisationspuffer (vgl. Abschnitt 2.2.3) und einer 10-minütigen Inkubation bei 4 °C erfolgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 10.000 g. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 650 µl Isopropanol und einer Zentrifugation von 15 Minuten bei 4 °C und 10.000 g präzipitiert. Das Pellet wurde durch die Zugabe von 1 ml kaltem 70%igem Ethanol von Salzverunreinigungen befreit. Durch eine Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 g wurden die Plasmide erneut pelletiert, dreißig bis sechzig Minuten getrocknet und in 40 µl DEPC-Wasser gelöst. Für die Maxipräparation wurden 200 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und schüttelnd über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem *Pure Yield Plasmid Midi-Kit* nach Angaben des Herstellers isoliert.

#### 2.3.4 Reinigung und Extraktion von DNA

Zur Reinigung der DNA nach enzymatischen Reaktionen wurde das *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Extraktion der DNA-Fragmente aus Agarosegelen erfolgte durch das *QIAEX II Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

#### 2.3.5 Isolierung von genomischer DNA und RNA

Um Kontaminationen mit RNasen zu verhindern, wurde mit Handschuhen gearbeitet. Im Wasser enthaltene RNAsen wurden durch Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (vgl. Abschnitt 2.2.1) inaktiviert. Alle Lösungen wurden ausschließlich mit DEPCbehandeltem Wasser hergestellt. Glaswaren und Präparierbesteck wurden für vier Stunden bei 200 °C gebacken. Geräte, die keine Hitze vertragen, wurden mit *RNAse AWAY* nach Angaben des Herstellers behandelt. Alle Einwegutensilien wurden RNase-frei vom Hersteller bezogen. Die Retinen wurden wie in Abschnitt 2.3.1 präpariert. Sie wurden anschließend aus dem Augenbecher gelöst und mit einer sterilen Spritze mechanisch homogenisiert. Gehirn, Herz, Leber und Linse wurden mit Hilfe eines Glashomogenisators homogenisiert. Die Isolierung von genomischer DNA und RNA erfolgte durch das *NucleoSpin Kit RNA II* von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers.

#### 2.3.6 Isolierung von mRNA aus retinalen Zellen

Um die mRNA aus Photorezeptoren, Müllerzellen, Horizontalzellen und Bipolarzellen zu isolieren, wurde das *NucleoSpin Kit RNA XS* von Macherey-Nagel verwendet. Um

die mRNA aus Photorezeptoren zu isolieren, wurden mit einem Vibratom 200 µm dicke Retinaschnitte angefertigt. Mit einer *Patch*-Pipette wurden etwa 200 Photorezeptor-Zellkörper aus der inneren Hälfte der äußeren Kernschicht gezogen. Die Pipette war mit 9 µl RA1-Puffer (inkl. 2% TCEP) gefüllt. Alle Schnitte erfolgten bei Raumtemperatur, da der RA1-Puffer chaotrope Salze enthält, die bei niedrigen Temperaturen ausfallen. Die Zellen wurden aus der Pipette mit einer Spritze ausgeblasen. Vier Photorezeptor-Proben wurden so gesammelt und vereinigt. Nach Zugabe von 4 µl *Carrier*-RNA wurde die Probe gemischt und 100 µl 70% Ethanol zugegeben. Dieser Ansatz wurde auf die blaue Säule des *NucleoSpin Kits RNA XS* von Macherey-Nagel gegeben und nach Angaben des Herstellers weiter bearbeitet. Für die Isolierung der mRNA aus einzelnen retinalen Zellen wurden die Zellen der Retina dissoziiert. Unter dem Mikroskop wurde der jeweilige Zelltyp mit einer *Patch*-Pipette aufgesammelt. Bei diesem Verfahren wurden für jede Probe zwischen zwei und vier Zellen gesammelt.

## 2.3.7 DNase-Behandlung von mRNA

Um den Anteil an genomischer DNA in den RNA-Proben zu reduzieren, wurden die Proben mit DNase behandelt. Ein Ansatz für eine DNAse-Behandlung setzte sich wie folgt zusammen:

RNA	1 µg
RNasin Plus® (40 U/µl)	1 µl
10 x DNase-I-Reaktionspuffer	1 µl
DNase I Amplification Grade (10 U/µI)	1 µl
nukleasefreies Wasser	auffüllen auf 10 µl

Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die DNase durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) für zehn Minuten bei 65 °C inaktiviert. Die gereinigte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

# 2.3.8 Reverse Transkription

Um mRNA-Moleküle aus der Gesamt-RNA in cDNA-Moleküle umzuschreiben, wurde die Reverse Transkriptase *Superscript<sup>TM</sup> III* nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) verwendet. Dazu wurde 1  $\mu$ g Gesamt-RNA direkt nach dem DNase-Verdau (vgl. Abschnitt 2.3.7) im folgenden Reaktionsansatz weiterbehandelt:

Gesamt-RNA (1µg)	x µl	
<i>Oligo(dT)</i> (500 μg/μl)	1 µl	
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl	

Der Reaktionsansatz wurde mit DEPC-Wasser auf 13 µl aufgefüllt, fünf Minuten bei 65 °C erhitzt und für eine Minute auf Eis abgekühlt. Für die Erststrangsynthese wurden folgende Substanzen hinzugefügt:

4 µl	
1 µl	
1 µl	
1 µl	
	4 μl 1 μl 1 μl 1 μl

Der Transkriptionsansatz wurde gemischt und für sechzig Minuten bei 50 °C und anschließend für 15 Minuten bei 70 °C inkubiert.

### 2.3.9 Primer-Design

Zur Auswahl der *Primer* wurden das Programm *Primer3* OligoAnalyzer 3.1 (http://:eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer) verwendet. Die *Primer*-Synthese erfolgte durch die Firma *Eurofins MWG* GmbH (Ebersberg).

### 2.3.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Aus einem bekannten DNA-Bereich wurden zwei *Primer* gewählt, die gegenläufig an die denaturierten komplementären DNA-Stränge binden und den gewünschten Bereich flankierten. Eine Übersicht über die eingesetzten *Primer* und deren Sequenzen befindet sich im Anhang, Abschnitt 8.3. Zur Amplifikation wurde die *HotStar Taq* DNA-Polymerase der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Matrizen-DNA wurden Plasmid-DNA, genomische DNA, c-DNA oder die Amplikons einer *PCR* verwendet. Jeder Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl enthielt folgende Komponenten:

Matrizen-DNA <i>HotStar PCR</i> -Reaktionspuffer (10x)	variabel 2,5 µl	Endkonzentration variabel 1 x (1.5 mM MqCl2)
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl	250 μM
Primer Forward (10 pmol/µl)	2 µl	0,8 pmol/µl
Primer Reverse (10 pmol/µl)	2 µl	0,8 pmol/µl
HotStar Taq DNA Polymerase (5 U/µI)	0,2 µl	0,04 U/µl
Nuklease-freies Wasser	auffüllen auf 25 µl	

Die Durchführung der *PCR* zum *Amplifizieren* von Cx30.2 stellte einen Sonderfall dar: Hier wurde die Erhöhung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration um 0,7 mM, die Zugabe von 5 µl Q-*Solution* und die Zugabe von 1–8% DMSO ausgetestet. Es zeigte sich, dass die Zugabe von 5 µl Q-*Solution* der Firma Qiagen pro Ansatz oder eine

Endkonzentration von 8% DMSO für das Gelingen der PCR notwendig war. Bei Polymerase-Kettenreaktionen, die Klonierungen zur Genexpression nach sich zogen, wurde die HotStar HighFidelity-Polymerase benutzt, da sie eine Korrekturlesefunktion besitzt. Die Verwendung dieser Polymerase gewährleistet das Ablesen der DNA-Matrize. Jeder fehlerlose Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl enthielt folgende Komponenten:

Matrizen-DNA (cDNA)	variabel
DCD Dooldiononuffer (Ex) inkl. dNTD Mix	
	σμi
Primer Forward (10 pmol/µl)	2 µl
Primer Reverse (10 pmol/µl)	2 µl
HotStar HighFidelity Taq DNA-Polymerase (2,5 Units/µl)	0,5 µl
nukleasefreies Wasser	auffüllen auf 25 µl

Die *PCR* wurde in einem *Thermocycler* der Firma Eppendorf bei folgendem Reaktionsprogramm durchgeführt:

Phase	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Aktivierung	94	15 min	1
Denaturierung	94	30 s	
Annealing	Х	30 s	34
Polymerisation	72	1 min/kb	
Finale Polymerisation	72	10 min	1

Um die optimale Annealing-Temperatur der Primer zu ermitteln, wurde eine PCR mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen (Temperaturgradient) durchgeführt. Die weiteren PCRs wurden bei der Annealing-Temperatur durchgeführt, bei der ein einziges DNA-Fragment der erwarteten Größe amplifiziert wurde.

# 2.3.11 Nested-RT-PCR

Bei Einzelzell-*PCR*s, in denen eine sehr geringe Menge an Matrizen-DNA zur Verfügung stand, wurde die Methode der *Nested-PCR* angewendet. Die *Nested-PCR* ist ein Verfahren, bei dem zwei *PCR*-Reaktionen nacheinander ablaufen. Als Matrize für die zweite *PCR* dient ein Teil des *PCR*-Produktes aus der ersten Amplifikation. In der zweiten *PCR* bindet mindestens einer der beiden *Primer* an einen anderen Sequenzbereich innerhalb dieser Matrize (*Nested Primer*), wodurch ein kürzeres DNA-Fragment als in der ersten *PCR* um etwa zwei bis drei Zehnerpotenzen.

#### 2.3.12 3'-RACE-PCR

Die 3'-RACE dient der Vervielfältigung der 3'-Enden der cDNA mit Hilfe der *RT-PCR*. Diese Methode wurde mit dem *FirstChoice*® *RLM-RACE Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.3.13 Agarosegel-Elektrophorese

Es wurden 1–2%ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose durch Aufkochen in 1 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (vgl. Abschnitt 2.2.4) gelöst und die Agaroselösung in einen Gelträger gegossen. Die zu analysierenden Proben wurden mit Ladepuffer (*GelPilot Loading Dye* 5 x, Qiagen) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenbestimmung diente die Standard-DNA-Leiter der Firma *Peqlab* (vgl. Abschnitt 2.1.4). Die gelelektrophoretische Trennung der Proben erfolgte für 45–90 Minuten bei 110 V in einer horizontalen Gelkammer (Biometra). Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel für dreißig Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (vgl. Abschnitt 2.2.4) inkubiert. Das Bandenmuster wurde mit einem UV-Transilluminator und der Dokumentationsanlage UV-*Alphalmager* (Biozym) ausgewertet.

#### 2.3.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde die Absorption der Nukleinsäure-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch gemessen. Eine Kontamination der Nukleinsäuren mit Proteinen konnte durch das Verhältnis der Absorption von 260 nm zu 280 nm bestimmt werden. Ein OD<sub>260/</sub>OD<sub>280</sub> Wert von 1,5 entspricht etwa einer 50%igen Protein/Nukleinsäure-Lösung.

#### 2.3.15 Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonukleasen wurden entsprechend der Herstellerangaben zusammen mit ihren Puffersystemen verwendet. Die Inkubationszeit betrug je nach DNA-Menge eine bis mehrere Stunden.

#### 2.3.16 Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese wurde mit dem *QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene durchgeführt. Dieses *Kit* ermöglicht den zielgerichteten Austausch von Nukleotiden an bis zu fünf verschiedenen Stellen gleichzeitig. Die für die zielgerichtete Mutagenese verwendeten *Primer* finden sich im Anhang, Abschnitt 8.3.

# 2.3.17 In-situ-Hybridisierung und Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung

Zur Herstellung von Ribonukleotid-Sonden wurden C-terminale Sequenzbereiche mittels PCR amplifiziert (vgl. Abschnitt 2.3.10) und in den Vektor pGEM-T Easy einkloniert. Dort wird die integrierte Sequenz von den Transkriptionsstartpunkten für RNA-Polymerasen T7 und SP6 flankiert. An diesen Sequenzen wurde in Gegenwart von DIG-markierten Nukleotiden die Transkription gestartet. Das Plasmid wurde mit einem Restriktionsenzym linearisiert, so dass die DNA-Matrize unmittelbar nach dem Insert abbrach. Pro Restriktionsansatz wurden 10 µg Plasmid-DNA aus einer Plasmid-Maxipräparation (vgl. Abschnitt 2.3.3) mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease geschnitten (vgl. Abschnitt 2.3.15). Zur Kontrolle der vollständigen Linearisierung wurden 5 µl des Ansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach vollständiger Linearisierung wurde das Plasmid mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Für die RNA-Synthese wurde der DIG-RNA Labeling Mix der Firma Roche verwendet. Neben den Standard-Nukleotiden enthält dieser Mix auch Digoxigenin-markiertes Uracil, so dass es zu einer Markierung der RNA-Sonde kommt. Der Reaktionsansatz für die Synthese der DIG-markierten Ribonukleotid-Sonden setzte sich wie folgt zusammen:

1 μg linearisierte DNA	x µl
10 x Transkriptionspuffer	2 µl
RNasin Plus <sup>®</sup> (40 <i>Ú</i> /μl)	1 µl
10 x DIG-Mix (Dig-UTP, dNTPs)	2 µl
SP6/T7 RNA-Polymerase (20 U/µI)	2 µl

Die Reaktionsansätze wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die *In-vitro*-Transkription erfolgte über Nacht bei 37 °C und wurde durch die Zugabe von einer *Unit* DNase I bei 37 °C für 15 Minuten gestoppt. Die Inaktivierung der RNA-Polymerase erfolgte durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0). Zur Aufreinigung erfolgte im Anschluss an die *In-vitro*-Transkription eine RNA-Präzipitation durch Zugabe von Lithiumchlorid bis zu einer Endkonzentration von 0,8 M und einem 2,5-fachen Volumen eiskaltem 100% Ethanol. Die Fällung der RNA erfolgte für eine Stunde bei -80 °C. Nach einer Zentrifugation für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C wurden 50 µl eiskaltes 70%iges Ethanol zugegeben und erneut für zehn Minuten bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend bei 37 °C getrocknet und in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Es wurden eine *Sense*- und eine *Antisense*-Sonde synthetisiert. Die *Sense*-Sonde entspricht dem codierenden Strang und stellt beim Nachweis von mRNA eine Negativkontrolle dar.

<u>Alkalische Hydrolyse:</u> Um das Eindringen der Sonden in das Gewebe zu vereinfachen, wurden sie durch eine alkalische Hydrolyse in Fragmente von ~300 Nukleotiden zerlegt. 100 µl der bei der *In-vitro*-Transkription hergestellten RNA wurden 100 µl Hydrolyse-Mix (vgl. Abbschnitt 2.2.1) zugesetzt. Die Hydrolyse erfolgte bei 65 °C, die Hydrolysedauer wurde nach folgender Formel berechnet:

Sondenlänge [kb] – 0,3 kb = x Minuten Sondenlänge [kb] x 0,3 kb x 0,11

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Hydrolyse durch Zugabe von 100 µl Neutralisationslösung beendet. Die Ribonukleotid-Sonden wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Zusammensetzungen der für die In-situ-Hybridisierung verwendeten Puffer und Lösungen finden sich in Abschnitt 2.2.1. Zur Vorbereitung der Präparate wurden die Objektträger zunächst 30 Minuten bei 4 °C in 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal fünf Minuten in 1 x PBS gewaschen und dann fünf Minuten in 70%igem Ethanol inkubiert. Nach zwei Waschschritten für zehn Minuten in DEPC-H<sub>2</sub>O erfolgte eine Permeabilisierung der Gewebe für fünf Minuten in 0,1 M HCI. Anschließend fand eine dreimalige Neutralisation für fünf Minuten in 1 x PBS statt. Um den negativ geladenen Ribonukleotid-Sonden den Zugang in die Zellen zu erleichtern, wurden die Gewebeschnitte 20 Minuten in 0,25% Essigsäureanhydrid (in 0,1 M Triethanolamin) inkubiert und anschließend dreimal fünf Minuten in 1 x PBS gewaschen. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils fünf Minuten in 70%, 80% und 95% Ethanol dehydriert und getrocknet. Auf jeden Gewebeschnitt wurden etwa 250 µl Prähybridisierungspuffer gegeben und die Retinen für drei Stunden bei 37 °C in einer geschlossenen, feuchten Inkubationskammer prähybridisiert. Anschließend wurde der Prähybridisierungspuffer entfernt und ein Hybridisierungsmix (1 µl RNA-Sonde und 300 µl Hybridisierungspuffer) auf die Gewebeschnitte pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte in einer Inkubationskammer bei 55 °C über Nacht. Nach der Inkubation wurde der Hybridisierungsmix von den Objektträgern entfernt und die Objektträger in einem Färbegestell eine Minute in 0,2 x SSC bei 55 °C gewaschen. Als weitere Waschschritte folgten: zweimal 30 Minuten in 0,2 x SSC bei 55 °C, 3 x 90 Minuten in 0,1x SSC/50% Formamid bei 55 °C, zehn Minuten in 0,2 x SSC und zehn Minuten in P1-Puffer. Anschließend erfolgte eine Blockierung mit modified blocking medium (MBM) für 30 Minuten. Die Antikörper-Markierung fand in der dunklen und feuchten Inkubationskammer über Nacht bei 4 °C statt; dazu wurde der Antikörper anti-DIG-AP 1:500 in MBM verdünnt und auf die Gewebeschnitte

pipettiert. Nach der Antikörper-Inkubation wurden die Objektträger für zweimal 15 Minuten in P1-Puffer und für fünf Minuten in P3-Puffer gewaschen. Die Entwicklung erfolgte unter Zugabe von frisch hergestellter Entwicklungslösung in der Inkubationskammer für mehrere Stunden. Dabei wurde die Farbentwicklung der Retinen nach jeweils 30 Minuten überprüft und die Reaktion nach erfolgter Signalentwicklung für 15 Minuten in P4-Puffer abgestoppt. Abschließend wurden die Gewebe für fünf Minuten in DEPC-Wasser gewaschen, getrocknet, mit Fluoromount und einem Deckgläschen bedeckt sowie mit Nagellack versiegelt. Die Permeabilisierung und Hybridisierung erfolgte wie bei der konventionellen In-situ-Hybridisierung. Anschließend wurden die Retinen zehn Minuten in 1 x PBS gewaschen und 15 Minuten in 2%  $H_2O_2$  (in PBS) inkubiert. Die Blockierung mit modified blocking medium (MBM) erfolgte für 30 Minuten. Nach der Blockierung wurden die Gewebeschnitte in einer feuchten Inkubationskammer über Nacht bei 4 °C mit anti-DIG-POD-Antikörpern inkubiert. Dazu wurden die Antikörper 1:500 in MBM verdünnt. Nachdem die Objektträger dreimal für fünf Minuten in TNT-Puffer gewaschen worden waren, erfolgte die Signalentwicklung für sieben Minuten unter Verwendung des TSA<sup>TM</sup> Plus Fluorescence Systems. Dazu wurde Fluorescein und Cyanine 3 1:50 in 1 x Amplification Diluent verdünnt und auf die Schnitte pipettiert. Ein Abstoppen der Reaktion erfolgte durch dreimaliges Waschen in TNT-Puffer für jeweils fünf Minuten. Die Präparate wurden getrocknet, mit Vectashield und einem Deckgläschen bedeckt und mit Nagellack versiegelt.

## 2.3.18 Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente in Plasmide zu integrieren, wurden das *pGEM-T Easy Vector* System (Promega) und das *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche) verwendet. Die Anwendung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### 2.3.19 Transformation von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen wurden zehn Milliliter LB-Medium mit *E.-coli*-Bakterien des Stammes *One Shot<sup>TM</sup>-TOP10* angeimpft. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden 200 ml LB-Medium (vgl. Abschnitt 2.2.5) mit der Über-Nacht-Kultur versetzt und die Zellen bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,6 inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle verbleibenden Arbeiten bei 4 °C durchgeführt. Die Zellsuspension wurde auf 50-ml-Falcon-Gefäße verteilt und zehn Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, die Pellets in 40 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub> resuspendiert und die Suspensionen erneut zentrifugiert. Das

Pellet wurde anschließend in 20 ml CaCl<sub>2</sub> resuspendiert, 30 Minuten auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und jedes Zellpellet in 2 ml eines 15%igen CaCl2/Glycerin-Gemischs resuspendiert. Die Zellen wurden sofort in Portionen zu je 200 µl bei -80 °C eingefroren. Für die Transformation wurden *One Shot<sup>TM</sup>-Top10-E.-coli-*Zellen oder *JM109* chemisch-kompetente *E.-coli-*Zellen der Firma Promega verwendet. 50 µl der tranformationskompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in gekühlte 17 x 100 mm Polypropylene-Kulturröhrchen überführt. Die Bakterien wurden mit 1–3 µl DNA-Lösung versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. In einem Wasserbad erfolgte ein Hitzeschock für eine Minute bei 42 °C. Nach Abkühlung der Bakterien für zehn Minuten auf Eis wurde der Ansatz mit 150 µl LB-Medium versetzt und eine Stunde bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf vorgewärmte LB-Agarplatten (vgl. Abschnitt 2.2.5) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.3.20 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Für die Sequenzierung von *PCR*-Produkten wurden 200 ng DNA in  $12 \mu l ddH_2O$  aufgenommen und mit  $2 \mu l$  ausgewähltem *Primer* versetzt. Für die Sequenzierung von Plasmiden wurde die aufgereinigte DNA mit nukleasefreiem ddH<sub>2</sub>O auf eine Endkonzentration von 80 ng/µl eingestellt. Die Sequenzierung erfolgte von der Firma *Agowa genomics* (Berlin).

Die Analyse der Sequenzierungen erfolgte unter Anwendung des Sequenz-Analyseprogramms *Finch TV (www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml). BLAST* wird verwendet, um experimentell ermittelte DNA- oder Proteinsequenzen mit bereits vorhandenen Sequenzen in einer Datenbank zu vergleichen. Ein Alignment ist der Vergleich von Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen. Für *BLAST*- und Alignmentanalysen wurden folgende Datenbanken genutzt: *EMBL (European Molecular Biology Laboratory, http://www.ebi.ac.uk/Tools/*), BLAST-Server der *NCBI (National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov*) und *ExPASy (Molecular Biology Server, http://us.expasy.org/*). Zur Auswahl der *Primer* wurde das Programm *Primer*3 *OligoAnalyzer 3.1* verwendet.

#### 2.4 Proteinbiochemie

Proteinbiochemische Untersuchungen wie subzelluläre Fraktionierung, SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und *Western-Blot* erfolgten wie in Janssen-Bienhold *et al.*, 2009 beschrieben.

# 2.5 Funktionelle Expressionsstudien

### 2.5.1 Zellkultur

Die Kultivierung von N2A- und HeLa-Zellen erfolgte bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in DMEM (vgl. Abschnitt 2.2.7). Die Passage der Zellen wurde bei etwa 70–80% Konfluenz durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer Trypsin/EDTA-Lösung gewaschen und durch eine 5-minütige Inkubation in der Trypsin/EDTA-Lösung im Inkubator vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellsuspension wurde danach in 3 ml DMEM resuspendiert. Nun wurden 9 ml vorgewärmtes DMEM-Medium in einer frischen Zellkulturflasche vorgelegt und eine halbe Stunde im Inkubator begast. Etwa 1 ml der Zellsuspension wurde in diese Flasche überführt.

# 2.5.2 Transiente Transfektion

Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion passagiert (vgl. Abschnitt 2.5.1). Für die Transfektion wurden in einer 24-*Well*-Platte pro Deckgläschen 50.000 Zellen und pro 6 cm Zellkulturschale 500.000 Zellen ausgesät. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Unmittelbar vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Für die Deckgläschen wurden in 60 µl DMEM 0,4 µg der DNA und 1 µl *Attractene* gelöst, die Ansätze vorsichtig gemischt und zur Präzipitatbildung 10 bis 15 Minuten bei RT inkubiert. Für die 6 cm Zellkulturschalen wurde die zehnfache Menge angesetzt. Die DNA-Attractene-Präzipitate wurden anschließend auf die Zellen pipettiert und 24 Stunden inkubiert (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen biochemisch oder immunzytochemisch analysiert. Bei einer Transfektion mit zwei verschiedenen Plasmiden wurde das Panx2-Konstrukt jeweils in einem Verhältnis von 3 (Panx2) zu 1 (*GFP*) eigesetzt.

## 2.5.3 Immunzytochemie

Die transfizierten N2A- bzw. HeLA-Zellen (vgl. Abschnitt 2.5.2) wurden mit 0,1 M PB (pH 7,4) gewaschen und mit 2% iger PFA-Fixierlösung (vgl. Abschnitt 2.1) bei RT fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal für zehn Minuten mit 0,1 M PB gewaschen und für eine Stunde mit Präinkubationslösung (0,5% Triton X-100, 10% Normal goat serum in 0,1 M PB) inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen für zehn Minuten mit 0,1 M PB wurden die Deckgläschen mit dem

sekundären Antikörper für zwei Stunden inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in Präinkubationslösung. Nach dreimaligem Waschen für zehn Minuten im Dunkeln wurden die Deckgläser mit *Vectashield* (Vectors *Laboratories IncBurlingame*) eingedeckelt.

#### 2.5.4 Elektrophysiologie

Für elektrophysiologische Untersuchungen wurden HeLa- und N2A-Zellen verwendet. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion (vgl. Abschnitt 2.5.2) durch Patch-Clamp-Ableitungen untersucht. Deckgläschen mit kultivierten Zellen wurden in einer Kammer auf dem Objekttisch eines Mikroskops platziert. Die transfizierten Zellen wurden durch ein zusätzlich transfiziertes fluoreszierendes Protein unter 40-facher und 63-facher Vergrößerung identifiziert. Patch-Clamp-Ableitungen gepaarter Zellen wurden mit dem Doppel-Patch-Clamp-Verstärker EPC9 (Heka, Lambrecht) durchgeführt und mit der Software Patchmaster (Heka) ausgewertet. Die Ströme wurden mit einem digitalen Oszilloskop aufgezeichnet. Die Daten entstanden bei einer Frequenz von 1–2 kHz, Leckströme wurden nicht abgezogen. Elektroden mit einem Widerstand von 4-7 MΩ wurden mit dem Verstärker verbunden. Der Serienwiderstand der Elektroden bewegte sich in einem Bereich zwischen acht und 15 M $\Omega$  und wurde nicht kompensiert. Der Serienwiderstand wurde jedoch während des Experimentes sorgfältig überprüft und nur die Messungen mit einem stabilen Serienwiderstand-Messwert für die Auswertung berücksichtigt. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur mit einer Extrazellulärlösung (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 10 mM Glukose, pH 7,4) überspült (0,5 ml/min). Die Intrazellulärlösung für die Ableitungen der Ströme enthielt 120 mM CsCl, 20 mM TEACl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 11 mM EGTA und 10 mM Hepes, pH 7,2. Für jedes Zellpaar wurden sowohl eine initiale Depolarisation als auch eine Hyperpolarisation durchgeführt.

#### 2.6 Immunhistochemie

Die Herstellung der Gefrierschnitte erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, mit folgenden Ausnahmen: Für immunhistochemische Anwendungen wurden die Schnitte auf vorgewärmte, gelatinierte Objektträger (Menzel) gebracht und eine Stunde auf einer Wärmeplatte getrocknet. Die Gefrierschnitte wurden für 15 Minuten bei 30 °C aufgetaut und in TBS/Tx (pH 7,6), 0,1 M PB (pH 7,4) oder TBS (pH 7,6) in Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen der verwendeten Antikörper gewaschen. Alle verwendeten Antikörper mit ihren Inkubationspuffern und Verdünnungen finden sich in Abschnitt 0. Eine Blockierung der unspezifischen

Bindungsstellen erfolgte für eine Stunde mit 10% Ziegenserum (Sigma) in TBS/Tx-100. Die Antikörperinkubation auf den Gefrierschnitten fand über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer statt. Im Anschluss wurden die mit dem Primär-Antikörper inkubierten Objektträger für dreimal zehn Minuten in dem entsprechenden Puffer gewaschen und anschließend mit den sekundären Antikörpern in verschiedenen Konzentrationen (vgl. Abschnitt 0) für zwei Stunden in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in *Vectashield* eingedeckelt. Für Doppelmarkierungen mit zwei primären und zwei sekundären Antikörpern wurden die Schnitte mit beiden primären Antikörpern aus verschiedenen Tierarten verwendet.

Zur Herstellung isolierter Retinazellen wurden zwei Retinen einer acht Wochen alten *C57BL/6*-Maus verwendet. Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen und Medien finden sich in Abschnitt 2.2.7. Die Deckgläschen wurden zuvor eine Stunde mit 500 µl einer ConA-Stocklösung beschichtet und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Retinen wurden bei 37 °C für zehn Minuten in Lösung A und anschließend für 45 Minuten in Papainlösung inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation für fünf Minuten in DMEM/FCS/DNase-I-Lösung. Die Retinen wurden in DMEM gewaschen und in 1 ml MEM aufgenommen. Mit einer englumigen, polierten Pasteurpipette wurden die Zellen dissoziiert und je 500 µl des Überstandes auf ConA beschichtete Deckgläschen pipettiert. Die Anheftung der Zellen fand für 30 Minuten bei 37 °C und 5% Kohlenstoffdioxid im Brutschrank statt. Die immunologische Markierung erfolgte wie oben beschrieben. Die Waschschritte wurden mit TBS-Puffer, pH 7,6 durchgeführt.

#### 2.6.1 Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung

Fluoreszierende Objekte wurden mit einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop (*Leica Microsystems* AG, Wetzlar) aufgenommen. Das Scannen der Objekte erfolgte mit einem x63/1,32 Plan-Apochromat-Objektiv unter einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln. Offset und Gain wurden mit Hilfe der Leica-Software optimal eingestellt. Bei einer Markierung mit mehreren Farben wurde eine Überlappung der verschiedenen Emissionsspektren durch deutliche Trennung der jeweils anregenden Wellenlängen ausgeschlossen. Es wurden mehrere übereinanderliegende Ebenen (Stacks), aufgenommen. Der Abstand der einzelnen Ebenen betrug 0,2 µm. Bei den in dieser Arbeit dargestellten Bilder handelt es sich entweder um Aufnahmen einzelner Ebenen oder um Projektionen von 5–10 Ebenen. Die Bildbearbeitung wurde mit dem Programm Photoshop 7.0 (Adobe, San Jose, CA, USA) durchgeführt.

#### 2.6.2 Elektronenmikroskopie

Für die Waschschritte und Verdünnungen wurde, wenn nicht anders erwähnt, 0,1 M PB-Puffer (vgl. Abschnitt 2.2.2) verwendet. Die präparierte Maus-Retina wurde zweimal für zehn Minuten in 2% Paraformaldehyd fixiert, anschließend dreimal für 20 Minuten gewaschen und über Nacht in 30% Sucrose bei 4 °C inkubiert. Von der Retina wurden 60 µm dicke, tangentiale Gefrierschnitte angefertigt (vgl. Abschnitt 2.3.2) und drei Stunden in 10% Normal goat serum blockiert. Die Inkubation mit dem Pannexin2-Antikörper erfolgte für fünf Tage bei 4 °C. Der Antikörper wurde 1: 100 in PB-Puffer mit 50% Glycerol, 0,5% BSA und 0,02% Natriumazid verdünnt. Anschließend wurden die Schnitte mit einem biotinylierten zweiten Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Pannexin2 wurde als zweiter Antikörper goat anti rabbit in einer Verdünnung von 1: 250 verwendet. Nach einem Waschschritt wurden die Schnitte für 7 Stunden bei 4 °C in Solution A ("Vectastain Elite ABC-Kit", Vector Laboratories) inkubiert. Anschließend wurden die Präparate in Solution B (1: 75 in PB-Puffer) desselben Kits bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach erfolgte eine Reaktion mit Diaminobenzidin (DAB) für sieben Minuten in 0,1% DAB und 30%igem Wasserstoffperoxid. Anschießend erfolgte eine Inkubation in 2,6% Glutaraldehyd, 2% Paraformaldehyd und 3% Sucrose für eine Stunde. Zwischen allen Inkubationsschritten erfolgte ein Waschschritt für 20 Minuten in PB-Puffer. Eine Intensivierung des Diaminobenzidins wurde durch eine Inkubation bei 60 °C für zehn Minuten mit 2.6% Hexamethylentetramin, 0,2% Silbernitrat und 0,2% Borax erreicht. Anschließend wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gewaschen und für zwei Minuten in 0,05% Goldchlorid (in destilliertem Wasser) inkubiert. Nachdem die Präparate mit Wasser gespült wurden, wurden sie mit 2,5% Sodiumthiosulfat (in destilliertem Wasser) für zwei Minuten inkubiert, erneut mit Wasser gespült und eine Stunde mit 1% Osmiumtetroxid (in destilliertem Wasser) inkubiert. Nach einem Waschschritt für 20 Minuten in PB-Puffer wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Acetonreihe (50-100%) dehydriert und in Agar-100-Harz eingebettet. Die Herstellung von Präparaten für elektronenmikroskopische Aufnahmen von Cx36 erfolgte ebenso, mit der Ausnahme, dass Querschnitte der Retina von 100 µm und 200 µm Dicke mit einem Vibratom hergestellt wurden.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Etablierung der Versuchsbedingungen

Cx36 wurde in unserem Labor bereits erfolgreich in Photorezeptoren nachgewiesen (Feigenspan et al., 2004). Deshalb sollten in Anlehnung an das dafür verwendete Protokoll die Bedingungen für die mRNA-Isolierung und RT-PCR optimiert werden. Durch optimale Versuchsbedingungen sollte gewährleistet werden, dass auch schwer zu amplifizierende Templates detektiert werden können. Aufgrund der Annahme, dass Mäuse der C57BL/6-Linie weniger Gap-Junction-Kanäle zwischen Stäbchen und Zapfen ausbilden als 129/Sv-Mäuse (Trümpler et al., 2008; mündliche Aussage Botond Roska), sollten neben Experimenten mit C57BL/6 zusätzlich Versuche mit 129/Sv- Mäusen durchgeführt werden. Studien haben gezeigt, dass es in der Nacht zu einer stärkeren Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen kommt als am Tag (Ribelayga et al., 2008). Deshalb wurde der zirkadiane Rhythmus der 129/Sv-Mäuse durch eine Zeitschaltuhr um zwölf Stunden verschoben, so dass sie sich zur Zeit der Präparation im Nachtrhythmus befanden. Durch diese Bedingungen war eine möglichst starke Expression der Gap-Junction-Proteine zwischen Stäbchen und Zapfen gewährleistet. Für jede Probe wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Andreas Feigenspan bzw. Regina Herrling etwa 200 Photorezeptor-Zellkörper mit einer Patch-Pipette aus der äußeren Kernschicht der Maus-Retina isoliert. Die Cx36-Primer lagen im zweiten Exon der Gensequenz (Genbank-Accession-Nummer NM 010290.2; vgl. Anhang, Abschnitt 8.4). Die amplifizierte Sequenz von 179 Aminosäuren ist in der Aminosäureseguenz von Cx36 in Abbildung 3-1 E in rot dargestellt. Auf das Agarosegel in Abbildung 3-1 A wurden auf der linken Seite die Amplikons nach 34 Zyklen aufgetragen. Hier wurde ausschließlich unter Einsatz der Maus-Retina-Templates ein sichtbares Produkt amplifiziert. Die Amplikons auf der rechten Seite des Agarosegels sind das Resultat einer zweiten Nested-PCR, in welche die Amplikons der ersten PCR als Template eingesetzt worden waren. In der RT-PCR mit Cx36-Primern auf Photorezeptor-Proben wurden die erwarteten Fragmente nur in der Nested-PCR nach insgesamt 68 Zyklen amplifiziert. In den nachfolgenden Versuchen zur Detektion Gap-Junction-mRNA von in Photorezeptoren wurde deshalb eine Nested-RT-PCR mit zweimal 34 Zyklen durchgeführt. Für Cx36 wurde in vier von acht der so getesteten Photorezeptor-Proben ein Fragment der erwarteten Größe amplifiziert. Dabei zeigten zwei von fünf Phototorezeptor-cDNAs aus 129/Sv-Mäusen (Abbildung 3-1 A) und zwei von drei getesteten Photorezeptor-Proben aus *C57BL/6*-Mäusen (Abbildung 3-1 B-D) ein positives Ergebnis.



**Abbildung 3-1.** *RT-PCR* mit Cx36-*Primern.* Das Agarosegel der *PCR* mit Cx36-*Primern* auf Proben einer *129/Sv*-Maus zeigt das erwartete Amplikon unter Einsatz von Maus-Retina-Proben bei 34 Zyklen (**A** linke Seite). Wird eine weitere *Nested-PCR* angeschlossen, wird in zwei Photorezeptor-Proben ein Produkt sichtbar (**A**, rechte Seite). Auf Proben aus *C57BL/6*-Mäusen wurde in einer *Nested-RT-PCR* in zwei von vier Photorezeptor-Proben das erwartete Fragment amplifiziert (**B-D**). Die vervielfältigten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt. Die *Primer*-Bindestellen lagen in der zytoplasmatischen Schleife und dem C-terminalen Ende des Proteins (**E**). PR = Photorezeptor; MR = Maus-Retina; NK = Negativkontrolle.

#### 3.1.1 Kontrollen der Templates

In diesem Abschnitt sind die Kontrollen aller für die PCR verwendeten Photorezeptor- und Maus-Retina-Templates dargestellt. Aufgrund der geringen Menge an Photorezeptor-Template wurde die cDNA nicht in jeder einzelnen PCR, sondern einmal im Anschluss an die reverse Transkription überprüft. Eine einzige Überprüfung ist ausreichend, da die intakten cDNA-Proben im Anschluss an ihre Synthese sofort aliquotiert und eingefroren wurden, wodurch eine Degradation der cDNA durch wiederholtes Auftauen ausgeschlossen werden konnte. In einer reversen Transkription wurde in jeder Probe die mRNA aus etwa 200 Photorezeptoren bzw. einer Retina in cDNA umgeschrieben. Durch die nachfolgend dargestellte RT-PCR mit Intron-überspannenden Rhodopsin-Primern konnten falsch positive Ergebnisse durch Amplifikation auf genomischer DNA und falsch negative Ergebnisse durch nicht funktionsfähige cDNA-Proben ausgeschlossen werden. Unter Einsatz der Intron-überspannenden Rhodopsin-Primer dokumentiert ein einzelnes Amplikon der erwarteten Größe von 333 bp das Vorliegen intakter cDNA und schließt eine Kontamination mit genomischer DNA aus. Beim Einsatz von genomischer Template-DNA wird mit diesen Primern ein Fragment von 454 bp vervielfältigt, welches das dritte Intron der ungespleißten genomischen Rhodopsinseguenz einschließt. In den Kontroll-PCRs wurden 92 cDNAs aus Photorezeptoren und zehn Retina-Proben mit diesem Verfahren überprüft (Abbildung 3-2). In 87 Photorezeptorund allen Retina-Proben wurde jeweils ein einzelnes Fragment mit 333 bp

amplifiziert. DNA-Fragmente von 454 bp wurden ausschließlich beim Einsatz von genomischer DNA vervielfältigt, somit lag in keiner der getesteten cDNAs eine Kontamination mit genomischer DNA vor.



**Abbildung 3-2.** *RT-PCR* mit Rhodopsin-*Primern.* Kontroll-*PCR*s unter Verwendung von cDNAs aus Photorezeptor- (PR) und Retina-Proben (MR). Das Vorliegen intakter cDNA wurde durch Fragmente mit einer Größe von 333 bp angezeigt. Alle cDNA-Proben waren frei von genomischer DNA, da Intron einschließende DNA-Fragmente mit 454 bp nur unter Einsatz von genomischer DNA (gen) vervielfältigt wurden. NK = Negativkontrolle.

# 3.2 Keine Expression von Cx36 in Stäbchen

# 3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis

Doppelimmunmarkierungen mit spezifischen Protein-Markern und Cx36 sollten zeigen, ob Cx36 nur in Zapfen oder zusätzlich in Stäbchen zur Expression kommt. In Abbildung 3-3 wurde ein vertikaler Retinaschnitt immunhistochemisch mit einem monoklonalen Antikörper gegen Cx36 in rot und gegen Velis-3 in grün angefärbt. Der Marker Velis-3 markiert die Membranen der Stäbchen-Spherules und die Zapfen im Bereich der äußeren Kernschicht. Eine gleichzeitige Markierung der Zapfen in der äußeren Kernschicht scheint ungewöhnlich, wurde aber beschrieben (Stöhr et al., 2005) und durch eine vollständige Kolokalisation mit einem Zapfenmarker gegen Glykogen-Phosphorylase durch Katharina Schmidt in unserer Arbeitsgruppe bestätigt. Abbildung 3-3 A zeigt die typische Markierung der Maus-Retina mit einem monoklonalen Cx36-Antikörper in der inneren und äußeren plexiformen Schicht (Feigenspan et al., 2004), Abbildung 3-3 B zeigt das Fusionsbild der mit Velis-3 und Cx36 markierten Retina. Der Ausschnitt der äußeren plexiformen Schicht zeigt die Lokalisation von Cx36 und Velis-3 im Bereich der Stäbchen-Terminalien (Abbildung 3-3 C, D). Die durch Sterne gekennzeichneten Cx36-Markierungen proximal der markierten Stäbchen zeigen die typischen Cx36-Cluster in den Synapsen der Zapfen. Hier liegen die aus Cx36 aufgebauten *Gap Junctions* der *OFF*-Bipolarzellen (Feigenspan *et al.*, 2004). Die durch Pfeilspitzen gekennzeichneten Markierungen zeigen Cx36-Signale im Bereich der *Velis-3*-markierten Stäbchen-Terminalien, bei denen es sich um *Gap-Junction*-Kanäle zwischen Stäbchen und Zapfen handeln kann. Cx36-Signale zeigten sich zusätzlich in den Innensegmenten, in denen die Proteinsynthese stattfindet, und in der äußeren Kernschicht. Die Cx36-Markierungen im Bereich der Photorezeptor-Kerne wurde in früheren Studien damit erklärt, dass Cx36-Proteine vom Proteinsynthese-Apparat der Innensegmente zu den Pedikeln der Zapfen transportiert werden (Feigenspan *et al.*, 2004). In den hier dargestellten Daten zeigte sich eine Lokalisation von Cx36 in der äußeren plexiformen Schicht ausschließlich in *Velis-3*-markierten Zapfen (Abbildung 3-3 E und F). Dieser Befund deutete darauf hin, dass Cx36 ausschließlich in den Zapfen und nicht in Stäbchen lokalisiert ist.



Cx36-Verteilung Abbildung 3-3. Velis-3und auf vertikalen Retinaschnitten. Doppelimmunmarkierung mit einem Velis-3-Antikörper (grün) und einem monoklonalen Antikörper gegen Cx36 (rot) auf Retinaschnitten einer 129/Sv-Maus. Die Übersicht über die gesamte Retina zeigt die typische Verteilung von Cx36 in der inneren plexiformen Schicht (IPL) und in der äußeren plexiformen Schicht (OPL in A, B) und die Lokalisation von Velis-3 in den Terminalien der Stäbchen und in den Zapfen der ONL. Ein Ausschnitt der OPL (C, D) zeigt eine Lokalisation von Cx36 im Bereich der Stäbchen-Terminalien (Pfeile) und in den Synapsen der Zapfen (Sterne). Cx36-Signale finden sich in der ONL fast ausschließlich in den mit Velis-3 markierten Zapfen (E, F). A-D: Projektionen über 2 µm Schichtdicke; E, F: einzelne Aufnahmen. GCL = Ganglienzellschicht; INL = innere Kernschicht; ONL = äußere Kernschicht.

Abbildung 3-4 A und B zeigen den vertikalen Retinaschnitt einer *129/Sv*-Maus, der immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen *Cone Arrestin* und einem monoklonalen Antikörper gegen Cx36 und angefärbt wurde. *Cone Arrestin* markiert die Zapfen-Photorezeptoren und ist hier im Bereich der Zapfen-Terminalien und in den Zapfeninnensegmenten zu erkennen. Cx36 ist in der äußeren plexiformen Schicht rund um die Zapfen-Pedikel lokalisiert. Die Aufnahmen einer Zapfen-Terminalie in Abbildung 3-4 C und D zeigen Cx36-Immunoreaktivität im gesamten Zapfen-Pedikel. Bei dem durch einen Pfeil gekennzeichneten Fortsatz kann es sich um ein Stäbchen-kontaktierendes Zapfen-Telodendrium handeln, das ebenfalls

Cx36-Markierung aufweist. In Bereichen, in denen keine mit *Cone Arrestin* markierten Zapfen vorlagen, waren nur wenige Cx36-Signale zu erkennen. Durch diese Abbildung konnte zwar eine Expression von Cx36 in Stäbchen nicht ausgeschlossen werden, da die Signale im Bereich der Zapfen in Zapfen-kontaktierenden Stäbchenmembranen liegen könnten. Cx36-vermittelte *Gap-Junction*-Kanäle zwischen Stäbchen schienen aufgrund dieser Abbildung jedoch unwahrscheinlich, da in diesem Falle mehr Immunoreaktivität zwischen den Zapfen im Bereich der Stäbchen zu erwarten gewesen wäre. Damit wurde die Annahme, dass Stäbchen nicht Cx36 exprimieren, bestätigt.



Abbildung und 3-4. Cone-Arrestin-Cx36-Verteilung auf Retinaschnitten. Immunhistochemische Markierung mit einem Cone-Arrestin-Antikörper (grün) und einem monoklonalen Antikörper gegen Cx36 (rot) auf vertikalen Retinaschnitten einer 129/Sv-Maus. Die Übersicht über die gesamte Retina zeigt die Cx36-Lokalisation rund um die Zapfen-Terminalien. An Stäbchen-Spherules, die zwischen den Zapfen-Terminalien lokalisiert sind, zeigte sich wenig Cx36-Immunoreaktivität (A, B). Die mit Cone Arrestin und Cx36 markierte Zapfen-Synapse (C, D) zeigt die Lokalisation von Cx36 im der Zapfen-Pedikel und die Cx36-Lokalisation in einem putativen Telodendrium (Pfeil). A, B: Projektionen über 2 µm Schichtdicke; C, D: Einzelne Aufnahme. GCL = Ganglienzellschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; INL = innere Kernschicht; OPL = äußere plexiforme Schicht; ONL = äußere Kernschicht; IS = Innensegmente.

Abbildung 3-5 zeigt eine Doppelimmunmarkierung mit dem polyklonalen Cx36-Antikörper und einem *PSD*95-Marker auf vertikalen Retina-Schnitten. Der Antikörper gegen *PSD*95 markiert die Membranen der Zapfen- und der Stäbchen-Terminalien (Koulen *et al.* 1998, Haverkamp *et al.* 2000a). In der äußeren Retina zeigte der polyklonale Cx36-Antikörper deutliche Immunoreaktivität in den Innensegmenten, der inneren Kernschicht und in der äußeren plexiformen Schicht. Die in Abbildung 3-5 C– E dargestellte Aufnahme der äußeren plexiformen Schicht zeigt deutliche Immunoreaktivität im Bereich der durch *PSD*95 markierten Photorezeptor-Terminalien. Die Doppelimmunmarkierungen mit Protein-Markern und Cx36 gaben bei der Untersuchung weiterer Connexin-Kandidaten einen Hinweis darauf, an welcher Stelle die Immunoreaktivität eines in Photorezeptoren exprimierten Proteins zu erwarten ist. So zeigen zum Beispiel alle in diesem Versuch getesteten Antikörper, die in den Photorezeptor-Terminalien zur Expression kommen, Immunoreaktivität in den Innensegmenten, dem Ort der Proteinbiosythese. Bei den nachfolgenden immunhistologischen Untersuchungen weiterer Connexin-Proteine in Photorezeptoren war oft nicht zu erkennen, ob Signale in der äußeren plexiformen Schicht Photorezeptoren, Bipolarzellen oder Horizontalzellen zuzuordnen sind. Eine deutliche Markierung in den Innensegmenten diente in den weiteren Untersuchungen als Hinweis auf die Expression eines Connexins in Photorezeptoren. .



Abbildung 3-5. Immunoreaktivität von Cx36 und *PSD95* auf vertikalen Retinaschnitten. Die Markierung erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper gegen Cx36 in grün und einem *PSD95*-Antikörper in rot auf der Retina einer *C57BL/6*-Maus. Die Übersicht über die gesamte Retina zeigt starke Cx36-Immunoreaktivität in den plexiformen Schichten und den Innenseqmenten und schwächere Signale in den Kernschichten (**A**, **B**). Eine Aufnahme der OPL zeigt Cx36-Markierungen in den mit *PSD95* markierten Terminalien der Photorezeptoren (**C–E**). A, B: Projektionen über 2 µm Schichtdicke; C–E: Einzelne Aufnahmen. GCL = Ganglienzellschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; INL = innere Kernschicht; OPL = äußere plexiforme Schicht; IS = Innensegmente.

#### 3.2.2 Ultrastruktureller Nachweis

Die immunhistochemischen Analysen deuteten darauf hin, dass Cx36 in Zapfen, aber nicht in Stäbchen exprimiert wird. Um eindeutig zu zeigen, dass Cx36 im Gap-Junction-Kanal zwischen Stäbchen und Zapfen nur auf der Zapfen- und nicht auf der Stäbchenseite lokalisiert ist, wurden ultrastrukturelle Analysen mit Cx36-Antikörpern durchgeführt. In Abbildung 3-6 wurde ein tangentialer Vibratomschnitt der äußeren plexiformen Schicht immunhistochemisch mit einem polyklonalen Antikörper gegen Cx36 behandelt und der Antikörper mit Diaminobenzidin markiert. Die Retina wurde einer acht Wochen alten C57BL/6-Maus entnommen. Abbildung 3-6 A zeigt eine Übersicht der tangential geschnittenen äußeren plexiformen Schicht. Der eingerahmte Ausschnitt zeigt die Terminalie eines Stäbchens (S), die von einem putativen Zapfen-Telodendrium (ZT) kontaktiert wird. In Abbildung 3-6 B ist dieser Abschnitt in einer stärkeren Vergrößerung dargestellt. Zwei Bereiche, an denen der Fortsatz die Stäbchen-Terminalie kontaktiert, weisen Cx36-Markierungen auf (Pfeile). Diese beiden Ausschnitte sind in Abbindung C und D vergrößert dargestellt. Beide Ausschnitte zeigen Cx36-Signale auf der Seite des Fortsatzes, jedoch keine Cx36-Lokalisation in der Zellmembran des Stäbchens. Die Gap-Junction-Plaques hatten eine Große von etwa 200 bis 400 Nanometern. In Abbildung C sind die Zellmembranen im Bereich der Cx36-Markierung nicht so stark aneinander angenähert, wie man es im Falle eines Gap-Junction-Plagues erwarten würde. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise in der Gewebe-Fixierung, die durch Entwässerung den intrazellulären Raum verkleinert. Dieser Versuch wurde auf Retinen sich im Dunkelzustand befindender 129/Sv-Mäuse wiederholt. Weder ein monoklonarer noch ein polyklonarer Cx36-Antikörper zeigten Markierungen in den Terminalien der Stäbchen.



Abbildung 3-6. EM der äußeren plexiformen Schicht mit Cx36-Antikörpern. Die Markierung erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper gegen Cx36 auf der Retina einer *C57BL/6*-Maus. Die Aufnahme der tangentialen äußeren plexiformen Schicht in A zeigt die Synapse eines Stäbchens (S), die von einem Zapfen-Telodendrium (ZT) kontaktiert wird (A). Die vergrößerte Darstellung des umrahmten Ausschnittes zeigt Cx36-Markierungen an zwei Kontaktstellen zwischen Telodendrium und Stäbchen-*Spherule* (B, Pfeile). Diese beiden Ausschnitte zeigen Cx36-Signale ausschließlich im Bereich der Zapfen-Membranen (C, D). (In Zusammenarbeit mit Dr. Konrad Schultz, unveröffentlicht).

#### 3.2.3 Keine 3'-Spleißvariante von Cx36 in Photorezeptoren

Mit einer 3'RACE-Nested-PCR sollten potentielle Spleißvarianten des Cx36-Gens identifiziert werden. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass eine alternative Spleißvariante des Cx36-Gens in Photorezeptoren vorkommt, die von dem verwendeten Antikörper nicht erkannt wird. Die verwendeten "5'-Forward'-Primer lagen im zytoplasmatischen Bereich der Gensequenz. Ein Anker-Primer am 3'-Ende der mRNA ermöglichte die Amplifikation und die Sequenzierung der gesamten 3'-Gensequenz. Es wurde Retina- und Photorezeptor-mRNA einer 129/Sv-Maus verwendet. Das Vorliegen intakter cDNA wurde durch eine 3'-RACE-Nested-PCR derselben Proben mit β-Aktin-Primern bestätigt. Unter Einsatz der Cx36-Primer zeigte die PCR mit Photorezeptor-Templates eine (P) und die der Maus-Retina-Probe vier deutliche Banden (R1-4 in Abbildung 3-7). Das Alignment der sequenzierten Photorezeptor- und Retina-Amplikons zeigte eine 100%ige Übereinstimmung mit der Datenbanksequenz NM 010290.2 (vgl. Anhang, Abbildung 8-1). Die verschiedenen Banden-Größen unter Einsatz der retinalen cDNA entstanden durch verschiedene Bindestellen des Anker-Primers. Sowohl das Amplikon der Photorezeptor-Probe als auch die vier Amplikons der Retina-Proben enthielten die Sequenz der Antikörper-Bindestelle. Die Sequenzierung der

schwachen Doppelbande (R3) zeigte keine Verunreinigungen mit einer weiteren Sequenz. Damit ist ausgeschlossen, dass in Photorezeptoren eine alternative Spleißvariante des Cx36-Gens existiert, die nicht von den verwendeten Antikörpern erkannt wird.



**Abbildung 3-7.** *RACE-PCR* mit Cx36-*Primern.* Es wurde je eine Maus-Retina- und eine Photorezeptor-Probe einer *129/Sv*-Maus mit  $\beta$ -Aktin-*Primern* (links) und Cx36-*Primern* (rechts) verwendet. Unter Einsatz der Cx36-*Primer* zeigte die *PCR* mit Photorezeptor-*Templates* eine und die der Maus-Retina-Probe vier Banden. PR = Photorezeptor; MR = Maus-Retina; NK = Negativkontrolle.

### 3.3 Expressions analyse von Gap-Junction-Proteinen in Photorezeptoren

Durch *RT-PCR*-Analysen wurde die Connexin-Expression in Photorezeptoren untersucht. Durch die Verwendung von spezifischen und degenerierten *Primern* bestand die Möglichkeit, sowohl bekannte als auch unbekannte Connexine zu identifizieren. Zunächst wurde jedes Connexin mit spezifischen *Primern* in einer *RT-PCR* auf die mRNA-Expression in Photorezeptoren untersucht. Unter jedem Agarosegel befindet sich die Proteinsequenz, innerhalb der die amplifizierte Sequenz und die Transmembrandomänen dargestellt sind. Daraus geht hervor, in welchem Bereich des Proteins der jeweils verwendete *Primer* bindet. In Abschnitt 8.4 befinden sich DNA-Sequenzen für jedes Connexin, die zeigen, in welchem Exon der verwendete *Primer* hybridisierte. Die mit *RT-PCR* detektierten Connexine wurden mit immunhistochemischen Analysen auf eine Protein-Expression in den Terminalien der Photorezeptoren untersucht. Sofern eine Lokalisation im Bereich der Photorezeptor-Terminalien vorlag, wurde das jeweilige Connexin auf Kolokalisation mit Cx36 überprüft. Eine Übersicht aller dieser Untersuchungen ist in Tabelle 3-1 dargestellt.

#### Tabelle 3-1. Connexin Expression in Photorezeptoren und Retina der Maus.

Die Übersicht zeigt die Expression von Connexinen in Retina und Photorezeptoren von *129/Sv*und *C57BL/6*-Mäusen. Auf retinaler cDNA konnten die Fragmente aller Connexine, mit Ausnahme von Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx31.1 und Cx 39, amplifiziert werden. Die Amplifikation von Cx32, Cx36, Cx43, Cx45, Cx50 und Cx57 unter Einsatz von Photorezeptor-Proben konnte durch Sequenzierung der amplifizierten Fragmente gezeigt werden. MR = Maus-Retina; PR = Photorezeptoren.

	mRNA-	<i>PCR</i> auf Photorezeptoren				
	Expres-			Protein-Expression		
	sion	C57BL/6	129/Sv			
		getestet	getestet			
		(positiv)	(positiv)			
Cx23	+	6	6			
Cx26	+	2	6			
Cx29	+	1	6			
Cx30			6			
Cx30.2	+		10			
Cx30.3			6			
Cx31			6			
Cx31.1			6			
Cx32	+	10 <b>(5)</b>		keine Protein-Expression in der Retina		
Cx33	+	1	6			
Cx36	+	3 (2)	5 <b>(2)</b>	Cx36-Proteine werden nicht in Stäbchen- Terminalien exprimiert		
Cx37	+		6			
Cx39			6			
Cx40	+	3	6			
Cx43	+	13 <b>(3)</b>	6	Proteine ausschließlich im Bereich der Ganglienzellen und im Pigmentepithel		
Cx45	+	16 <b>(7)</b>	10 <b>(6)</b>	Immunoreaktivität im Bereich der Photorezeptor-Terminalien; keine Kolokalisation mit Cx36		
Cx46	+		6			
Cx47	+	2	6			
Cx50	+	1	18 <b>(5)</b>	Immunoreaktivität proximal der Photorezeptor-Terminalien, wahrscheinlich in Horizontalzellen		
Cx57	+		8 (2)	Immunoreaktivität im Bereich der Photorezeptor-Terminalien; keine Kolokalisation mit Cx36		

### 3.3.1 Cx23, Cx26 und Cx29

Für die *RT-PCR* zur Detektion von Cx23-mRNA auf Photorezeptoren wurden zwei verschiedene *Primer*-Kombinationen (Abbildung 3-8 C) gegen die codierende Sequenz von Cx23 verwendet. Als Ergebnis der *PCR* mit der *Primer*-Kombination "Cx23" auf *C57BL/6*-Mäusen zeigte sich ein Fragment der erwarteten Größe von 505 bp unter Verwendung einer Maus-Retina-Probe, nicht aber bei Verwendung von Photorezeptor-cDNA (Abbildung 3-8 A). Abbildung 3-8 B zeigt das Ergebnis einer *RT-PCR* mit der *Primer*-Kombination "Cx23Okt09" auf *129/Sv*-Mäusen. Hier erschien auf dem Agarosegel ein Amplikon erwarteter Größe von 264 bp im Falle der Maus-Retina; die sechs Photorezeptor-Proben blieben ohne amplifiziertes Produkt.



**Abbildung 3-8.** *Nested-RT-PCR* mit Cx23-*Primern. PCR* mit den *Primern* "Cx23" auf Proben einer *C57BL/6*-Maus (**A**) und den *Primern* "Cx23Okt09" auf Proben einer *129/Sv*-Maus (**B**). In allen Fällen zeigten keine Photorezeptor-, sondern ausschließlich die Retina-Proben das erwartete DNA-Fragment. Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt. Die "Cx23"-*Primer* binden in der zweiten zytoplasmatischen Schleife und der 3' untranslatierten Region des Cx23-Gens mit der Genbank-*Accession*-Nummer NM 029722.1, die *Primer* "Cx23Okt09" binden in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife (**C**). PR = Photorezeptor; MR = Maus-Retina; NK = Negativkontrolle.

Um die Expression von Cx26 mit der Genbank-*Accession*-Nummer NM 008125.3 mittels *RT-PCR* in Photorezeptoren zu überprüfen, wurden drei verschiedene *Primer* hergestellt (Abbildung 3-9 D). Mit den *Primer*-Kombinationen "Cx26 A" und "Cx26 B" wurde das erwartete DNA-Fragment von 246 bp bzw. 271 bp in Retina-Proben von *C57BL/6*-Mäusen amplifiziert (Abbildung 3-9 A, B). Mit den *Primern* "Cx26Okt09" wurde das *PCR*-Produkt in der Retina von *129/Sv*-Mäusen amplifiziert (Abbildung 3-9 C). Im Falle der Photorezeptoren wurden keine PCR-Produkte amplifiziert.



**Abbildung 3-9.** *Nested-RT-PCR* mit Cx26-*Primern*. Es wurden die *Primer* "Cx26A" (A und linke Seite B) und "Cx26B" (rechte Seite B) auf Proben einer *C57BL/6*-Maus und die *Primer* "Cx26Okt09" auf Proben einer *129/Sv*-Maus (C) verwendet. Alle Agarosegele zeigen die erwarteten Fragmente im Falle der Retina-Proben (MR), aber kein Signal unter Einsatz der Photorezeptor-Proben (PR). Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt. Der *Primer* "Cx26 A" bindet in der Sequenz der zytoplasmatischen Schleife und der zweiten extrazellulären Schleife, *Primer* "Cx26 B" in der extrazellulären und der zytoplasmatischen Schleife und der C-teminalen Ende und *Primer* "Cx26Okt09" in der ersten extrazellulären und der zytoplasmatischen Schleife des Proteins (D). NK = Negativkontrolle.

Für den Nachweis von Cx29 *mit der Accession*-Nummer NM 080450.4 wurden zwei verschiedene *Primer* eingesetzt, deren *PCR*-Produkte 408 bp und 344 bp umfassten (Abbildung 3-10 D). Mit beiden *Primer*-Kombinationen wurde das erwartete DNA-Fragment von 408 bp bzw. 344 bp auf Retina-Proben jedoch nicht auf Photorezeptor-Proben amplifiziert (Abbildung 3-10 A–C).



**Abbildung 3-10.** *Nested-RT-PCR* mit Cx29-*Primern*. Die *PCR* erfolgte mit dem *Primer* "Cx29cyt/*loop*/c-term" auf Proben einer *C57BL/6*-Maus (**A** und **B**) und mit dem *Primer* "Cx29Okt09" auf Proben einer *129/Sv*-Maus (**C**). Alle Agarosegele zeigen die erwarteten Fragmente im Falle der Retina-Proben (MR), aber kein Signal unter Einsatz der Photorezeptor-Proben (PR). Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt. Der *Primer* "Cx29*cytloop/c-term*" bindet an die Sequenz der zytoplasmatischen Schleife und den C-Terminus, der *Primer* "Cx29Okt09" an die dritte Transmembrandomäne und das C-terminale Ende des Proteins (**D**). NK = Negativkontrolle.

#### 3.3.2 Cx30, Cx30.3 und Cx31.1

Die Expression von Cx30, Cx30.3 und Cx31.1 wurde mit jeweils einer *Primer*-Kombination (Abbildung 3-11 D-F) auf sechs Photorezeptoren einer *129/Sv*-Maus überprüft (Abbildung 3-11 A-C). Als Positivkontrolle wurde für alle drei Connexin-Gene die cDNA aus Haut verwendet, da die Connexine in diesem Gewebe zur Expression kommen. DNA-Fragmente der erwarteten Größe wurden unter dem Einsatz von HautcDNA, nicht jedoch unter Verwendung von Photorezeptor-Proben amplifiziert.



Abbildung 3-11. Nested-RT-PCR mit Cx30-, Cx31.1- und Cx30.3-Primern. Die Agarosegele (A–C) zeigten ein Fragment der erwarteten Größe im Falle der Haut-Probe, aber kein Signal unter Einsatz der Photorezeptor-Proben (PR). Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt. Die Primer gegen die Cx30-Gensequenz mit der Accession-Nummer NM 001010937.1 (D) und die Primer gegen das Cx30.3-Gen mit der Accession-Nummer NM 008127 (E) entsprechen in der Proteinsequenz Bereichen in der zytoplasmatischen Schleife und dem C-terminalen Ende. Die Primer gegen das Gen Cx31.1 mit der Accession-Nummer NM 010291.3 entsprechen Sequenzen in der dritten Transmembrandomäne und dem C-terminalen Ende des Proteins (F). NK = Negativkontrolle.

#### 3.3.3 Cx30.2 und Cx31

Um die Expression von Cx30.2 mit der Accession-Nummer NM 178596.2 in Photorezeptoren zu untersuchen, sollte die PCR zunächst unter Einsatz von retinaler cDNA optimiert werden. Obwohl Cx30.2 sowohl in Ganglienzellen als auch in Amakrinzellen der Retina vorkommt (Müller et al., 2010), erwies sich die Amplifikation des Cx30.2-Gens als problematisch. Es wurden 16 verschiedene Primer in zehn verschiedenen Kombinationen und unter verschiedenen Bedingungen getestet. Als Templates wurden neben der cDNA aus retinalem Gewebe auch cDNA aus Hirn und Herz verwendet, in denen Cx30.2 ebenfalls zur Expression kommt (Kreuzberg et al., 2005; Kreuzberg et al., 2006). Die Verwendung der Primer-Kombination Cx30.2P6 unter Zugabe von 8% DMSO oder Q-Solution (Qiagen) ermöglichte schließlich die schwache Amplifikation eines Cx30.2-Fragmentes mit einer Fragmentgröße von 740 bp (Abbildung 3-12 A). Die verwendeten Primer lagen im 3' untranslatierten Bereich und dem C-terminalen Ende des Cx30.2-Gens (Abbildung 3-12 D). Die Expression von Cx30.2 wurde unter diesen Bedingungen auf jeweils zwei Proben aus Hirn und Herz und vier Proben aus Retina überprüft. Das Ergebnis zeigte auf Herz nur ein schwaches Amplikon und auf Hirn ein deutliches Signal. Von den vier Retina-Proben zeigte nur eine Probe ein amplifiziertes Fragment (Abbildung 3-12 B). Durch  $\beta$ -Aktin-*Primer* wurde gezeigt, dass die cDNA aller Proben intakt war (nicht dargestellt). Die ausgetesteten Bedingungen wurden in einer Nested-RT-PCR auf zehn Photorezeptoren einer 129/Sv-Maus überprüft (Abbildung 3-12 C). Ein Fragment wurde unter Einsatz der cDNA aus Retina, Hirn und Herz, nicht jedoch unter Verwendung von Photorezeptor-Proben amplifiziert.

Wenn schon die Amplifikation auf Templates guter Qualität schwierig ist, ist es fraglich, ob eine Amplifikation auf schwierigen Templates wie Photorezeptoren überhaupt möglich ist. Leider ließ sich die *PCR* nicht weiter optimieren. Große Probleme bei der Amplifikation von Cx30.2 wurden auch von anderer Seite bestätigt (Aussagen Mitarbeiter AG Nothwang; Stephen Sonntag). Die erforderliche Zugabe von DMSO und eine Analyse der Sequenz ließen vermuten, dass das Gen die Tendenz hat, Haarnadel-Strukturen auszubilden, wodurch die *RT-PCR* behindert wird. Bei der amplifizierten Sequenz handelte es sich um eine von der Genbank-Sequenz abweichenden Cx30.2-Spleißvariante. Während für die Genbank-Sequenz nur ein Exon verzeichnet ist, das die komplette codierende Region und die 3'-untranslatierte Region enthält, wurde in der aus der Maus-Retina isolierten Spleißvariante ein weiteres untranslatiertes Exon identifizierte. Diese Sequenz deckt sich mit der vor Kurzem in Herz und Hirn identifizierten Cx30.2-Gensequenz

(Kreuzberg *et al.*, 2005). Im Anhang ist die aus der Retina isolierte Sequenz in einem Alignment mit der Genbank-Sequenz dargestellt (vgl. Abschnitt 8.4). Da die Expression von Cx30.2 in Photorezeptoren durch *RT-PCR* Analysen nicht komplett ausgeschlossen werden konnten, sind weitere Analysen auf Protein-Ebene notwendig. Aus der in der Maus-Retina identifizierten Cx30.2-Sequenz wurde eine Peptidsequenz ausgesucht, gegen die ein Antikörper hergestellt wird, der bei der Firma Pineda in Auftrag gegeben wurde.



Abbildung 3-12. Nested-RT-PCR auf Photorezeptoren mit Cx30.2-Primern. Die Amplifikation eines schwachen Cx30.2-Fragmentes auf Herz-cDNA war nach 34 Zyklen nur unter Einsatz der Primer Cx30.2P6 und unter Zugabe von 8% DMSO oder Q-Solution möglich (A). Unter diesen Bedingungen ließ sich das Gen im Falle von zwei verschiedenen Herz-cDNAs nur schwach amplifizieren. Zwei verschiedene Hirn-cDNAs zeigten ein starkes Signal. Von vier Retina-Proben wurde nur in einer Probe ein Produkt amplifiziert (B). Unter Verwendung einer Nested-PCR (C) zeigte sich das erwartete Fragment von 740 bp im Falle der Herz-, Hirn- und Retina-Proben (MR), aber kein Signal unter Einsatz der Photorezeptor-Proben (PR). Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt (D). NK = Negativkontrolle.

Die Gensequenz von Cx31 wurde bereits durch die *RT-PCR* mit degenerierten Connexin-*Primern* amplifiziert. Dabei handelte es sich um humanes CX31 mit der *Accession*-Nummer NM 001160012.1 und nicht um das Cx31 der Maus mit der *Accession*-Nummer NM 008126.2. CX31 liegt in menschlichen Hautschuppen auf allen Oberflächen und auch in der Luft vor. Um eine Amplifikation auf humanem CX31 zu vermeiden, wurden *Primer* synthetisiert, die ausschließlich an das murine Cx31 binden. Dies war nur durch *Primer* möglich, die in der 3' untranslatierten Region der mRNA lagen (vgl. Abschnitt 8.4). Das Vorliegen von Cx31-Transkripten wurde mit dieser *Primer*-Kombination auf sechs Photorezeptoren einer *129/Sv*-Maus überprüft (Abbildung 3-13). Das Fragment der erwarteten Größe von 279 bp wurde im Falle der cDNA der Haut, nicht jedoch unter Verwendung von Photorezeptor-Proben amplifiziert.



**Abbildung 3-13.** *Nested-RT-PCR* mit Cx31-*Primern*. Die *RT-PCR* mit Cx31-*Primern* auf Proben einer *129/Sv*-Maus zeigte ein Fragment der erwarteten Größe von 279 bp im Falle der HautcDNA; aber kein Signal unter Einsatz der Photorezeptor-Proben (PR). NK = Negativkontrolle.

### 3.3.4 Cx32 und Cx33

Die Expression von Cx32 mit der *Accession*-Nummer NM 008124.2 wurde mit einer *Nested-RT-PCR* auf zehn Photorezeptoren einer *C57BL/6*-Maus überprüft. Die Bindestellen lagen in der zytoplasmatischen Schleife und dem C-terminalen Ende des Proteins (Abbildung 3-14 B). Fünf der zehn getesteten Photorezeptor-Proben zeigten auf dem Agarosegel ein positives Signal (Abbildung 3-14 A).



**Abbildung 3-14**. *Nested-RT-PCR* mit Cx32-*Primern*. Die *RT-PCR* mit Cx32-*Primern* zeigte in fünf von zehn Photorezeptor-Proben (PR) aus *C57BL/6*-Mäusen ein positives Signal (**A**, 1-5). Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt (**B**). NK = Negativkontrolle; gen = genomische DNA.

Das erste positive *PCR*-Produkt "1" aus Abbildung 3-14 A wurde einkloniert und sequenziert. Aus der Sequenzierung ergab sich 100%ige Übereinstimmung mit der Gensequenz von Cx32 (vgl. Anhang, Abbildung 8-3). Die übrigen Amplikons wurden durch analytischen Restriktionsverdau auf das Vorliegen der Cx32-Gensequenz überprüft. Die Sequenz des Amplikons von Cx32 wird durch das Enzym *Ncol* in Fragmente von 277 bp und 174 bp geschnitten. Die *PCR*-Produkte 2, 3, 4, 5 und der Maus-Retina zeigten nach Behandlung mit diesem Enzym das erwartete Bandenmuster (Abbildung 3-15).



Abbildung 3-15 Alle Photorezeptor-Amplikons bestehen aus der Cx32-Sequenz. Alle Photorezeptor-Amplikons zeigen nach Behandlung mit *Nco*I das erwartete Bandenmuster.

#### Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob die detektierte Cx32-mRNA auch als Protein in Photorezeptoren zur Expression kommt, wurde die Protein-Expression von Cx32 immunhistochemisch auf vertikalen Retinaschnitten acht Wochen alter Mäuse analysiert. In Abbildung 3-16 wurden die Retinen einer *129/Sv*-Maus (A) und einer *C57BL/6*-Maus (B) mit einem Cx32- und einem *Cone-Arrestin*-Antikörper markiert. Der *Cone-Arrestin*-Antikörper wurde als Zapfen-markierender Marker eingesetzt. Während in Lebergewebe als Kontrolle *Gap-Junction*-Plaques angefärbt wurden (C), wurde unter den gleichen Versuchs- und Aufnahmebedingungen kein Zelltyp in der Retina durch den Cx32-Antikörper markiert. Ähnlich wie schon in früheren Studien gezeigt (Söhl *et al.*, 2000; Güldenagel *et al.*, 2000), konnte Cx32 nur als mRNA und nicht als Protein in der Retina der Maus nachgewiesen werden.



Abbildung 3-16. Cx32-Immunoreaktivität der Maus-Retina. Projektionen vertikaler Retinaschnitte aus *C57BL/6*- (A) und *129/Sv*-Mäusen (B) zeigten keine Cx32-Immunoreaktivität (grün). Im Kontrollgewebe der Leber sind Cx32-typische Markierungen zwischen benachbarten Zellen zu erkennen (C). Es sind Projektionen konfokaler Mikrofotografien über eine Schichtdicke von zwei Mikrometern zu sehen. GCL = Ganglienzellschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; INL = innere Kernschicht; OPL = äußere plexiforme Schicht; ONL = äußere Kernschicht; IS = Innensegmente.

Um die Expression von Cx33 mit der *Accession*-Nummer NM 001001496.2 in Photorezeptoren zu überprüfen, wurden zwei verschiedene *Primer*-Kombinationen verwendet (Abbildung 3-17 D). Mit der *Primer*-Kombination "Cx33" wurde das erwartete DNA-Fragment von 339 bp in Retina-Proben von *C57BL/6*-Mäusen (Abbildung 3-17 A und B), mit der Kombination "Cx33Okt09" ein Fragment von 269 bp in Retina-Proben von *129/Sv*-Mäusen amplifiziert (Abbildung 3-17 C). Unter dem Einsatz von Photorezeptor-cDNA konnte die Cx33-Sequenz nicht vervielfältigt werden.



Abbildung 3-17 Nested-RT-PCR mit Cx33-Primern. Auf Proben einer C57BL/6-Maus wurde mit den Primern "Cx33" das erwartete Fragment von 339 bp nicht auf Photorezeptor-Templates, sondern ausschließlich auf Retina-cDNA amplifiziert (**A**, **B**). Auf Proben einer 129/Sv-Maus ergab sich für Primer "Cx33Okt09" mit einem Amplikon von 269 bp das gleiche Ergebnis (**C**). Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt. Die Primer "Cx33Okt09" in der ersten extrazellulären und der zytoplasmatischen Schleife und dem C-terminalen Ende, die Primer "Cx33Okt09" in der ersten extrazellulären und der zytoplasmatischen Schleife des Proteins (**D**). PR = Photorezeptor; MR = Maus-Retina; NK = Negativkontrolle.

#### 3.3.5 Cx37 und Cx39

А				В	kel	
	<u>ዥ ዥ ዥ ዥ ዥ</u> 129/Sv		■ 417 bp		Sv Cx39	◀ 508 bp
<b>C</b> 1 61 121 181 241 301	Amplikon Cx mgdwgflekl ctnvcydqaf lhveralaai mepvfvcqra karrdhdarp tssrpppfvn	<pre>37 (Agarose ldqvqehstv pishirywvl ehqmakisva pcphivdcyv aqgsasdpyp tapqggrksp</pre>	gel A) vgkiwltvlf qflfvstptl edgrlrirga srptektifi eqvffylpmg srpnssaskk	ifrililgla iylghviyls lmgtyvvsvl ifmlvvgvis egpssppcpt qyv	gesvwgdeqs rreerlrqke cksvleagfl lvlnllelvh ynglssteqn	dfecntaqpg gelralpskd ygqwrlygwt llcrcvsrei wanltteerl
<b>D</b> 1 61 121 181 241 301 361	Amplikon C meklnllgfl canvcydlfs ylvhllrml avsalsflls dqedrqeeqv ahelrfhret sewv	x39 (Agaros iitlncnvti pvsplrfwlv leaglaflhy ladllwilpr vpefpcmwta sldlggkntq	egel B) mgmiwlivev qslalllpsv flfgfsvpar rktlrttqwv gqsdnsnvgq adelslatqs	llrmlvvvla vfgtytlhrg vscshvpcsg ngearpvcev acvsgllehs hlarhssask	gspiyedeqe aklaavggac avdcyvsrpt papppcllqn dqdaseatss pqapcrltts	rficntlqpg rpqvpdlsta eksllilffw pqgylsqgqv agdrltvaht gsaphlrtkk

**Abbildung 3-18.** *Nested-RT-PCR* mit Cx37- und Cx39-*Primern.* Die Agarosegele zeigten ein Fragment der erwarteten Größe im Falle der Retina-Probe für Cx37 (**A**) und der Muskel-Probe für Cx39 (**B**), aber kein Signal unter Einsatz der Photorezeptor-Proben (PR). Die amplifizierten Bereiche sind in den Aminosäuresequenzen rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt. Beide *Primer*-Kombinationen liegen in der zytoplasmatischen Schleife und dem C-terminalen Ende der Aminosäuresequenz (**C**, **D**).

Die Expression von Cx37 und Cx39 mit der *Accession*-Nummer NM 008120.2 und NM 153086.5 wurde in einer *RT-PCR* auf jeweils sechs Photorezeptoren einer *129/Sv*-Maus überprüft (Abbildung 3-18 C, D). Abbildung 3-18 C zeigt die erwarteten Fragmente von 417 bp für Cx37 (Abbildung 3-18 A) und 508 bp für Cx39 (Abbildung 3-18 B). *PCR*-Produkte dieser Größe wurden unter dem Einsatz von Retina- und Muskel-cDNA, nicht jedoch unter Verwendung von Photorezeptor-Proben amplifiziert.

## 3.3.6 Cx40 und Cx43

Um die Expression von Cx40 mit der *Accession*-Nummer NM 008121.2 in Photorezeptoren zu überprüfen, wurden zwei verschiedene *Primer* hergestellt (Abbildung 3-19 E). Mit den *Primern* "Cx40" wurde das erwartete DNA-Fragment von 602 bp in Retina-Proben aus *C57BL/6*-Mäusen amplifiziert (Abbildung 3-19 A–C). Das gleiche Ergebnis ergab sich mit den *Primern* "Cx40Okt09" auf Proben aus *129/Sv*-Mäusen mit einem Amplikon von 355 bp (Abbildung 3-19 D). Im Falle der Photorezeptoren blieben alle Proben von *C57BL/6* (3 Proben) und *129/Sv* (6 Proben) ohne amplifiziertes Produkt.



**Abbildung 3-19.** *Nested-RT-PCR* mit Cx40-*Primern*. Es wurden die *Primer* "Cx40" auf Proben einer *C57BL/6*-Maus (**A–D**) und die *Primer* "Cx400kt09" auf Proben einer *129/Sv*-Maus (**D**) verwendet. Alle Agarosegele zeigen die erwarteten Fragmente im Falle der Retina-Proben (MR), aber kein Signal unter Einsatz der Photorezeptor-Proben (PR). Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt. Die *Primer* "Cx40" liegen in der zytoplasmatischen Schleife und dem C-terminalen Ende, die *Primer* "Cx400kt09" in der dritten Transmembrandomäne und dem C-terminalen Ende des Proteins (**E**). NK = Negativkontrolle.

Zur Detektion von Cx43 mit der Genbank-*Accession*-Nummer NM 010288.3 wurden zwei verschiedene *Primer* eingesetzt, deren *PCR*-Produkte 460 bp und 222 bp umfassen (Abbildung 3-20 E). Mit den *Primern* "Cx43" wurde ein DNA-Fragment der erwarteten Größe in Retina-Proben aus *C57BL/6*-Mäusen amplifiziert (Abbildung 3-20A). Mit der *Primer*-Kombination "Cx43Okt09" konnte ein Fragment in Retina-Proben und in drei von zwölf Photorezeptor-Proben aus *C57BL/6*-Mäusen vervielfältigt werden (Abbildung 3-20 B, C). Unter der Verwendung von Proben aus *129/Sv*-Mäusen zeigte sich nur nach Einsatz der Retina-*Templates* ein *PCR*-Produkt (Abbildung 3-20 D). Das positive *PCR*-Produkt einer Photorezeptor-Probe wurde einkloniert und sequenziert. Aus der Sequenzierung ergab sich 100%ige Übereinstimmung mit der Gensequenz von Cx43 (vgl. Anhang, Abbildung 8-4).



**Abbildung 3-20.** *Nested-RT-PCR* mit Cx43-*Primern*. Die *Primer* "Cx43" wurden auf Proben einer *C57BL/6*-Maus (**A**) und die *Primer* "Cx43Okt09" auf Proben von *129/Sv*- und *C57BL/6*-Mäusen (**B–D**) verwendet. Alle Agarosegele zeigen die erwarteten Fragmente im Falle der Retina-Proben (MR). Mit den *Primern* "Cx43Okt09" wurden auf drei Photorezeptor-Proben (PR) von *C57BL/6*-Mäusen Fragmente amplifiziert. Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt. Die *Primer* "Cx43<sup>°</sup> liegen in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife, die *Primer* "Cx43Okt09" in der zytoplasmatischen Schleife und der vierten Transmembrandomäne des Proteins (**E**). NK = Negativkontrolle.

Um zu prüfen, ob die mRNA-Expression von Cx43 auf Protein-Ebene bestätigt werden kann, wurde die Expression von Cx43 immunhistochemisch an einer *129/Sv*-Maus (Abbildung 3-21 A) und einer *C57BL/6*-Maus (Abbildung 3-21 B) analysiert. Um die funktionsfähigkeit des Cx43-Antikörpers zu überprüfen, wurden Gewebeschnitte des Maus-Herzens verwendet, in dem Cx43-Proteine *Gap-Junction*-Kanäle ausbilden (Fromeget *et al.*, 1990). In den Zellmembranen der Herzmuskelzellen waren Cx43-Signale zu erkennen (Abbildung 3-21 C). In der
Retina beider Mauslinien zeigte sich Immunoreaktivität im Bereich der Ganglienzellschicht. Das bestätigt Studien, die Cx43-Immunoreaktivität in der Ganglienzellschicht und in der Nervenfaserschicht beschreiben (Kihara *et al.*, 2006). Außerdem zeigten sich Markierungen mit dem Cx43-Antikörper im Pigmentepithel. Da keine Cx43-Immunoreaktivität in der äußeren plexiformen Schicht beobachtet wurde, konnte eine Lokalisation von Cx43 in Photorezeptoren ausgeschlossen werden.



Abbildung 3-21. Cx43-Verteilung in Retina und Herz. Immunhistochemische Markierung mit einem Antikörper gegen Cx43 zeigten auf vertikalen Retinaschnitten einer 129/Sv-Maus (A) und einer C57BL/6-Maus (B) Signale im Bereich der Ganglienzellen und in Membranen des Pigmentepithels. Im Herzen einer C57BL/6-Maus zeigte sich das typische Gap-Junction-Muster (C). Es sind Projektionen konfokaler Mikrofotografien über eine Schichtdicke von zwei Mikrometern zu sehen. GCL = Ganglienzellschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; INL = innere Kernschicht; OPL = äußere plexiforme Schicht; ONL = äußere Kernschicht; IS = Innensegmente.

## 3.3.7 Cx45 und Cx46

Um die Expression von Cx45 mit der Genbank-*Accession*-Nummer NM 001159382.1 in Photorezeptoren zu untersuchen, wurden zwei verschiedene *Primer*kombinationen verwendet (Abbildung 3-22 G). Im Falle der Retina-Proben und in 13 von 26 getesteten Photorezeptor-cDNAs wurde ein Produkt der erwarteten Größe amplifiziert. Dabei handelte es sich um sieben positive von insgesamt 16 Proben aus *C57BL/6*-Mäusen (Abbildung 3-22 A–D und F) und um sechs positive von insgesamt zehn Proben aus *129/Sv*-Mäusen (Abbildung 3-22 E, F). In Abbildung 3-22 F wurden das Produkt der ersten *PCR* nach 34 Zyklen (links) und das Produkt der zweiten *Nested-PCR* nach zweimal 34 Zyklen (rechts) auf das Agarosegel aufgetragen. Cx45 war das einzige Connexin, bei dem in Photorezeptor-Proben bereits nach 34 Zyklen

ein Amplikon zu sehen war (Abbildung 3-22 E, Pfeile). Ein Amplikon des *Primers* "Cx45Okt09" wurde sequenziert. Aus der Sequenzierung ergab sich eine 93%ige Übereinstimmung mit der Gensequenz von Cx45 (vgl. Anhang, Abbildung 8-5). Damit handelt es sich bei dem amplifizierten Genprodukt um Cx45. Die von der Cx45-Sequenz abweichenden Basen sind auf Sequenzierfehler zurückzuführen.



**Abbildung 3-22.** *Nested-RT-PCR* mit Cx45-*Primern.* Es wurden die *Primer* "Cx45" auf Proben einer *C57BL/6*-Maus (**A–D**) und die *Primer* "Cx450kt09" auf Proben von *C57BL/6*- und *129/Sv*-Mäusen (**E**, **F**) verwendet. Alle Agarosegele zeigen die erwarteten Fragmente im Falle der Retina-Proben (MR). Für die Photorezeptor-Proben (PR) konnte in sechs von 19 getesteten Proben aus *129/Sv*- und in sieben von 16 Proben aus *C57BL/6*-Mäusen das Amplikon der erwarteten Größe amplifiziert werden. Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt. Beide *Primer* liegen in der zytoplasmatischen Schleife und dem C-terminalen Ende des Proteins (**G**). NK = Negativkontrolle.

Die Cx45-Verteilung auf Retinaschnitten wurde immunhistologisch an einer *129/Sv*-Maus analysiert. In Abbildung 3-23 wurden vertikale Retinaschnitte einer *129/Sv*-Maus mit einem polyklonalen Cx45-Antikörper und einem monoklonalen Cx36-Antikörper markiert. Abbildung 3-23 A zeigt Einzelaufnahmen der Cx36-Immunoreaktivität in magenta und Cx45-Markierungen in grün. Cx45 zeigte die typische Markierung der inneren und äußeren plexiformen Schicht, wie sie bereits mit immunhistochemischen Analysen und in einer transgenen Cx45-EGFP-Maus beschrieben wurde (Hilgen *et al.*, 2011). Cx36-Signale waren vorwiegend in distalen Bereichen und Cx45-Markierungen stärker in proximalen Bereichen der äußeren plexiformen Schicht lokalisiert. Der umrahmte Bereich der inneren plexiformen Schicht ist in Abbildung 3-23 B links als einzeln gescannte Aufnahme dargestellt. Hier liegen zwischen Amakrin- und Bipolarzellen aus Cx36 und Cx45 aufgebaute *Gap Junctions* vor (Dedek *et al.*, 2006). Die Abbildung bestätigte, dass unter den verwendeten Versuchsbedingungen aus Cx45 und Cx36 bestehende *Gap Junctions* durch gelbe Kolokalisation zu erkennen waren. Der umrahmte Bereich der äußeren plexiformen Schicht ist in Abbildung 3-23 B rechts als Einzelscan dargestellt. Cx36-Signale und Cx45-Markierungen liegen hier nicht kolokalisiert vor.



Abbildung 3-23. Doppelimmunmarkierung mit Cx45-Antikörpern und Cx36-Antikörpern auf der Retina einer 129/Sv-Maus. Konfokale Projektionen einzelner Aufnahmen zeigten mit den Antikörpern Cx36 in magenta und Cx45 in grün (A) Markierungen beider Connexine in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und der inneren plexiformen Schicht (IPL). In den Innensegmenten lagen ausschließlich Cx36-Signale vor. Der im Fusionsbild (A, rechts) umrahmte Bereiche der OPL zeigte in einer vergrößerten Einzelaufnahme keine Kolokalisation der beiden Proteine (C). Die vergrößerte Einzelaufnahme der IPL zeigte, dass unter den verwendeten Versuchsbedingungen aus Cx45 und Cx36 bestehende *Gap Junctions* durch weiße Kolokalisation zu erkennen waren (B, Pfeilköpfe). GCL = Ganglienzellschicht; INL = innere Kernschicht; ONL = äußere Kernschicht; IS = Innensegmente.

Die Expression von Cx46 mit der Genbank-*Accession*-Nummer NM 016975.2 wurde mit einer *Primer*-Kombination (Abbildung 3-24 B) auf sechs Photorezeptoren einer *129/Sv*-Maus überprüft (Abbildung 3-24 A). Das DNA-Fragment der erwarteten Größe wurde unter dem Einsatz von Maus-Retina-cDNA, nicht jedoch unter Verwendung von Photorezeptor-cDNA amplifiziert.

A	A ☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆							
В	Amplikon							
1	mgdwsflgrl	lenaqehstv	igkvwltvlf	ifrilvlgaa	aeevwgdeqs	dftcntqqpg		
61	cenvcydraf	pishirfwal	qiifvstptl	iylghvlhiv	rmeekkkere	eellrrdnpq		
121	hgrgrepmrt	gsprdpplrd	drgkvriaga	llrtyvfnii	fktlfevgfi	agqyflygfq		
181	lqplyrcdrw	pcpntvdcfi	srptektifv	ifmlavacas	lvlnmleiyh	lgwkklkqgv		
241	tnhfnpdase	arhkpldplp	aatssgppsv	sigfppyyth	pacptvqgka	igfpgaplsp		
301	adftvvtlnd	aqgrnhpvkh	cnghhltteq	nwtrqvaeqq	tpaskpssaa	sspdgrkgli		
361	dssgsslqes	alvvtpeege	qalattvemy	spplvlldpg	rsskssngra	rpgdlai		

**Abbildung 3-24.** *Nested-RT-PCR* mit Cx46-*Primern*. Das Agarosegel (A) zeigte ein Fragment der erwarteten Größe im Falle der Retina-Probe (MR), aber kein Signal unter Einsatz der sechs Photorezeptor-Proben (PR). Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt. Die *Primer* lagen in der zytoplasmatischen Schleife und dem C-terminalen Ende des Proteins (B). NK = Negativkontrolle.

### 3.3.8 Cx47, Cx50 und Cx57

Die mRNA von Cx47 mit der Genbank-*Accession*-Nummer NM 175452.4 konnte auf Retina-Proben, jedoch nicht in Photorezeptoren mittels *RT-PCR* detektiert werden. Für die *Nested-PCR* konnten in diesem Fall die *Primer* der ersten *PCR* (Abbildung 3-25 E) erneut verwendet werden. Von insgesamt neun getesteten PhotorezeptorcDNAs, zwei Proben aus *C57BL/6*- und sechs Proben aus *129/Sv*-Mäusen, wurde in keiner Probe das erwartete Fragment amplifiziert (Abbildung 3-25 A–D).



**Abbildung 3-25.** *Nested-RT-PCR* mit Cx47-*Primern.* Die *RT-PCR* wurde auf drei Proben einer *C57BL/6*-Maus (**A–C**) und sechs Proben einer *129/Sv*-Maus (**D**) durchgeführt. Alle Agarosegele zeigen die erwarteten Fragmente ausschließlich im Falle der Retina-Proben (MR). Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt. Die Bindestellen der *Primer* entsprachen der zytoplasmatischen Schleife und dem C-terminalen Ende des Proteins. (**E**). NK = Negativkontrolle.

Um die Expression von Cx50 mit der *Accession*-Nummer NM 008123.2 in Photorezeptoren zu überprüfen, wurden zwei verschiedene *Primer*-Kombinationen verwendet (Abbildung 3-26 E). Mit der *Primer*-Kombination "Cx50" wurde das erwartete DNA-Fragment von 503 bp in Retina-Proben von *C57BL/6*-Mäusen (Abbildung 3-26 A), mit der Kombination "Cx50Okt09" ein Fragment von 308 bp in Retina-Proben von *129/Sv*-Mäusen amplifiziert (Abbildung 3-26 B–D). Unter dem Einsatz von Photorezeptor-cDNA aus *129/Sv*-Mäusen zeigte sich in fünf von 18 Proben ein positives Signal. Die Sequenzierung der in Photorezeptoren amplifizierten Sequenz ergab 98%ige Übereinstimmung mit der Cx50-Gensequenz NM 008123.2 (vgl. Anhang, Abbildung 8-6).



**Abbildung 3-26.** *Nested-RT-PCR* mit Cx50-*Primern*. Die *RT-PCR* mit den *Primern* "Cx50" auf *Templates* aus *C57BL/6*-Mäusen zeigte nur in der Retina-Probe (MR) ein positives Signal (A). Unter Einsatz der *Primer* "Cx50Okt09" auf cDNA aus *129/Sv*-Mäusen wurde in fünf von zehn Photorezeptor-Proben (PR) das Fragment der korrekten Größe amplifiziert. (**B–D**). Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt. Die *Primer* "Cx50" entsprechen einer Sequenz im C-terminalen Ende, die *Primer* "Cx50Okt09" einer Sequenz in der zytoplasmatischen Schleife und der vierten Transmembrandomäne des Proteins (**E**). NK = Negativkontrolle.

Um die Expression von Cx50-Proteinen in Photorezeptoren zu untersuchen, wurden vertikale Retinaschnitte einer *129/Sv*-Maus und einer *C57BL/6*-Maus mit Antikörpern gegen Cx50 markiert. Die Markierung der Linse zur Kontrolle des monoklonalen Cx50-Antikörpers zeigte eine deutliche Markierung, die in den Randbereichen besonders stark war (Abbildung 3-27 A). Das Immunoreaktivitätsmuster entsprach der typischen Cx50-Verteilung in der Linse (White *et al.*, 1998). Im vertikalen Retinaschnitt einer *129/Sv*-Maus sind Markierungen in der äußeren plexiformen

**Ergebnisse** 

Schicht und eine Verteilung in der inneren plexiformen Schicht zu erkennen (Abbildung 3-27 B). Ein ähnliches Verteilungsmuster auf der gesamten Retina zeigte sich unter Einsatz von Retinen aus C57BL/6-Mäusen (hier nicht gezeigt). Um die Identität der Cx50-Signale in der äußeren plexiformen Schicht näher zu charakterisieren, wurden Doppelimmunmarkierungen mit Cx50 und den Markern Cone Arrestin und Velis-3 durchgeführt. In Abbildung 3-27 C ist die äußere plexiforme Schicht des Retinaschnittes einer 129/Sv-Maus und in Abbildung 3-27 D der gleiche Bereich einer C57BL/6-Maus zu sehen. Beide vertikalen Schnitte wurden mit einem Antikörper gegen Cx50 in grün und gegen Cone Arrestin in rot gefärbt und zeigen ein ähnliches Immunoreaktivitätsmuster: Cx50-Signale liegen unmittelbar unter den durch Cone Arrestin markierten Pedikeln der Zapfen, in Bereichen der Horizontalzellen-Somata der distalen inneren Kernschicht. Eine Expression von Cx50 wurde in axonlosen A-Typ-Horizontalzellen des Kaninchens (O'Brien et al., 2006), nicht jedoch in der Maus beschrieben. Der Versuch wurde mit Retinen aus 129/Sv-Mäusen (Abbildung 3-27 E) und Mäusen der C57BL/6-Linie (Abbildung 3-27 F) mit dem Cx50- und einem Velis-3-Antikörper wiederholt. In diesem Fall wurden die Cx50-Signale mit etwas Abstand zum Marker-Antikörper erwartet, da Velis-3 die Stäbchen-Terminalien markiert und damit distal der Zapfen-Terminalien liegt. Die Cx50-Markierungen besaßen meist etwas Abstand zu den durch Velis-3 gefärbten Stäbchen-Terminalien; in einigen Fällen lagen sie jedoch auch direkt proximal der Marker-Signale. Auch hier zeigte sich in beiden Mauslinien ein annähernd gleiches Verteilungsmuster der Cx50-Signale. Die hier dargestellten Daten deuten auf eine Cx50-Expression in Horizontalzellen, jedoch nicht in Photorezeptoren hin.



Abbildung 3-27. Cx50-Verteilung in der Maus-Retina. Die immunologische Markierung von Linsengewebe mit dem monoklonalen Cx50-Antikörper zeigte das erwartete Reaktivitätsmuster (A). Auf vertikalen Maus-Retinaschnitten in (B) zeigten sich Signale im Bereich der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und in der inneren plexiformen Schicht (IPL). Eine Doppelimmunmarkierung zeigt Cx50-Markierungen unmittelbar unterhalb der durch *Cone Arrestin* gefärbten Zapfen-Terminalien in der OPL einer *129/Sv*-Maus (C) und einer *C57BL/6*-Maus (D). In Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen *Velis-3* lagen die Cx50-Markierungen im Falle beider Mauslinien direkt unterhalb oder mit etwas Abstand zu den Stäbchen-Terminalien (E, F). Alle Abbildungen sind Projektionen konfokaler Mikrofotografien über eine Schichtdicke von zwei Mikrometern. GCL = Ganglienzellschicht; INL = innere Kernschicht; ONL = äußere Kernschicht; IS = Innensegmente.

Die Expression von Cx57 wurde mit einer *Nested-RT-PCR* auf acht Photorezeptoren einer *129/Sv*-Maus überprüft. Das Cx57-Gen mit der Genbank-*Accession*-Nummer NM 010289.2. besteht aus nur einem Exon, das den kompletten codierenden Bereich einschließt. Aus der Maus-Retina wurde eine davon abweichende Cx57-Sequenz isoliert (Hombach *et al.*, 2004). Diese Cx57-Sequenz unterscheidet sich von der Genbank-Sequenz ab der 481. Aminosäure und besitzt damit ein alternatives C-terminales Ende. Die Aminosäuresequenz der aus der Retina isolierten Cx57-Sequenz ist in Abbildung 3-28 B dargestellt. Die von der Genbank-Sequenz NM 010289.2 abweichenden Aminosäuren sind gelb unterlegt; die amplifizierten Bereiche sind rot dargstellt. Um die Expression von Cx57 in Photorezeptoren mittels *RT-PCR* zu überprüfen, wurde mit *Primern* gearbeitet, die an beide Cx57-Sequenzen binden. Diese liegen in der vierten Transmembrandomäne und am Anfang des C-terminalen Bereiches des Proteins. In zwei

von insgesamt acht getesteten Photorezeptor-Proben und in der Retina-Probe einer *129/Sv*-Maus wurde ein *PCR*-Produkt der erwarteten Größe amplifiziert (Abbildung 3-28 A). Das positive *PCR*-Produkt einer Photorezeptor-Probe wurde einkloniert und sequenziert. Ein Vergleich mit allen Datenbank-Sequenzen des Maus-Genoms ergab Cx57 als die Sequenz mit der stärksten Übereinstimmung. Dabei handelte es sich um eine 98%ige Übereinstimmung sowohl mit der Genbank-Sequenz der *Accession*-Nummer NM 010289.2. als auch mit der aus Retina-Gewebe isolierten Cx57-Sequenz (vgl. Anhang, Abbildung 8-7).



**Abbildung 3-28.** *Nested-RT-PCR* mit Cx57-*Primern*. Die *PCR* erfolgte mit Cx57-*Primern* auf acht Photorezeptor-Proben (PR) und einer Retina-Probe (MR) einer *129/Sv*-Maus (**A**). Die erwarteten Fragmente wurden im Falle der Retina-Proben und zweier Photorezeptor-Proben amplifiziert. Die Aminosäuresequenz zeigt die in der Retina identifizierte Cx57-Sequenz, die sich von der Genbank-Sequenz NM 010289.2. am C-terminalen Ende unterscheidet (gelb unterlegt). Die *PCR*-Produkte sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt (**B**). NK = Negativkontrolle.

Um die Proteinexpression von Cx57 in Photorezeptoren zu untersuchen, wurden vertikale Retinaschnitte einer *129/Sv*-Maus immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen Cx53.8 angefärbt. Das Peptid, gegen das dieser Antikörper gerichtet ist, bindet an die letzten Aminosäuren von Cx53.8 im Fisch. Dazu homolog sind die 15 Aminosäuren am C-terminalen Ende des retinalen Cx57-Proteins, das sich von der Cx57-Sequenz der GenBank mit der *Accession*-Nummer NM 010289.2 unterscheidet (Abbildung 3-28 B, gelb unterlegt). In zahlreichen Versuchen konnte gezeigt werden, dass dieser Antikörper Cx57 in der Maus-Retina detektiert (Janssen-Bienhold *et al.*, 2009). In der immunhistochemischen Untersuchung mit diesem Antikörper zeigten die äußere Kernschicht und die Innensegmente der Photorezeptoren keine Signale, die Rückschlüsse auf eine Cx57-Expression in Photorezeptoren zuließen (Abbildung 3-29 A, B). Der umrahmte Bereich der äußeren plexiformen Schicht ist in Abbildung 3-29 C und D vergrößert dargestellt. Hier zeigten sich deutliche Cx57-Signale im Bereich der durch *PSD95* markierten Stäbchen- und

Zapfen-Terminalien sowie eine feine Verteilung von Cx57-Signalen, die proximal der PSD95-Markierung lagen. Dieser Versuch zeigte, dass Cx57-Proteine im Gegensatz zu Cx36-Proteinen nicht in den Photorezeptor-Kernen und den Innensegmenten lokalisiert sind. Die Markierungen zeigten das typische Muster von Cx57 vermittelten Horizontalzellen Verschaltungen zwischen in den Photorezeptor-Synapsen (Janssen-Bienhold et al., 2009). Ob Cx57 zusätzlich an der Ausbildung von Gap Junctions zwischen Stäbchen und Zapfen beteiligt sollte ist, eine Doppelimmunmarkierung von Cx57 mit Cx36 zeigen.



Abbildung 3-29. Cx57-Verteilung in Vertikalschnitten der Retina einer 129/Sv-Maus. Die Markierung erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper gegen Cx57 in magenta und einem *PSD95*-Antikörper in grün. Es zeigte sich keine Cx57-Immunoreaktivität in der äußeren Kernschicht und in den Innensegmenten der Photorezeptoren (A, B). Eine Aufnahme der äußeren plexiformen Schicht (OPL) zeigte Cx57-Markierungen im Bereich der mit *PSD95* markierten Terminalien der Photorezeptoren (C, D). A–D: einzelne Aufnahmen. GCL = Ganglienzellschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; INL = innere Kernschicht; ONL = äußere Kernschicht; IS = Innensegmente.

Sollte es sich bei den Cx57-Markierungen der äußeren plexiformen Schicht in Abbildung 3-29 um *Gap Junctions* zwischen Stäbchen und Zapfen handeln, müssten Cx36 und Cx57 kolokalisiert vorliegen. Um dies zu überprüfen, wurde die vertikale Retina einer *129/Sv*-Maus mit einem monoklonalen Cx36-Antikörper und dem polyklonalen Cx53.8-Antikörper markiert. Abbildung 3-30 A zeigt Einzelaufnahmen der Cx36-Immunoreaktivität in grün, Abbildung 3-30 B Cx57-Markierungen in magenta. Beide Connexin-Antikörper markierten die äußere plexiforme Schicht der Retina. Der Cx36-Antikörper erzeugt zusätzlich schwache Signale in der äußeren Kernschicht und den Innensegmenten der Photorezeptoren und starke Signale in der

inneren plexiformen Schicht. Die Überlagerung beider Connexin-Signale in Abbildung 3-30 C zeigt keine Kolokalisation der beiden *Gap-Junction-*Proteine. Der umrahmte Bereich der äußeren plexiformen Schicht ist in Abbildung 3-30 D als einzeln gescannte Aufnahme dargestellt. Es kommt zu keiner Überlagerung von Cx36- und Cx57- Signalen.



Abbildung 3-30. Cx57- und Cx36-Verteilung in Vertikalschnitten der Retina einer 129/Sv-Maus. Die immunhistochemische Markierung mit einem Antikörper gegen Cx36 in grün (A) und gegen Cx57 in magenta (B) zeigt das typische Immunoreaktivitätsmuster in der äußeren Kernschicht (OPL) der Connexine. Cx36 ist außerdem in der inneren plexiformen Schicht (IPL), der äußeren Kenschicht (ONL) und den Innensegmenten der Photorezeptoren lokalisiert. Die Überlagerung beider Connexine zeigt keine deutliche Kolokalisation beider Proteine (C). Der umrahmte Bereich der OPL ist in (D) vergrößert als Einzelscan dargestellt und zeigt keine Kolokalisationen. A–D: Einzelaufnahmen. GCL = Ganglienzellschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; INL = innere Kernschicht; ONL = äußere Kernschicht; IS = Innensegmente.

#### 3.3.9 Analyse mit degenerierten Connexin-Primern

Ziel der *RT-PCR* mit degenerierten *Primern* war die Identifikation von unbekannten Connexinsequenzen in Photorezeptoren von *129/Sv-* und *C57BL/6-Mäusen*. Die *Primer* hybridisierten mit konservierten Sequenzen der Maus-Connexine. Ein degenerierter *Primer* besteht aus einem Gemisch von Oligonukleotiden, die an den Stellen, an denen sich die Connexine unterscheiden, verschiedene Basen besitzen. Dadurch binden degenerierte *Primer* an konservierte Abschnitte aller Connexine, auch wenn diese Unterschiede an einzelnen Basenpositionen aufweisen. Sofern unbekannte Connexinsequenzen in der verwendeten cDNA vorkommen, würden sie ähnlich konservierte Bereiche aufweisen; daher können mit dieser Methode auch unbekannte Connexinsequenzen amplifiziert werden. Es wurden zwei *Primer*-Kombinationen  $\alpha$  ("Cx degeneriert  $\alpha$ ") und  $\beta$  ("Cx degeneriert  $\beta$ ") mit je zwei *Forward*und zwei *Reverse-Primern* verwendet. Durch die Benutzung von jeweils drei *Primern* in einer *Nested-PCR* war eine Amplifikation auch bei einer geringen Menge an cDNA möglich. In Abbildung 3-31 ist je ein *Forward-Primer* der beiden verwendeten *Primer*-Kombinationen dargestellt.

CX4/	CGGGTTGTGACAACGTCTGCTACGACGCCTTTGCGCCCCTGTCTCATGTGCGCCTTCTGGG	232
Cx36	CCGGCTGTAACCAGGCCTGCTATGACCGCGCCTTTCCCATCTCCCATATACGTTACTGGG	238
Cx45	CGGGCTGTGAGAATGTCTGCTATGATGCCTTTGCCCCGCTCTCCCACGTGCGCTTCTGGG	232
Cx30.3	CAGGCTGCCCCAACGTCTGCTATGATGAGTTCTTCCCCGTGTCCCACGTGCGCCTCTGGG	232
Cx31.1	CGGGCTGTACCAATGTCTGCTACGATGAGTTCTTCCCCGTGTCTCACGTGCGCCTCTGGG	232
Cx31	CCGGCTGTACCAACGTGTGCTATGACAACTTCTTCCCCATCTCCAACATCCGACTCTGGG	232
Cx32	CGGGCTGCAACAGCGTCTGCTATGACCATTTTTTCCCCATCTCCCACGTGCGCCTATGGT	232
Cx26	CTGGCTGCAAGAATGTATGCTACGACCACCACCTTCCCCATCTCTCACATCCGGCTCTGGG	232
Cx30	CAGGGTGCAAGAACGTCTGCTATGACCATTTCTTCCCGGTGTCTCACATCCGGCTCTGGG	233
Cx50	CAGGCTGTGAGAATGTCTGCTACGATGAGGCCTTTCCCATCTCACACATCCGCCTCTGGG	235
Cx43	CCGGTTGTGAAAATGTCTGCTATGACAAGTCCTTCCCCATCTCTCACGTGCGCTTCTGGG	235
Cx33	CTGGT <b>TGTGAAAATGTCTGCTATGA</b> CCATGCCTTCCCAATCTCTCACGTGCGCCTCTGGG	235
Cx37	CGGGCTGCACCAACGTCTGCTATGACCAGGCCTTCCCCATCTCCCACATCCGATACTGGG	235
Cx46	CAGGCTGTGAGAACGTCTGCTACGACCGCGCGCTTTCCCCATTTCGCACATCCGCTTCTGGG	235
Cx57	CCGGTTGCAACAATATCTGTTACGATGATGCTTTCCCCATCTCTTTGATCAGATTCTGGG	235
Cx40	CTGGT <mark>TGCCAAAATGTCTGCTATGA</mark> CCAAGCCTTCCCCATCTCCCACATTCGTTATTGGG	235
Cx30.2	CCGGCTGTCGCCAGACCTGCTACGATCGCGCCTTCCCGGTGTCCCACTACCGCTTCTGGC	235
Cx39	CAGGATGTGCCAACGTTTGCTACGACCTCTTTTCCCCAGTGTCACCGCTGCGATTCTGGC	235
Cx29	CAGGCTGCAAGACCATTTGCTATGATGTCTTCCGCCCTCTCTCT	232
Cx23	GAGAGATAAACCTGTTCTGTTACAATCAGTTCCGGCCAATAACTCCCCAAGTGTTCTGGG	232
	TGYRAVAAYGTCTGYTAYGA $\leftarrow$ Primer "Cx degeneriert a"	
Cx47	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC	292
Cx47 Cx36	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC	292 298
Cx47 Cx36 Cx45	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTCTGTGATGTACCTGGGATATGCTATTCATA	292 298 292
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTCTGTGATGTACCTGGGATATGCTATTCATA CCCTGCAGCTCATCCTGGTCACCTGTCCTTCCTGTTAGTGGTCATGCATG	292 298 292 292
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTCTGTGATGTACCTGGGATATGCTATTCATA CCCTGCAGCTCATCCTGGTCACCTGCCTTCCCTGTTAGTGGTCATGCATG	292 298 292 292 292
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTCTGTGATGTACCTGGGATATGCTATTCATA CCCTGCAGCTCATCCTGGTCACCTGTCCTTCCTGTTAGTGGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTCTGTGATGTACCTGGGATATGCTATTCATA CCCTGCAGCTCATCCTGGTCACCTGTCCTTGCTTAGTGGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292 292
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx26	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGGACCC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTCTGTGATGTACTGGGATATGCTATTCATA CCCTGCAGCTCATCCTGGTCACCTGTCCTTGCTTAGTGGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292 292 292
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx22 Cx26 Cx30	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTCTGTGATGTAGTGGTCATGCGGCCTATTC CCCTGCAGCTCATCCTGGTCACCTGCCCTCTTGCTTGGTGGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292 292 292 292
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx26 Cx20 Cx50	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTCTTGTGATGTAGTGGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292 292 292 293 293
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx26 Cx30 Cx50 Cx43	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTCTTGTGATGTAGTCGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292 292 292 293 295 295
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx26 Cx30 Cx50 Cx50 Cx43 Cx33	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCTGGTTGCAACTCCCTCTGTGATGTACCTGGGATATGCTATTCATA CCCTGCAGCTCATCCTGGTCACCTGCCTTCCCTGTTAGTGGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292 292 292 293 295 295 295
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx26 Cx30 Cx50 Cx50 Cx43 Cx33 Cx37	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTCTGTGATGTACCTGGGATATGCTATTCATA CCCTGCAGCTCATCCTGGTCACCTGCCTTCCCTGTTAGTGGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292 292 292 293 295 295 295 295
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx26 Cx30 Cx50 Cx43 Cx43 Cx33 Cx37 Cx46	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTTATCACCTATTCTGTGGACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTTGTGTAGTGGGCTATGCGATGTGGCCTATC CCCTGCAGCTCATCCTGGTCACCTGTCCTTCCTGTGTGGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292 292 293 295 295 295 295 295 295
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx26 Cx30 Cx50 Cx43 Cx33 Cx37 Cx46 Cx57	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTCTGTGATGTACTGGGATATGCTATTCATA CCCTGCAGCTCATCCTGGTCACCTGTCCTTCCCTGTGGTGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292 292 292 293 295 295 295 295 295 295
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx26 Cx30 Cx50 Cx43 Cx33 Cx37 Cx46 Cx57 Cx40	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTTACACCTATTCTGTGCACCC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTCTGTGATGTACTGGGATATGCTATTCATA CCCTGCAGCTCATCCTGGTCACCTGTCCTTCCCTGTGATGTGGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292 292 292 295 295 295
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx26 Cx30 Cx50 Cx43 Cx33 Cx37 Cx46 Cx57 Cx40 Cx50.2	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTTGTGATGTACTGGGATATGCTATTCATA CCCTGCAGCTCATCCTGGTCACCTGTCCTTCCCTGTGGTGGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292 292 292 295 295 295
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx26 Cx30 Cx50 Cx43 Cx33 Cx37 Cx46 Cx57 Cx46 Cx57 Cx40 Cx30.2 Cx39	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCACCTCCTCTGTGATGTAGTGGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292 292 292 295 295 295
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx26 Cx30 Cx50 Cx43 Cx33 Cx37 Cx46 Cx57 Cx40 Cx30.2 Cx39 Cx29	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCACCTGTCCTTGTGATGTAGTGGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292 292 292 293 295 295 295 295 295 295 295 295 295 295
Cx47 Cx36 Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx26 Cx30 Cx50 Cx43 Cx33 Cx37 Cx46 Cx57 Cx46 Cx57 Cx40 Cx30.2 Cx39 Cx29 Cx23	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC TATTCCAGATCATCCTGGTTGCACCTGTCCTTCTGTGATGTAGTCGTCATGCATG	292 298 292 292 292 292 292 292 295 295 295 295

**Abbildung 3-31. Degenerierte** *Primer* in einem Alignment aller Maus-Connexine. Es ist je ein *Primer* der *Primer*-Kombination  $\alpha$  (in rot) und  $\beta$  (in grün) mit seinen Bindestellen dargestellt. Die *Primer* binden alle im Alignment farbig dargestellten Basen. Die hier dargestellten *Primer* "Cx degeneriert  $\alpha$ " (rot) und "Cx degeneriert  $\beta$ " (grün) bestehen aus einem Gemisch von Oligonukleotiden die an den Stellen, an denen sich die Connexine unterscheiden, verschiedene Basen besitzen (R = A+G; Y = C+T; M = A+C; K = G+T; S = C+G; W = A+T; H = A+C+T; B = C+G+T; V = A+C+G; D = A+G+T; N = A+G+T+C).

Abbildung 3-31 zeigt das Ergebnis der *RT-PCR* mit den *Primer*-Kombinationen  $\alpha$  und  $\beta$  auf Photorezeptor-Proben acht Wochen alter *C57BL/6*- und *129/Sv*-Mäuse. Eine Maus-Retina-Probe diente als Kontrolle für den korrekten Ablauf der *PCR*-Reaktion

Ergebnisse

mit den degenerierten Primern. Durch die Verwendung von Wasser anstelle eines Templates in einer Negativkontrolle wurde eine Kontamination mit Fremd-DNA ausgeschlossen. Bei Verwendung der degenerierten α-Primer wurden in zwei von drei Photorezeptor-Proben und bei der Retina-Kontrolle Fragmente von 450 bp amplifiziert (Abbildung 3-32 A). Das gleiche Verfahren unter Einsatz der degenerierten  $\beta$ -Primer resultierte in einer Bande von etwa 300 bp in einer Photorezeptor- und der Maus-Retina-Probe (Abbildung 3-32 B). Die RT-PCR mit den beiden degenerierten Primer-Kombinationen wurde zusätzlich mit Photorezeptorund Retina-Proben einer acht Wochen alten 129/Sv-Mäus durchgeführt. Es zeigte sich das gleiche Bandenmuster wie bei den C57BL/6-Mäusen, wobei jeweils drei von vier Photorezeptoren positiv waren (Abbildung 3-32 C). Die Amplikons der RT-PCRs mit C57BL/6-Mäusen wurden einkloniert und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung von vier Klonen der *PCR* mit degenerierten  $\alpha$ -*Primern* ergab eine 100% ige Übereinstimmung mit dem Cx57-Gen der Maus. Eine Sequenzierung von Klonen der PCR mit degenerierten β-Primern ergab eine 100%ige drei Übereinstimmung mit dem Cx31-Gen des Menschen. Hierbei handelte es sich also um eine Kontamination. Allerdings zeigt die Amplifikation der menschlichen Cx31-Variante auch, dass mit der angewandten Methode tatsächlich aus sehr geringen Mengen an DNA, in diesem Fall wahrscheinlich Hautschuppen, ein Connexin-Gen vervielfältigt werden kann, das sich in seiner Sequenz von den 20 Mausgenen unterscheidet. Das Cx31-Gen weist 84% Squenzhomologie zum Cx31-Gen der Maus auf.

Durch unterschiedliche Annealing-Temperaturen wurde die Stringenz der PCR verändert. Die Verwendung weiterer Primer in unterschiedlichen Kombinationen gewährleistete eine Affinität für verschiedene konservierte Connexinsequenzen. Trotz zahlreicher Versuche konnte keine weiteren Connexinsequenzen identifiziert werden.



**Abbildung 3-32.** *Nested-RT-PCR* mit degenerierten Connexin-*Primern. RT-PCR* auf drei Photorezeptor- (PR) und einer Maus-Retina-Probe (MR) einer *C57BL/6*-Maus mit zwei degenerierten *Primer*-Kombinationen  $\alpha$  (**A**) und  $\beta$  (**B**). Die *RT-PCR* auf vier Photorezeptor- und einer Maus-Retina-Probe einer *129/Sv*-Maus zeigt das gleiche Bandenmuster (**C**). Die Sequenz der Amplikons entspricht dem murinen Cx57-Gen ( $\alpha$ -*Primer*) und dem Cx31-Gen des Menschen ( $\beta$ -*Primer*). NK = Negativkontrolle.

### 3.3.10 RACE-PCR mit degenerierten Connexin-Primern

Der folgende Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Regina Herrling durchgeführt. Durch einen unspezifischen Anker-Primer am 3'-Ende der untranslatierten Region sollte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, weitere Connexine zu identifizieren. In Abbildung 3-33 ist das Agarosegel einer RACE-PCR mit den degenerierten Primern "Cx degeneriert  $\alpha$ " und  $\beta$  "Cx degeneriert  $\beta$ " bei geringen Annealing-Temperaturen dargestellt. Es wurde jeweils die cDNA von vier Photorezeptor-Proben und einer Retina-Probe aus 129/Sv-Mäusen verwendet. Eine Positivkontrolle mit β-Aktin-Primern bestätigte das Vorhandensein funktionsfähiger cDNA im Falle der Photorezeptor-Proben durch ein Amplikon der erwarteten Größe von 546 bp. Unter Verwendung der Retina-cDNA zeigte sich diese Bande nur sehr schwach, in dieser Probe ist demnach keine funktionsfähige cDNA in ausreichender Menge vorhanden. Unter Verwendung der Photorezeptor-Proben ließen sich mit den  $\alpha$ - und  $\beta$ degenerierten Primern bei einer Annealing-Temperatur von 49 °C keine verwertbaren DNA-Fragmente amplifizieren. Bei Annealing-Temperaturen von 51 °C und 53 °C zeigte sich ein Bandenmuster von jeweils drei bis sieben unscharfen Banden. Diese PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert.



Abbildung 3-33. *RACE-PCR* mit veränderten *Annealing*-Temperaturen. *RACE-PCR* auf vier Photorezeptor- (PR) und einer Maus-Retina-Probe (MR) einer 129/Sv-Maus mit den *Primer*-Kombinationen "Cx degeneriert  $\alpha$ ", "Cx degeneriert  $\beta$ " und  $\beta$ -Aktin. NK = Negativkontrolle.

Das *PCR*-Produkt wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und einkloniert. Die Plasmid-DNA der einzelnen Klone wurde sequenziert und die Sequenzen durch Datenbankabgleich einem Gen zugeordnet (Tabelle 3-2). Bei keinem dieser Gene handelt es sich um ein *Gap-Junction*-Protein. Eine ausführliche Beschreibung der amplifizierten Sequenzen mit Gennamen und Proteinfunktion befindet sich im Anhang, Abschnitt 8.2. Alle mit "unklassifiziertes Protein" bezeichneten Sequenzen wurden analysiert, um auszuschließen, dass es sich um ein unbekanntes *Gap-Junction*-Protein handelt. Bei allen Sequenzen, denen kein

Gen zugeordnet werden konnte, lagen die Stopp-Kondons so häufig vor, dass das offene Leseraster zu kurz war, um für ein Protein zu codieren. Dies galt für alle drei möglichen Leseraster.

**Tabelle 3-2. Gene der** *RACE-PCR***-Amplikons.** Die Amplikons der *RACE-PCR* wurden kloniert und sequenziert. Die Tabelle zeigt die amplifizierten Sequenzen mit den *Primern* "Cx degeneriert  $\alpha$ " und "Cx degeneriert  $\beta$ ". Bei den amplifizierten Sequenzen handelte es sich in keinem Fall um die Gensequenz eines *Gap-Junction*-Proteins.

Cx degeneriert α	Cx degeneriert β	
1. Rab3gap1	1. Menage a trois1	
2. Chmp4b	2. mmNfix	
3. MIc1	3. unclassified Protein	
4. Mm genomisch Cx31.1	4. unclassified Protein	
5. unclassified Protein	5. Menage a trois1	
6. unclassified Protein	6. Lima1	
7. Chmp4b	7. mmFYVE1	
8. Rab3gap1	8. Menage a trois1	
9. BAC clone from Chromosom9	9. genomisch unspezifisch	
10. BAC clone from Chromosom9	10. TBC1D20	
11. Na-K ATPase	11. genomisch unspezifisch	
12. Maged2	12. Shfm1	
13. GSG1	13. Tceal3	

#### 3.3.11 Panx1

Da kein Connexin als potentieller Kopplungspartner zu Cx36 in Stäbchen identifiziert werden konnte, wurden die Pannexine als putative Gap-Junction-bildende Proteine auf ihre Expression in Photorezeptoren untersucht. Panx3 kommt im Nervengewebe nicht zur Expression (Baranova et al., 2004), deshalb wurde ausschließlich die Expression von Panx1 und Panx2 in Photorezeptoren analysiert. Um die Expression von Panx1 in Photorezeptoren zu untersuchen, wurden Nested-RT-PCRs auf Photorezeptor-Proben acht Wochen alter 129/Sv-Mäuse durchgeführt. Hierzu wurden Exon5-spezifische Primer gegen die Panx1-Sequenz (Genbank-Accession-Nummer NM 019482) verwendet. Die Bindestellen der verwendeten Primer-Kombination "Panx1Exon5" lagen am C-terminalen Ende und in der 3' untranslatierten Region der mRNA (Abbildung 3-34). Auf den Agarosegelen war ein amplifiziertes Fragment der erwarteten Größe von 330 bp unter Verwendung aller drei Maus-Retina-Proben und in zwölf von insgesamt zwanzig Photorezeptor-Proben zu sehen (Abbildung 3-34 A–E). Die amplifizierten Produkte derselben Proben unter der Verwendung von Rhodopsin-Primern bestätigten das Vorliegen intakter Photorezeptor-Templates (Kontrollen für Proben in A und C in Abschnitt 3.1.1). Durch die Verwendung von Intron-überspannenden Rhodopsin-Primern konnten

falsch positive Ergebnisse durch Kontamination der cDNAs mit genomischer DNA nahezu ausgeschlossen werden. DNA-Fragmente einschließlich eines Introns mit einer Länge von 454 bp wurden ausschließlich unter Einsatz von genomischer DNA vervielfältigt. Der Sequenzvergleich der in Photorezeptoren amplifizierten Sequenz zeigte nahezu 100%ige Übereinstimmung mit der Genbank-Sequenz.



**Abbildung 3-34.** *Nested RT-PCR* mit Exon5-spezifischen Panx1-*Primern.* Die Amplifikation erfolgte mit der *Primer*-Kombination "Panx1Exon5" auf Proben einer acht Wochen alten *129/Sv*-Maus. In zwölf von 20 Photorezeptor-Proben (PR), allen Retina-Proben (MR), und der genomischen DNA (gen) zeigte sich eine Bande der erwarteten Fragmentgröße (A–C). Die *Nested-RT-PCR* mit Intron-überspannenden Rhodopsin-*Primern* zeigte, dass die cDNA-Proben in A frei von genomischer DNA waren. DNA-Fragmente einschließlich der Introns mit 454 bp Länge wurden nur unter Einsatz von genomischer DNA vervielfältigt (A links). NK = Negativkontrolle.

Um die Panx1-Expression auf Protein-Ebene zu untersuchen, wurden vertikale Retinaschnitte einer C57BL/6-Maus und einer Panx1-KO-Maus mit Panx1spezifischen Antikörpern markiert (Abbildung 3-35). Die Retinen wurden unter gleichen Versuchsbedingungen behandelt und unter gleichen Einstellungen am konfokalen Mikroskop aufgenommen. In den Retinaschnitten beider Mäuse zeigte sich in der inneren plexiformen Schicht ein starkes unspezifisches Immunoreaktivitätsmuster. Die in der äußeren plexiformen Schicht beobachtete Immunoreaktivität (Abbildung 3-35 A) trat in der Panx1-KO-Maus nicht auf (Abbildung 3-35 B) und beweist damit die Spezifität des Panx1-Antikörpers in der äußeren Retina. In den Photorezeptoren kam es weder in den Innensegmenten noch in der äußeren Kernschicht zu einer Panx1-spezifischen Markierung. Es zeigte sich jedoch Panx1-Immunoreaktivität in der äußeren plexiformen Schicht und in der inneren Kernschicht. Eine detaillierte Analyse der Panx1-Expression in der Retina wurde von Katharina Schmidt und Birthe Dorgau durchgeführt. Diese Daten zeigten, dass die Panx1-Immunoreaktivität in der äußeren plexiformen Schicht ausschließlich den Horizontalzellen und Bipolarzellen zuzuordnen war (Schmidt et al., in Ausarbeitung).



**Abbildung 3-35. Panx1-Immunoreaktivität auf der Maus-Retina.** Vertikale Retinaschnitte einer *C57BL/6*-Maus (A) und einer Panx1-KO-Maus (B) wurden mit Panx1-spezifischen Antikörpern markiert. In beiden Retinen wurde die innere plexiforme Schicht (IPL) unspezifisch markiert. Spezifische Panx1-Signale in der inneren Kernschicht (INL) und der äußeren plexiformen Schicht (OPL) traten ausschließlich in der Retina der Wildtyp-Maus auf. Der Panx1-Antikörper zeigte keine Immunoreaktivität in der äußeren Kernschicht (ONL) und den Innensegmenten (IS) der Photorezeptoren. GCL = Ganglienzellschicht.

Die immunhistochemischen Ergebnisse, die Panx1-Expression keine in Photorezeptoren zeigten, standen im Widerspruch zu den RT-PCR-Analysen, die Panx1-Transkripte in diesen Zellen detektierten. Um zu analysieren, ob es bei der RT-PCR zu falsch positiven Ergebnissen gekommen ist, wurde die Nested-RT-PCR mit Intron-überspannenden Primern und neuen Photorezeptor-Proben wiederholt, in der Annahme, dass der oben dargestellten Panx1-Amplifikation genomische DNA zugrunde lag. Durch die Verwendung von Intron-überspannenden Primern sollte sichergestellt werden, dass die Amplifikation der Panx1-Sequenz auf cDNA und nicht auf genomischer DNA beruhte. Die Bindestellen der verwendeten Primer-Kombination "Panx1cds" lagen in der zweiten extrazellulären Schleife und am Cterminalen Ende des Proteins (Abbildung 3-36 B). Auf der Gensequenz hybridisierten die Forward-Primer in einem Bereich im vierten Exon, die Reverse-Primer im fünften Exon (vgl. Anhang, Abschnitt 8.4). Zwischen diesen beiden Exons lag ein Intron mit einer Größe von 1143 bp. Dadurch erhielt man bei einer Amplifikation, die auf mRNA-Expression beruhte, ein PCR-Produkt von 429 bp, bei Einsatz von genomischer DNA wurde ein Amplikon von 1572 bp vervielfältigt. Abbildung 3-36 C zeigt die Panx1-Aminosäureseguenz mit dem entsprechenden PCR-Produkt. Als Ergebnis der PCR auf Proben acht bis zehn Wochen alter C57BL/6-Mäuse zeigte sich ein Fragment der erwarteten Größe von 429 bp unter Verwendung aller sechs Maus-Retina-Proben und in elf von 24 Photorezeptor-Proben (Abbildung 3-36 A). Eine RT-PCR aller Proben mit Rhodopsin-Primern bestätigte die Amplifikation auf mRNA aus Photorezeptoren (hier nicht dargestellte Kontrollen befinden sich in

Abschnitt 3.1.1). Die Amplifikation von Panx1 mit Intron-überspannenden *Primern* zeigt eindeutig die Expression des Panx1-Gens in den Zellen der Proben. Es konnte allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass vereinzelte Proben Verunreinigungen mit anderen retinalen Zellen, zum Beispiel Müllerzellen, enthielten.



Abbildung 3-36. Nested-RT-PCR mit Intron-überspannenden Panx1-Primern auf Photorezeptoren aus C57BL/6 Mäusen. Die Agarosegele zeigen das PCR-Produkt mit der Primer-Kombination "Panx1cds" auf Proben aus C57BL/6 Mäusen. Die erwarteten Fragmente von 429 bp wurden in allen Retina-Proben (MR) und in elf von 24 Photorezeptor-Proben (PR) amplifiziert. Ausschließlich unter Einsatz genomischer DNA wurde ein 1572 bp langes Fragment synthetisiert (**A**). Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt (**B**). NK = Negativkontrolle.

Panx1-mRNA konnte durch Einzelzell-*RT-PCR* in Horizontal-, Müller- und Bipolarzellen nachgewiesen werden. Dies gab einen Hinweis darauf, warum die Panx1-mRNA, nicht jedoch das Protein in Photorezeptoren nachgewiesen werden konnte. Wahrscheinlich waren die Photorezeptor-Proben mit einem der drei Zelltypen kontaminiert, wie es auch schon für Cx57 in Bezug auf Horizontalzellen vermutet worden war. Für die *RT-PCR* mit Horizontal-, Müller- und Bipolarzellen wurden Proben mit jeweils zwei bis drei Zellen eines jeden Zelltyps mit einer *Patch*-Pipette aus dissoziierten Retinazellen isoliert. Die verwendeten *Primer* "Panx1Exon5" besaßen Bindestellen im fünften Exon des Panx1-Gens mit der Genbank-*Accession*-Nummer NM 019482 (vgl. Anhang, Abschnitt 8.4). Die *RT-PCR* auf Horizontalzell-

cDNA in Abbildung 3-37 A zeigten alle sechs getesteten Proben das erwartete Produkt von 330 bp. Durch eine RT-PCR derselben Proben mit den Intronüberspannenden β-Aktin-Primern "β-Aktinneu" konnten falsch positive Ergebnisse durch Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Es wurden ausschließlich Fragmente mit einer Länge von 546 bp vervielfältigt; bei Vorliegen von genomischer DNA wäre mit den β-Aktin-Primern ein 1000 bp großes PCR-Produkt amplifiziert worden. Die PCR mit Primern gegen Cx57 belegt das Vorliegen intakter Horizontalzell-cDNA; unter Einsatz aller Templates wurde eine Bande der erwarteten Fragmentgröße von 383 bp amplifiziert. Abbildung 3-37 B zeigt das Resultat einer RT-PCR auf Müllerzell-cDNA. In vier der fünf getesteten Müllerzell-Proben konnte ein Panx1-spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden. Durch die RT-PCR mit Intron-überspannenden β-Aktin-Primern konnten falsch positive Ergebnisse durch Amplifikation auf genomischer DNA ausgeschlossen werden. Eine RT-PCR mit Primern gegen Glutaminsynthetase bestätigt das Vorliegen von Müllerzell-cDNA. Abbildung 3-37 C zeigt eine Einzellzell-RT-PCR mit mRNA aus Bipolarzellen. Da die Annahme bestand, dass Panx1 in OFF-Bipolarzellen zur Expression kommt, wurde für die PCR auschließlich die mRNA kurzer OFF-Bipolarzellen in cDNA umgeschrieben. Von acht Bipolarzellen zeigten drei Proben eine Bande der erwarteten Fragmentgröße. Eine PCR mit β-Aktin belegte das Vorliegen funktionsfähiger c-DNA, die frei von Verunreinigungen mit genomischer DNA war. In diesem Fall lag zu wenig Material vor, um eine RT-PCR mit Primern gegen ein Bipolarzell-spezifisches Gen durchzuführen. Stattdessen dokumentieren die Abbildungen zweier gesammelter Bipolarzellen das Vorliegen von Bipolarzell-cDNA. Je zwei Panx1-Amplikons jeden Zelltyps wurden sequenziert. Ein Datenbankabgleich der sequenzierten PCR-Produkte bestätigte in allen Fällen das Vorliegen der Panx1-Sequenz. Die Expression von Panx1 in Horizontal-, Müller- und Bipolarzellen unterstützt die Vermutung der Kontamination der Photorezeptor-Proben mit einem dieser Zelltypen (Schmidt et al., in Ausarbeitung).



Abbildung 3-37. Einzelzell-RT-PCR mit mRNA aus Horizontal-, Müller- und Bipolarzellen. Alle getesteten Horizontalzell-Proben (HZ) zeigten das erwartete PCR-Produkt von 330 bp (A, links). Eine Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA wurde durch eine PCR mit Intronüberspannenden β-Aktin-Primern ausgeschlossen, wobei ausschließlich eine auf cDNA basierende Bande von 546 bp amplifiziert wurde (A, Mitte). Eine RT-PCR mit Cx57-Primern belegt das Vorliegen von Horizontalzell-DNA durch eine Bande von 383 bp (A, rechts). Von fünf Müllerzell-Proben (MZ) zeigten vier eine Bande von 330 bp (B, links); das Vorliegen von genomischer DNA wurde durch β-Aktin-Primer ausgeschlossen (B, Mitte) und das Vorliegen von Müllerzell-cDNA durch Glutaminsynthetase-Primer mit Banden von 460 bp bestätigt (B, rechts). Durch eine PCR mit β-Aktin auf acht OFF-Bipolarzell-Proben (BP) konnte eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen und das Vorliegen funktionsfähiger cDNA bestätigt werden (C, links). In drei der OFF-Bipolarzell-Proben konnte ein Panx1-spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden (C, rechts). Das Vorliegen von Panx1-Sequenzen wurde in allen drei Zelltypen durch Sequenzierung bestätigt. Es sind jeweils zwei Bilder jeden Zelltyps dargestellt, die während des Aufsammelns der Zellen aufgenommen wurden (A-C). MR = Maus-Retina; NK = Negativkontrolle.

# 3.4 Bildet Panx2 in Photorezeptoren mit Cx36 Gap-Junction-Kanäle?

Da Panx1-Proteine nicht in Photorezeptoren detektiert werden konnten, schied Panx1 als Kopplungspartner zu Cx36 in Photorezeptoren aus. Deshalb wurde untersucht, ob Panx2 als potentielles *Gap-Junction*-Protein möglicherweise den Kopplungspartner zu Cx36 in Stäbchen bilden könnte.

## 3.4.1 Detektion von Panx2-mRNA in Photorezeptoren

Panx2 wurde mittels *Nested-RT-PCR* auf Photorezeptor-Proben detektiert. Auf der Gensequenz überspannen die *Primer* ein 512 bp langes Intron zwischen Exon 2 und Exon 3. Dadurch erhält man in einer *PCR* unter Einsatz von genomischer DNA ein

Amplikon von 1016 bp, bei einer Amplifikation auf mRNA-Transkripten ein *PCR*-Produkt von 504 bp. In zwölf von 16 Photorezeptor-Proben wurde unter Einsatz der Panx2-*Primer* das erwartete Fragment amplifiziert (Abbildung 3-38). In Abbildung 3-38 C und D wurde unter Einsatz von genomischer DNA das Intron-enthaltende Fragment von 1016 bp vervielfältigt. Dies dokumentiert, dass das Fragment von 504 bp nur dann amplifiziert wird, wenn Panx2 in dem Gewebe tatsächlich zur Expression kommt. Die Negativkontrollen wurden mit Wasser, die Positivkontrollen mit Transkripten der Maus-Retina durchgeführt. Die Durchführung einer *PCR* aller Proben mit Rhodopsin-spezifischen *Primern* zeigt das Vorliegen intakter Photorezeptor-cDNA (nicht dargestellte Kontrollen befinden sich in Abschnitt 3.1.1).



**Abbildung 3-38.** *Nested RT-PCR* mit Intron-überspannenden Panx2-*Primern.* Die Agarosegele zeigen das *PCR*-Ergebnis mit der *Primer*-Kombination "Panx2intronspanning" mit 16 Photorezeptor-Proben aus *C57BL/6*-Mäusen. Die erwarteten Fragmente von 504 bp wurden in zwölf Photorezeptor-Proben (PR) amplifiziert. Ausschließlich unter Einsatz von genomischer DNA wurde ein 1016 bp langes Fragment synthetisiert (**C**, **D**). Die Sequenzierung der Amplikons PR 1 und PR 2 zeigte 100%ige Übereinstimmung mit der Panx2-Gensequenz (**A**). Um das Vorliegen von Photorezeptor-cDNA zu dokumentieren, wurden verschiedene Rhodopsin-*Primer* verwendet. Das erwartete Fragment unter Einsatz der *Primer* "RhoF2/R2" beträgt 537 bp (**A**), unter Einsatz der *Primer* "RhoF1/R1" 698 bp (**B**) und bei Verwendung der *Primer* "RhoNeuF/R" 333 bp (**D**). Die amplifizierten Bereiche mit den Panx2-*Primern* sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt. Der amplifizierte Bereich der *Nested-Primer* Kombination "Panx2intronspanning" liegt im C-terminalen Bereich des Proteins (E). Neg = Negativkontrolle.

#### 3.4.2 Detektion der retinalen Panx2-Sequenz

Zu Beginn der Panx2-Studien lagen zwei verschiedene Panx2-Seguenzen mit unterschiedlichen C-terminalen Bereichen in den Datenbanken vor: eine 607 Aminosäuren lange Form (im Folgenden "Isoform1Hirn"), die in Hirn und Retina der Maus gefunden wurde (Baranova et al., 2004), und eine Isoform mit 667 Aminosäuren (im Folgenden "Isoform2Linse"), die in der murinen Linse detektiert wurde (Dvoriantchikova et al., 2006). Die Seguenzierung von zwei PCR-Produkten aus Abschnitt 3.4.1 zeigte 100%ige Übereinstimmung mit beiden Isoformen. Um für die Panx2-Studien einen Antikörper synthetisieren zu können und um die retinale Panx2-Sequenz in Säugerzellen zur Expression zu bringen, wurde zunächst die in der Retina exprimierte Panx2-Sequenz identifiziert. Mit Hilfe der Primer "Panx2lens/brainF/R" sollte untersucht werden, welche der beiden Isoformen in der Retina zur Expression kommt oder ob beide Formen exprimiert werden. Ein Alignment der beiden Panx2-Isoformen im Anhang (Abbildung 8-33) macht deutlich, wie sich anhand der Länge des amplifizierten Fragmentes Rückschlüsse auf die exprimierte Sequenz ziehen ließen. Im Falle der Sequenz "Isoform1Hirn" betrug die erwartete Amplikongröße 536 bp, im Falle der Expression von "Isoform2Linse" betrug sie 617 bp. Um die Expression der Panx2-Isoformen in der Retina zu überprüfen, wurden RT-PCRs mit Proben aus retinalem Gewebe und zum Vergleich aus Linsen-Gewebe durchgeführt. Zunächst wurde der Erfolg der reversen Transkription in einer Kontroll-PCR durch ein PCR-Produkt für Glycerinaldehyd-3phosphat-Dehydrogenase bestätigt (Abbildung 3-39 A). Durch die RT-PCR mit den Primern "Panx2lens/brainF/R" wurde unter Verwendung der Retina- und der LinsenmRNA ein Fragment von 617 bp amplifiziert (Abbildung 3-39 B). Damit wurde die "Isoform2Linse" in der murinen Retina detektiert, während die Expression der "Isoform1Hirn" nicht in der Maus-Retina bestätigt werden konnte. Dieses Ergebnis wurde mit der mRNA aus vier weiteren Retinen reproduziert (R2-R5; Abbildung 3-39 C). In dieser PCR wurde zusätzlich die aus der Linse und aus der Retina isolierte genomische DNA als Template eingesetzt (genR, genL; Abbildung 3-39 C). Hierbei wurde mit den Intron-überspannenden Primern "Panx2lens/brainF/R" kein Fragment der erwarteten Größe amplifiziert. Dadurch konnte eine auf genomischer DNA basierende Amplifikation ausgeschlossen werden. In Abbildung 3-39 D wurde die RT-PCR mit zwei Retina-Proben wiederholt und das Amplikon sequenziert. Die Sequenzierung ergab eine 100% ige Übereinstimmung des PCR-Produktes mit der in der Linse entdeckten "Isoform2Linse" (Sequenzierung vgl. Anhang, Abschnitt 8.2).

Die Sequenz der in der Retina detektierten Isofom trägt mittlerweile die Genbank-*Accession*-Nummer NM 001002005. Diese Sequenz wurde der Antikörperherstellung und der Genexpression in Säugerzellen zugrunde gelegt.



Abbildung 3-39. *RT-PCR* zur Identifikation der retinal exprimierten Panx2-Isoform. In der Kontroll-*PCR* mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-*Primer* (GAPDH) wurde im Falle der Linsen- (L) und Retina-Probe (R1) das erwartete Produkt von 605 bp amplifiziert (A). In der *RT-PCR* mit den *Primern* "Panx2lens/brainF/R" wurde unter Verwendung der Retina- und der Linsen-mRNA ein Fragment von 617 bp amplifiziert (B). Eine Reproduktion des Versuchs zeigte in vier weiteren Retinen (R2–R5) das gleiche Ergebnis (C). Aus der Retina (genR) und aus der Linse (genL) isolierte genomische DNA zeigte unter den gleichen Bedingungen nicht das erwartete Fragment (C). Eine Wiederholung der *PCR* mit den Proben R4 und R5 (D) mit anschließender Sequenzierung ergab eine 100%ige Übereinstimmung des *PCR*-Produktes mit der in der Linse entdeckten "Isoform2Linse". Neg = Negativkontrolle.

### 3.4.3 Charakterisierung des Panx2-Antikörpers

Die mittels *RT-PCR* in der Maus-Retina identifizierte Panx2-Sequenz diente als Grundlage zur Herstellung eines Antikörpers. Aus dieser Sequenz wurden von der Firma Pineda durch eine Proteinepitop-Analyse geeignete Peptidsequenzen zur Antikörpergewinnung vorgeschlagen. Durch Sequenzanalysen wurde hieraus eine Sequenz ausgewählt, die keine Homologie zu Panx1, Panx3 oder anderen Proteinen aufweist. Die Firma Pineda stellte durch Immunisierung von Kaninchen einen polyklonalen Antikörper mit einem Molekulargewicht von 73,5 kDa gegen die gewählte Peptidsequenz her. Die Aufreinigung und Charakterisierung des Panx2-Antikörpers wurde in unserer Arbeitsgruppe von apl. Prof. Ulrike Janssen-Bienhold betreut. Die Antigensequenz umfasst zwanzig Aminosäuren (dsgpssappaasekkhtrhf) und liegt in der C-terminalen Domäne des Panx2-Proteins (vgl. Anhang, Abschnitt 8.4).

Mit Hilfe von Panx2-*Knock-out*-Mäusen hätte gezeigt werden können, dass der Antikörper in der Mausretina ausschließlich Panx2-Proteine detektiert. Eine Panx2defiziente Mauslinie wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Hannah Monyer zur Verfügung gestellt, zeigte jedoch in der Retina das Panx2-Immunoreaktivitätsmuster einer Wildtyp-Maus. Da *RT-PCR*-Analysen darauf hindeuteten, dass diese Maus-Linie in der Lage ist, Panx2-Proteine zu exprimieren, konnte sie für Untersuchungen zur Antikörper-Spezifität nicht verwendet werden. Die Spezifität des Antikörpers wurde deshalb mit Hilfe von Panx2-exprimierenden Zellen überprüft. Hierzu wurde Panx2-Sequenz die komplette codierende mit der Accession-Nummer NM 001002005 aus der Retina einer C57BL/6-Maus isoliert. Während des Versuchsablaufs durch UV-Bestrahlung auftretende Punktmutationen wurden durch zielgerichtete Mutagenese entfernt und das Expressionsplasmid anschließend durch Sequenzierungen überprüft. Zur Lokalisation des Proteins wurde der Panx2-Sequenz C-terminal ein grün fluoreszierendes Protein angehängt. Die Vektorkarte dieses Fusionsplasmides "mmPanx2:pEGFP-N1" ist in Abschnitt 8.1 abgebildet. Auf die Lokalisation des Panx2-Proteins in transfizierten Zellen wird im Rahmen der Expressionsstudien eingegangen (Abschnitt 3.4.5). Abbildung 3-40 A–C zeigt HeLa-Zellen, die mit dem Panx2-GFP-Fusionsprotein transfiziert und anschließend mit dem Panx2-Antikörper immunzytochemisch angefärbt wurden. Abbildung 3-40 A zeigt die Lokalisation des Panx2-Proteins durch das GFP-Protein in grün, Abbildung 3-40 B die Lokalisation des Panx2-Antikörpers in magenta. Die weiße Kolokalisation des Fusionsbildes in Abbildung 3-40 C belegt, dass der Panx2-Antikörper in transfizierten HeLa-Zellen an das Panx2-Protein bindet. In Abbildung 3-40 D-F wurde der gleiche Versuch mit Kontroll-Zellen durchgeführt, die ausschließlich mit dem "pEGFP-N1"-Vektor transfiziert wurden. Abbildung 3-40 E zeigt, dass nur eine leichte unspezifische Färbung im Bereich des Zellkerns zu sehen war. Die folgenden Western-Blot-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit apl. Prof. Ulrike Janssen-Bienhold durchgeführt. Abbildung 3-40 G zeigt einen Western-Blot mit subzellulären Fraktionen Panx2-GFP-transfizierter (PxG) und GFP-transfizierter (G) HeLa-Zellen. Der Panx2-Antikörper detektierte drei Banden mit einem Molekulargewicht von ~109 kDa, ~113 kDa und ~170 kDa im Totalhomogenat (TH) und in der Membranfraktion (M) der Panx2-GFP-exprimierenden Zellen. Die ~109 kDa und ~170 kDa umfassenden Proteine wurden neben ihrer Expression in Panx2-GFPtransfizierten Zellen zusätzlich in GFP-exprimierenden Kontroll-Zellen mit dem Panx2-Antikörper nachgewiesen und zeigten wahrscheinlich Immunoreaktivität von endogenen HeLa-Zell-Proteinen. Die Proteine mit einer Größe von ~113 kDa wurden Zellen ausschließlich in Panx2-GFP exprimierenden nachgewiesen und repräsentieren damit das transfizierte Panx2-Protein. Damit liegt die Größe des detektierten Panx2-Proteins abzüglich des GFP-Proteins mit ~27 kDa bei einer Größe von etwa ~86 kDa. Diese Größe liegt ~13 kDa über dem für das Panx2-Protein erwarteten Molekulaurgewicht von 73,5 kDa. Da diese Bande ausschließlich im Totalhomogenat und in der Membranfraktion und nicht in der zytosolischen Fraktion (Cyt) zu sehen war, wurde das exprimierte Panx2-Protein in die Plasmamembran oder in die Membran zytoplamatischer Kompartimente eingebaut. In Abbildung 3-40 H detektierte ein *GFP*-Antikörper das ~27 kDa umfassende *GFP*-Protein in den *GFP*-transfizierten Kontrollzellen und, wie der Panx2-Antikörper, ein ~113 kDa großes Protein in Panx2-*GFP*-exprimierenden Zellen. Der exklusive Nachweis des Panx2-*GFP*-Fusionsproteins in Panx2-*GFP*-exprimierenden Zellen durch den *GFP*- und den Panx2-Antikörper belegt, dass der Panx2-Antikörper das Panx2-Protein in transfizierten Zellen detektiert.

Um den Panx2-Antikörper auf unspezifische Reaktionen mit retinalen Proteinen zu überprüfen, wurden Western-Blot-Analysen mit subzellulären Fraktionen der Maus-Retina und immunhistochemische Untersuchungen retinaler Gewebeschnitte durchgeführt. In Abbildung 3-40 I wurde mit dem aufgereinigten Panx2-Antikörper Immunroreaktivität in allen Schichten der Retina gefunden. Besonders deutliche Markierungen zeigten die Innensegmente der Photorezeptoren, die proximale äußere Kernschicht und die äußere plexiforme Schicht. In Kontroll-Experimenten, in denen Retinaschnitte mit Antikörpern inkubiert wurden, die mit dem Immunisierungs-Peptid präadsorbiert worden waren, zeigten sich sehr wenige, diffuse Signale (Abbildung 3-40 J). Unter der Verwendung von Präimmunserum statt des Antikörpers zeigte sich nur eine leichte Markierung der inneren Retina und sehr schwache Immunoreaktivität der äußeren plexiformen Schicht (Abbildung 3-40 K). Subzelluläre Fraktionen retinaler Zellen zeigten im Western-Blot drei Panx2-immunoreaktive Proteine mit einer Größe von ~73 kDa, ~90 kDa und ~110 kDa (Abbildung 3-40 L). Eine deutliche Bande der für Panx2 erwarteten Größe von ~73 kDa wurde im Totalhomogenat und angereichert in der Membranfraktion, jedoch nicht in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurden die schwach markierten Proteine, die in ihrer Größe nicht dem Panx2-Protein entsprachen, neben dem Nachweis in der Membranfraktion zusätzlich in der zytosolischen Fraktion detektiert. Unter Verwendung präadsorbierter Panx2-Antikörper (Abbildung 3-40 M) oder unter Einsatz von Präimmunserum (Abbildung 3-40 N) wurden keine Proteine durch den Panx2-Antikörper detektiert. Western-Blot-Analysen mit transfizierten HeLa-Zellen bestätigten damit, dass der hergestellte Panx2-Antikörper in HeLa-Zellen das Panx2-Protein erkennt und in der Retina ein Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht detektiert. Durch den Nachweis von zwei weiteren schwachen Banden kann eine leichte unspezifische Markierung in der Maus-Retina nicht Der Panx2-Antikörper markiert im ausgeschlossen werden. Western-Blot transfizierter HeLa-Zellen Panx2-Proteine mit einem Molekulargewicht von ~86 kDa, während er in der Retina ~73 kDa umfassende Proteine detektiert. Der Nachweis

unterschiedlich großer Panx2-Proteine in Abhängigkeit vom Gewebe wurde bereits in anderen Studien beobachtet (Wang *et al.*, 2009; Swayne *et al.*, 2010). In neuronalen Vorläuferzellen wurde ein ~85 kDa umfassendes Protein detektiert, dessen Molekulargewicht sich im *Western-Blot* durch Depalmitoylierung um etwa ~35 kDa reduzierte (Swayne *et al.*, 2010).



Abbildung 3-40. Panx2-Antikörper-Charakterisierung mit Panx2-exprimierenden HeLa-Zellen. Das Panx2-GFP-Fusionsprotein (A) liegt komplett kolokalisiert mit der Panx2-Antikörper-Markierung in magenta (B) vor, was durch die die Kolokalisation der beiden Signale in weiß zu sehen ist (C) und eine spezifische Markierung des Panx2-Proteins anzeigt. Zellen, die ausschließlich mit dem GFP-Protein transfiziert wurden (D-F), zeigen im Bereich des Zellkerns eine leichte Markierung des Panx2-Antikörpers (E). Western-Blot-Analysen in (G) mit subzellulären Fraktionen Panx2-GFP transfizierter HeLa-Zellen (PxG) zeigten, dass das Panx2-GFP-Fusionsprotein (Sternchen) in der Membranfraktion (M) und im Totalhomogenat (TH) nachgewiesen werden kann. In Zellen, die Ausschließlich GFP-Proteine exprimierten (G), wurde kein Protein dieser Größe nachgewiesen. In den zytosolischen Fraktionen (Cyt) wurden keine Proteine markiert. In (H) detektierte ein GFP-Antikörper das GFP-Protein mit ~27 kDa in den GFP-transfizierten Kontrollzellen und das ~113 kDa große Panx2-GFP-Fusionsprotein in den mit diesem Protein transfizierten Zellen. Immunhistochemische Untersuchungen mit dem Panx2-Antikörper zeigte Immunoreaktivität in allen Schichten der Maus-Retina mit besonders deutlichen Signalen in der äußeren plexiformen Schicht und den Photorezeptoren (I). Wenige Panx2-Signale zeigten sich unter Einsatz von Antikörpern, die zuvor mit dem Immunisierungs-Peptid präadsorbiert worden waren (J), oder bei Verwendung des Präimmunserums (K). Im Western-Blot wurde eine deutliche Bande mit der erwarteten Größe von ~73 kDa im Totalhomogenat und in der Membranfraktion, jedoch nicht in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen. Zwei weitere schwache Banden von ~90 kDa und ~110 kDa wurden in der Membranfraktion, dem Totalhomogenat und in der zytosolischen Fraktion detektiert (L). Durch die Verwendung von präadsorbierten Panx2-Antikörpern (M) oder Präimmunserum (N) konnten keine immunoreaktiven Proteine detektiert werden. GCL = Ganglienzellschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; INL = innere Kernschicht; OPL = äußere plexiforme Schicht; ONL = äußere Kernschicht; IS = Innensegmente. Maßstab: 20 µm.

### 3.4.4 Keine Kolokalisation von Cx36 und Panx2 in Photorezeptoren

Im Rahmen der Panx2-Antikörper-Charakterisierung wurde eine deutliche Panx2-Immunoreaktivität in der äußeren plexiformen Schicht der Maus-Retina gezeigt (Abbildung 3-40 I). Markierungen in der äußeren Kernschicht und in den Innensegmenten der Photorezeptoren deuteten zusätzlich auf eine Expression in Photorezeptoren hin. Um zu überprüfen, ob sich die Panx2-Immunoreaktivität im Bereich der Photorezeptor-Synapsen auf Gap-Junction-Kanäle mit Cx36 zurückführen lässt, wurden vertikale Retinaschnitte mit Panx2 in magenta und einem monoklonalen Cx36-Antikörper in grün markiert (Abbildung 3-41 A). Die Überlagerung der beiden Signale zeigt keine Kolokalisation von Cx36 und Panx2. Der umrahmte Bereich der äußeren plexiformen Schicht ist in Abbildung 3-41 B als vergrößerte Einzelaufnahme dargestellt. Es kommt an keiner Stelle zu einer Kolokalisation von Cx36- und Panx2-Signalen.



Abbildung 3-41. Panx2- und Cx36-Verteilung in Vertikalschnitten der Retina einer 129/Sv-Maus. Das Immunoreaktivitätsmuster der Antikörper gegen Panx2 in magenta und Cx36 in grün zeigt für beide Antikörper eine deutliche Markierung der plexiformen Schichten sowie leichte Markierungen in den Kernschichten und den Innensegmenten (A). Der umrahmte Bereich der äußeren plexiformen Schicht (OPL) ist in (B) vergrößert dargestellt. Man erkennt keine Kolokalisation der beiden Proteine. A, B Einzelaufnahmen. GCL = Ganglienzellschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; INL = innere Kernschicht; ONL = äußere Kernschicht; IS = Innensegmente.

## 3.4.5 Immunzytochemische Expressionsanalysen mit Panx2

Als zusätzliche Überprüfung, ob Panx2 mit Cx36 oder allein Gap-Junction-Kanäle ausbildet, sollte eine Expression der beiden Proteine in eukaryotischen Zellen erfolgen. In der Literatur lag keine Information über Versuchsbedingungen vor, unter denen Panx2 in die Plasmamembran eingebaut wird. Deshalb wurde die aus der Retina isolierte Panx2-Sequenz in eukaryotischen Zellen unter verschiedenen Bedingungen zur Expression gebracht. Mit dem in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Expressionsvektor "mmPanx2:pEGFP-N1" wurde zunächst gezeigt, dass das Panx2-GFP-Fusionsprotein nicht in die Membran von eukaryotischen Zellen eingebaut wird. In Abbildung 3-42 sind HeLa-Zellen dargestellt, die das Fusionsprotein Panx2-GFP und im Vergleich dazu das Fusionsprotein Cx36-GFP exprimieren. Die in Abbildung 3-42 A dargestellten Durchlichtbilder zeigen kontaktierende Zellen, die sich nicht in der Zellteilung befinden. Abbildung 3-42 B zeigt dieselben Zellen mit dem grün fluoreszierenden Fusionsprotein Panx2-GFP. Panx2-GFP war ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert und wurde nicht in die Membran eingebaut. Abbildung 3-42 C aneinander angrenzende HeLa-Zellen, die zeiat drei mit dem Plasmid "pCx36EGFP-P" transfiziert wurden. Dieser Vektor wurde von der Arbeitsgruppe Willeke, Institut für Genetik, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt (vgl. Anhang, Abschnitt 8.1). Diese Zellen zeigten aus Cx36-GFP bestehende Gap-Junction-Plaques in den kontaktierenden Membranen angrenzender Zellen (Abbildung 3-42 D).



**Abbildung 3-42. Panx2-GFP- und Cx36-GFP-exprimierende HeLa-Zellen.** Die Durchlichtbilder zeigen kontaktierende Zellen, die mit den Fusionsproteinen Panx2-GFP (A) und Cx36-GFP (C) transfiziert wurden. Panx2-GFP wurde nicht in die Zellmembran eingebaut und ist im gesamten Zytoplasma lokalisiert (B). In Cx36-GFP-exprimierenden Zellen liegt das Fusionsprotein in den kontaktierenden Membranen angrenzender Zellen und im Bereich des Zellkerns (D). Alle Bilder sind einzelne Aufnahmen.

Da das an das Panx2 angehängte GFP-Protein zu Problemen beim Einbau in die Plasmamembran führen kann, wurde die Panx2-Gensequenz ohne GFP-Anhang in HeLa-Zellen zur Expression gebracht. Dazu wurde die Panx2-Sequenz in den "pcDNA3.1" einkloniert. Das Expressionsvektor daraus resultierende Expressionsplasmid "Panx2-pcDNA3.1" (vgl. Anhang, Abschnitt 8.1) wurde durch Sequenzierung auf Mutationen überprüft. In Abbildung 3-43 A ist eine Panx2exprimierende HeLa-Zelle abgebildet, in der das Panx2-Protein mit dem Panx2-Antikörper markiert wurde. Auch ohne GFP-Anhang wurde das Panx2-Protein nicht in die Zellmembran transportiert. Panx2-Immunoreaktivität zeigte sich ausschließlich im Zytoplasma, ähnlich wie es in Cx36-transfizierten Zellen zu sehen war, die keine Kontakte zu anderen Zellen besaßen (Abbildung 3-43 C). Der Vergleich mit Panx1transfizierten Zellen zeigte das Aussehen von HeLa-Zellen, in denen ein Protein der Pannexin-Genfamilie in die Plasmamembran transportiert wird (Abbildung 3-43 B). Abbildung 3-43 D zeigt, dass Panx2 nicht in Kontaktbereichen zwischen angrenzenden HeLa-Zellen lokalisiert war, wie es in Abbildung 3-43 F für Cx36-HeLa-Zellen aezeiat wird. Im Vergleich transfizierte dazu zeigten immunzytochemische Untersuchungen Panx1-exprimierender HeLa-Zellen eine starke Markierung in der gesamten Zellmembran, jedoch keine typischen Gap-Junction-Plagues in kontaktierenden Membranen benachbarter Zellen (Abbildung 3-43 E). Transfizierte Panx1- und Cx36-Proteine lagen ohne GFP-Anhang vor und wurden mit spezifischen Antikörpern markiert. Das Panx1-Protein wurde durch transiente Transfektion des Vektors "Panx1-pcDNA3.1" in HeLa-Zellen zur Expression gebracht. Der Vektor "Cx36m:pBEHpac18" wurde von der Arbeitsgruppe Willeke, Institut für Genetik, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt (vgl. Anhang, Abschnitt 8.1).



Abbildung 3-43. Transfektion von Panx1, Panx2 und Cx36 ohne *GFP*-Anhang in HeLa-Zellen. Die exprimierten Proteine wurden immunzytochemisch markiert. Panx2 war weder in der Zellmembran vereinzelter Zellen (A) noch in kontaktierenden Membranen benachbarter Zellen (D) lokalisiert. Das Panx1-Protein wurde in allen Zellen in die Zellmembran transportiert (B). Das Antikörper-Signal unterschied sich in kontaktierenden Membranen angrenzender Zellen nicht von der Markierung der übrigen Zellmembran (E). Cx36 zeigte keine Lokalisation in der Membran vereinzelter Zellen (C). In kontaktierenden Membranen benachbarter Zellen waren starke Markierungen des Cx36-Antikörpers zu sehen (F).

Im Folgenden wurde untersucht, ob das Panx2-Protein in die Membran transportiert wird, wenn es zusammen mit dem Cx36-Protein oder dem Panx1-Protein exprimiert wird. Hierzu wurden Zellen hergestellt, die Panx2 und Cx36 exprimieren, sowie Zellen, in denen Panx2 und Panx1 zur Expression gebracht wurden. In Abbildung 3-43 A sind HeLa-Zellen dargestellt, die mit Cx36 (Vektor "Cx36m:pBEHpac18") und Panx2 (Vektor "Panx2-pcDNA3.1") kotransfiziert wurden. Beide Proteine wurden immunzytochemisch markiert. Während das Cx36-Protein (magenta) in den Membranen angrenzender Zellen lokalisiert ist, liegt Panx2 (grün) ausschließlich im Zytoplasma der transfizierten Zellen vor. In Abbildung 3-44 B wurden HeLa-Zellen mit Panx1 (Vektor "Panx1-pcDNA3.1") und dem Fusionsprotein Panx2-GFP (Vektor "mmPanx2:pEGFP-N1") transfiziert. In diesen Zellen wurde Panx1 (magenta) in die Membran transportiert, während Panx2 im Zytoplasma lokalisiert war. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei einer transienten Transfektion von Panx1 zusammen mit Panx2 ohne GFP-Anhang (Daten nicht dargestellt). Dieses Ergebnis zeigte, dass die Koexpression von Panx2 mit Cx36 oder mit Panx1 keinen Einfluss auf den Einbau von Panx2 in die Plasmamembran hatte.



**Abbildung 3-44. Transfektion von Panx2 mit Panx1 sowie Panx2 mit Cx36 in HeLa-Zellen.** Panx2 wurde in Hela-Zellen zusammen mit Cx36 transient transfiziert. Panx2 (grün) liegt im Zytoplasma der Zellen vor, Cx36 (magenta) ist in den Membranen kontaktierender Zellen lokalisiert (A). In Panx1- und Panx2-*GFP*-exprimierenden HeLa-Zellen wird Panx1 (magenta), nicht jedoch Panx2 (grün) in die Zellmembran eingebaut (B).

Möglicherweise stand in HeLa-Zellen nicht das notwendige Expessionssystem für den Einbau in die Plasmamembran des Panx2-Proteins zur Verfügung, da es sich bei dieser Zelllinie um menschliche Epithelzellen handelt, Panx2 aber in neuronalen Geweben zur Expression kommt. Deshalb sollte mit Neuroblastom-Zellen der N2A-Zelllinie untersucht werden, ob Panx2 allein oder zusammen mit Panx1 in die Plasmamembran neuronaler Zellen eingebaut wird. Da Panx1 und Panx2 in Nervengeweben zur Expression kommen, musste bei diesen Versuchen berücksichtigt werden, ob die beiden Proteine endogen in untransfizierten N2A-Zellen vorliegen. Durch eine RT-PCR wurde gezeigt, dass eine starke Expression von Panx1 und eine schwache Expression von Panx2 in N2A-Zellen vorliegt. In Abbildung 3-45 ist das Ergebnis einer RT-PCR auf cDNA aus untransfizierten, Panx1-transfizierten und Panx2-transfizierten N2A-Zellen dargestellt. Diese drei cDNAs wurden in unterschiedenen Mengen von 170 ng, 250 ng und 700 ng in der PCR eingesetzt, damit gewährleistet war, dass die Menge an cDNA für eine Amplifikation ausreichte. Die RT-PCR mit den Panx1-spezifischen Primern "Panx1cdsnestF/R" zeigte das erwartete PCR-Produkt von 463 bp in Panx1transfizierten, Panx2-transfizierten und untransfizierten N2A-Zellen bei allen Template-Mengen (Abbildung 3-45 A und D). Unter Einsatz der Panx2-spezifischen *Primer* "Panx2lensbrainF/R" konnte im Falle der Panx2-transfizierten Zellen ein *PCR*-Produkt der korrekten Größe von 540 bp für alle Template-Mengen amplifiziert werden. Unter Einsatz der cDNA untransfizierter N2A-Zellen zeigte sich nur bei Verwendung der maximalen cDNA-Menge von 700 ng das korrekte Amplikon. Bei Verwendung von Templates Panx1-transfizierter Zellen wurde Panx2 nicht nachgewiesen (Abbildung 3-45 B und E). Die Kontroll-*PCR* mit den *Primern* "β-AktinF/R" zeigte durch ein Amplikon von 573 bp in allen getesteten Proben den fehlerlosen Ablauf der *RT-PCR* (Abbildung 3-45 C und F).



Abbildung 3-45. Überprüfung von N2A-Zellen auf die Expression von Panx1 und Panx2. Mit den Panx1-spezifischen *Primern* wurde das korrekte Fragment von 463 bp in Panx1-transfizierten (N2A-Panx1), Panx2-transfizierten (N2A-Panx2) und untransfizierten N2A-Zellen (N2A) unter Einsatz von 170 ng, 250 ng und 700 ng cDNA amplifiziert (**A**, **D**). Bei der Verwendung der Panx2-spezifischen *Primer* konnte nur im Falle der cDNA Panx2-transfizierter Zellen ein *PCR*-Produkt der korrekten Größe von 540 bp für alle Template-Mengen amplifiziert werden. In Panx1-transfizierten Zellen konnte Panx2 nicht nachgewiesen werden, in untransfizierten N2A-Zellen wurde nur unter Einsatz von 700 ng das Fragment der erwarteten Größe amplifiziert (**B**, **E**). Die *RT-PCR* mit  $\beta$ -Aktin-spezifischen *Primern* belegt das Vorliegen intakter cDNA (**C**, **F**). NK = Negativkontrolle.

Es wurde überprüft, ob die endogen exprimierten Panx1- und Panx2-Proteine in N2A-Zellen immunzytochemisch nachweisbar sind. Das Fusionsprotein Panx2-*GFP* wurde in N2A-Zellen transfiziert und die Zellen mit einem Panx2-spezifischen Antikörper behandelt. In Abbildung 3-46 A ist das *GFP*-Signal des Fusionsprotein in grün und in Abbildung 3-46 B das Antikörper-Signal in rot dargestellt. Rote Antikörper-Markierungen lagen ausschließlich kolokalisiert mit dem Fusionsprotein Panx2-*GFP* vor (Abbildung 3-46 C). Um zu überprüfen, ob der Panx1-Antikörper endogen exprimierte Panx1-Proteine detektierten, wurde die Immunoreaktivität Panx1-transfizierter und -untransfizierter N2A-Zellen verglichen. In untransfizierten Zellen wurden die Zellkerne markiert (Abbildung 3-46 D), die Zellmembranen zeigten nur in mit Panx1-transfizierten N2A-Zellen Immunoreativität (Abbildung 3-46 E).



Abbildung 3-46. Immunoreaktivität von endogenem Panx1 und Panx2 in N2A-Zellen. N2A-Zellen wurden mit dem Fusionsprotein Panx2-*GFP* transfiziert und mit dem Panx2-Antikörper markiert. Das rote Panx2-Antikörper-Signal (B) detektierte ausschließlich das Panx2-*GFP*-Fusionsprotein (A) und zeigte eine komplette Kolokalisation (C). Panx1-Immunoreaktivität zeigte in untransfizierten N2A-Zellen eine leichte Markierung der Zellkerne (D), während in Panx1-transfizierten Zellen zusätzlich die Zellmembran durch den Antikörper markiert wurde (E).

Die Proteine Panx1 und Panx2 wurden getrennt und zusammen in N2A-Zellen transfiziert, um zu überprüfen, ob Panx2 in diesem Expressionssystem in die Membran transportiert wird. Die transiente Transfektion von Panx1 (Vektor "Panx1pcDNA3.1") mit anschließender Immunzytochemie zeigte, dass das Protein in N2A-Zellen in die Membran transportiert wird (Abbildung 3-47 A). Dies galt für Zellen mit und ohne Kontakte zu anderen Zellen. In Zellen, die Kontaktstellen zu Zellmembranen benachbarter Zellen besaßen, unterschied sich das Antikörper-Signal in den kontaktierenden Membranen nicht von der Markierung in der übrigen Zellmembran. Die transiente Transfektion des Fusionsproteins Panx2-GFP (Vektor "mmPanx2:pEGFP-N1") zeigte, dass Panx2 auch in N2A-Zellen ausschließlich im Zytoplasma vorliegt (Abbildung 3-47 B). Die Transfektion des Fusionsproteins Panx2-GFP zusammen mit Panx1 in N2A-Zellen zeigte, dass Panx2 auch zusammen mit Panx1 nicht in die Memban transportiert wurde (Abbildung 3-47 C). Während das Panx1-Protein in der Plasmamembran vorlag, war Panx2 ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Während es in HeLa-Zellen den Anschein hatte, als wäre Panx2 im endoplasmatischen Retikulum rund um den Zellkern lokalisiert, wird in N2A-Zellen deutlich, dass das Panx2-Protein in Form von Vesikeln in den Ausläufern der N2A-Zellen vorliegt, die weit vom endoplasmatischen Retikulum entfernt liegen (Abbildung 3-47 C, Umrahmung).



**Abbildung 3-47. Transfektion von Panx1 und Panx2 in N2A-Zellen.** Die Expression von Panx1 in N2A-Zellen zeigte in Zellen mit und ohne Kontakte zu anderen Zellen eine Lokalisation in der Membran (A). In Zellen, die mit Panx2-*GFP* transfiziert wurden, lag das Fusionsprotein ausschließlich im Zytoplasma vor. Das galt für Zellen mit und ohne Zellkontakte (B). In N2A-Zellen, die mit Panx1 und dem Fusionsprotein Panx2-*GFP* transfiziert wurden, lag Panx1 in der Membran vor, während Panx2 zytoplasmatisch auftrat (C). Das Fusionsprotein Panx2-*GFP* wurde in Form von Vesikeln bis an die Enden der Zellausläufer transprtiert (Umrahmung in C).

Dieser in Abbildung 3-47 dargestellte Versuch wurde unter veränderten Versuchsbedingungen erneut durchgeführt. Um auszuschließen, dass der GFP-Anhang am C-terminalen Ende des Panx2-Proteins den Einbau in die Membran behindert, wurde der Versuch unter Einsatz des Panx2-Vektors ohne GFP-Anhang (Vektor "Panx2-pcDNA3.1") wiederholt. Die Zeiten nach der Transfektion betrugen in dieser Versuchsreihe 36, 48 und 72 Stunden. Dies sollte gewährleisten, dass genug Zeit für die Prozessierung und für den Einbau in die Plasmamembran zur Verfügung steht. Da die Halbwertszeit von Pannexinen nicht bekannt war, wurde die Zeit nach der Transfektion in einem weiteren Versuch von 36 auf 24 Stunden verkürzt, um zu verhindern, dass das Panx2-Protein bei der Fixierung der Zellen bereits abgebaut war. Die Konzentration von Kalzium im Zellkulturmedium betrug 1,36 mM und 5 mM. Neben dem verwendeten Transfektionsreagenz "Nanofect" (Qiagen) wurden in zwei weiteren Versuchsreihen unter allen oben beschriebenen Bedingungen die Reagenzien "Attractene" (Qiagen) und "Transfectin" (Biorad) verwendet, um auszuschließen, dass ein Transfektionsreagenz den Einbau von Panx2 in die Plasmamembran behindert. Unter allen Versuchsbedingungen zeigte sich das in Abbildung 3-47 dargestellte Ergebnis.

Eine zusätzlich durchgeführte Transfektion von Panx2 zusammen mit Cx36 zeigte in N2A-Zellen das gleiche Ergebnis wie in HeLa-Zellen: Cx36-Proteine wurden in die Membranen angrenzender Zellen transportiert, während Panx2-Proteine ausschließlich zytoplasmatisch vorlagen. Diese Ergebnisse entsprechen den Expressionsstudien anderer Arbeitsgruppen, die Panx2 ebenfalls in intrazellulären Zellkompartimenten, jedoch nicht in der Plasmamembran beobachteten (Penuela *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2007).

#### 3.4.6 Elektrophysiologische Expressionsanalysen mit Panx2

Die immunzytochemischen Analysen deuten darauf hin, dass Panx2 in der zytoplasmatischen Membran von kultivierten Säugerzellen keine Kanäle ausbildet. Es wurde beschrieben, dass Pannexine nicht in Plagues, sondern verteilt auf der Zellmembran vorkommen und dass diese Strukturen oft nur schwach zu detektieren sind (Huang et al., 2007). Um auszuschließen, dass Panx2 Gap-Junction-Kanäle ausbildet, die immunzytochemisch nicht zu lokalisieren sind, wurden transfizierte HeLa- und N2A-Zellen elektrophysiologisch untersucht. Dabei sollte mit Patch-Clamp-Ableitungen festgestellt werden, ob Panx2 allein oder zusammen mit Cx36 funktionelle Gap-Junction-Kanäle ausbildet. Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden von Prof. Andreas Feigenspan durchgeführt. Zunächst wurden mit Cx36 (Vektor "Cx36m:pBEHpac18") transfizierte HeLa-Zellen verwendet, um die experimentellen Bedingungen zu etablieren. Alle Transfektionen erfolgten transient, so dass die transfizierten Zellen durch ein fluoreszierendes Protein markiert werden mussten, um während der Patch-Clamp-Messungen lokalisiert werden zu können. Hierzu wurden die mit Cx36 transfizierten Zellen mit einem GFP-Protein (Vektor "peGFP-N1") kotransfiziert. Ein Teil der transfizierten Zellen wurde fixiert und mit einem Antikörper gegen Cx36 markiert. Dadurch zeigte sich, dass die mit dem GFP-Protein transfizierten Zellen zu 95% das Cx36-Protein exprimierten. Diese Überprüfung gewährleistete, dass die abgeleiteten grün fluoreszierenden Zellen das Cx36-Protein exprimierten, wie es für ein Zellpaar in Abbildung 3-48 A dargestellt ist. In der Patch-Clamp-Messung Cx36-exprimierender Zellen zeigt die obere Spur das Spannungsprotokoll mit einer Depolarisation, gefolgt von einer Hyperpolarisation. Die mittlere Spur zeigt den Stromverlauf der injizierten Zelle. Bei dieser Zelle stellt der Strom eine Antwort auf das Spannungsprotokoll dar und basiert auf einer linearen ohmschen Leitfähigkeit der Zelle. Hier wurde die Klemmspannung vom Verstärker vorgegeben. Die untere Spur zeigt den Stromverlauf der benachbarten Zelle, die bei 0 mV gehalten wurde. Diese Zelle kann eine Spannungsänderung nur durch interzelluläre Kanäle registrieren. Die Abweichungen von der Nulllinie stellen Ströme durch die Plasmamembran der beiden Zellen dar. Durch die Umkehr der Stromrichtung weisen die Ströme in den gekoppelten Zellen eine umgekehrte Polarität auf. Es wurden insgesamt 15 Zellpaare gemessen; bei allen zeigten die gekoppelten Zellen Ströme wie in Abbildung 3-48 A. Als Kontrolle wurden *GFP*transfizierte HeLa-Zellen verwendet. Bei der Ableitung dieser Zellen wurde zunächst von 0 mV auf -90 mV hyperpolarisiert und anschließend auf 90 mV depolarisiert (Abbildung 3-48 B). In der benachbarten Zelle kam es zu keiner Abweichung von der Nulllinie; deshalb kann die Stromantwort in Abbildung 3-48 A auf transfizierte Cx36-Proteine zurückgeführt werden.



Abbildung 3-48. *Patch-Clamp*-Ableitungen von Cx36-transfizierten HeLa-Zellpaaren. Um transfizierte Zellen zu lokalisieren, wurden die Zellen mit einem *GFP*-Protein kotransfiziert. Immunzytochemische Markierungen mit einem Cx36-Antikörper in rot zeigten, dass in *GFP*-exprimierenden Zellen Cx36 zur Expression kam (A, oben). Die Ableitungen der HeLa-Zellpaare zeigen in der oberen Spur das Spannungsprotokoll mit einer Depolarisation von 0 mV auf 90 mV und einer anschließenden Hyperpolarisation nach -90 mV. Die mittlere Spur zeigt den Stromverlauf der injizierten Zelle, die dritte Spur den Stromverlauf einer angrenzenden Zelle (A und B). Bei den Ableitungen von Cx36-transfizierten Zellpaaren traten Ströme durch die Plasmamembran auf (A). In *GFP*-transfizierten Kontrollzellen wurde zunächst hyperpolarisiert und anschließend depolarisiert. Es konnten keine Ströme zwischen benachbarten Kontrollzellen gemessen werden (B). (Ableitungen durch Prof. Andreas Feigenspan, unveröffentlicht).

Um zu überprüfen, ob Panx2 allein in der Lage ist, funktionelle Kanäle zwischen HeLa-Zellen auszubilden, wurden die Zellen mit Panx2 (Vektor "Panx2-pcDNA3.1") transfiziert. Zur Identifizierung der Panx2-transfizierten Zellen wurde das *GFP*-Protein kotransfiziert. In Abbildung 3-49 A sind zwei der transfizierten Zellen abgebildet. Die *Patch-Clamp*-Messung der Panx2-exprimierenden Zellen zeigt in der oberen Spur das Spannungsprotokoll mit einer Hyperpolarisation und einer

anschließenden Depolarisation. Die mittlere Spur stellt den typischen Stromverlauf der injizierten Zelle dar. Der Stromverlauf der anliegenden Zelle zeigte keine Abweichung von der Nulllinie. Abbildung 3-49 B zeigt Messungen an HeLa-Zellpaaren, bei denen die injizierte Zelle Panx2 überexprimiert, während in der angrenzenden Zelle Cx36 zur Expression gebracht wurde. Um während der elektrophysiologischen Ableitungen Panx2-transfizierte Zellpaare zu lokalisieren, wurden diese Zellen mit einem rot fluoreszierenden Protein (Vektor "pDsRed-Express-N1") kotransfiziert. Diese Zellen wurden nach 24 Stunden mit Zellen vereinigt, in denen Cx36-GFP (Vektor "pCx36EGFP-P") zur Expression gebracht wurde. Dass Cx36 auch mit GFP-Anhang in der Lage ist, funktionelle Kanäle zwischen Zellen auszubilden, wurde zuvor elektrophysiologisch untersucht. In Abbildung 3-49 B sind die vereinigten Zellen der verschiedenen Transfektionen dargestellt. Das Panx2-Protein wurde mit einem Antikörper in blau markiert. Die Ableitungen von benachbarten Zellen, von denen in der injizierten Zelle Panx2 und in der angrenzenden Zelle Cx36 zur Expression gebracht wurde, zeigten keine Anzeichen für den Einbau funktioneller Gap Junctions in die Plasmamembran. Nach einer Spannungsänderung der injizierten Zelle kam es zu keiner Veränderung des Stromverlaufs der anliegenden Zelle durch interzelluläre Kanäle.



**Abbildung 3-49.** *Patch-Clamp-***Ableitungen von Panx2-transfizierten HeLa-Zellpaaren.** In den *Patch-Clamp-*Ableitungen zeigte der Stromverlauf der angrenzenden Zelle keine Abweichung von der Nulllinie (A). Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei der Ableitung benachbarter Zellen, von denen die injizierte Zelle mit Panx2 transfiziert und die anliegende Zelle mit dem Fusionsprotein Cx36-*GFP* transfiziert war. Die Panx2-transfierte Zelle wurde zur Lokalisation mit einem rot fluoreszierenden Protein markiert. Die immunzytochemische Markierung des Panx2-Proteins in blau zeigt die Verteilung der Proteine in den transfizierten Zellen (B). (Ableitungen durch Prof. Feigenspan, unveröffentlicht).
Die in Abbildung 3-49 dargestellten Versuche wurden unter veränderten Versuchsbedingungen wiederholt. Die Zeit von der Transfektion der HeLa-Zellen bis zur elektrophysiologischen Untersuchung wurde variiert. Damit sollte zum einen gewährleistet werden, dass genug Zeit für die Prozessierung und den Einbau in die Membran zur Verfügung stand. Zum anderen sollte durch kurze Transfektionszeiten sichergestellt sein, dass die Panx2-Proteine nicht vor der Ableitung abgebaut wurden. Es wurden zwei verschiedene Reagenzien, "Attractene" und "Nanofect", verwendet, um auszuschließen, dass das Transfektionsreagenz den Einbau von Panx2 in die Membran behindert. Es wurden sowohl an Einzelzellen als auch an zwei benachbarten Zellen *Patch-Clamp*-Messungen vorgenommen. In Tabelle 3-3 sind die verschiedenen Versuchsbedingungen und die Anzahl der Messungen aufgeführt. Insgesamt wurden 15 Messungen an Zellpaaren und 22 Messungen an Einzelzellen durchgeführt, von denen keine eine Veränderung des Stromverlaufs der anliegenden Zelle nach einem Spannungsimpuls zeigte.

**Tabelle 3-3. Versuchsbedingungen und Anzahl der abgeleiteten HeLa-Zellen.** Es wurden Messungen an jeweils zwei benachbarten Zellen und an Einzelzellen vorgenommen, wobei entweder mit "Attractene" oder mit "Nanofect" transfiziert wurde. Panx2 wurde mit und ohne *GFP*-Anhang transfiziert. Die Messungen wurden im Abstand von 24 h, 48 h und 72 h durchgeführt. Gezeigt ist die Anzahl der Messungen unter den jeweiligen Versuchsbedingungen.

	Zell-	Zellpaare	Einzel-	Einzel-	Einzel-	Einzel-
	paare	Panx2	zellen	zellen	zellen	zellen
	Panx2	Nanofect	Panx2	Panx2	Panx2-GFP	Panx2-
	Attrac-		Attracten	Nanofect	Attractene	GFP
	tene		е			Nanofect
24 h	-	1	-	4	_	_
48 h	_	7	3	2	6	_
72 h	7	—	1	_	2	4

Durch *Patch-Clamp*-Analysen an Neuroblastom-Zellen (N2A-Zellen) wurde untersucht, ob die Transfektion von Panx2 zu Strömen zwischen benachbarten, neuronalen Zellen führt. Hierzu wurde Panx2 (Vektor "Panx2-pcDNA3.1") zusammen mit dem *GFP*-Protein in N2A-Zellen transfiziert und die Zellen nach 24 bis 48 Stunden abgeleitet. Außerdem wurde das Fusionsprotein Panx2-*GFP* (Vektor "mmPanx2:pEGFP-N1") zusammen mit Panx1 (Vektor "Panx1-pcDNA3.1") in N2A-Zellen transfiziert und die Ströme der anliegenden Zellen gemessen. Es wurde getestet, ob Panx2 unter Anwesenheit von ATP in der *Patch*-Pipette oder in der Extrazellulärlösung funktionelle Kanäle zwischen N2A-Zellen ausbildet. In einem weiteren Versuch wurde die Kalzium-Konzentration in der *Patch*-Pipette auf 100 µM erhöht. In keinem der Versuche gab es in der angrenzenden Zelle nach einer Spannungsänderung in der injizierten Zelle eine deutliche Abweichung von der Nulllinie. Panx2 war weder allein noch zusammen mit Panx1 oder Cx36 in der Lage, funktionelle *Gap Junctions* zwischen angrenzenden N2A-Zellen auszubilden.

#### 3.5 Subzelluläre Panx2-Expression in der Maus-Retina

Im Rahmen der Suche nach dem Kopplungspartner zu Cx36 in Photorezeptoren wurde die Expression von Panx2 in Photorezeptoren beobachtet. Da die Funktion dieses Proteins weitgehend unbekannt ist, wurde der Frage nachgegangen, an welchen Stellen Panx2 in der Retina lokalisiert ist und ob es dort möglicherweise eine Rolle bei der Modulation von visuellen Signalen spielen könnte. Im Gegensatz zu Panx1 (Dvoriantchikova *et al.*, 2006; Prochnow *et al.*, 2009) gibt es keine Studien, in denen Panx2-Proteine in der Retina lokalisiert wurden und keinerlei ultrastrukturelle Daten dieses Proteins im Gewebe. Der folgende Abschnitt umfasst eine detaillierte Lokalisation der Panx2-Expression in der Maus-Retina. Ultrastrukturelle Analysen zeigten Panx2-Proteine prä- und postsynaptisch in der Photorezeptorsynapse und gaben Hinweise darauf, dass Panx2 eine Rolle in der retinalen Signalverarbeitung spielen könnte.

#### 3.5.1 Panx2-mRNA in Horizontal- und Müllerzellen mittels RT-PCR

Die Expression von Panx2 konnte durch Einzelzell-*RT-PCR*s neben Photorezeptoren in Horizontal- und Müllerzellen nachgewiesen werden. Für diesen Versuch wurden Aliquots derselben Templates verwendet wie für die Einzelzell-*RT-PCR* mit Panx1-*Primern* (vgl. Abschnitt 3.3.11). Durch die geringe Menge an cDNA konnte nur durch die *Primer*-Kombination "Panx2Exon2" in einer *Nested-PCR* ein Produkt amplifiziert werden. Diese *Primer* binden im zweiten Exon des Panx2-Gens und sind in der Genund in der Aminosäuresequenz in Abschnitt 8.4 dargestellt. In allen sechs Horizontalzell-Proben und allen fünf Müllerzell-Proben wurde ein Produkt der erwarteten Größe amplifiziert (Abbildung 3-50). Eine Kontroll-*PCR* der Proben mit Intron-überspannenden β-Aktin-*Primern* schlossen eine Kontamination der Proben mit genomischer DNA aus. Eine Amplifikation mit Cx57-*Primern* dokumentiert die Anwesenheit von Horizontalzell-cDNA, eine *PCR* mit Glutaminsynthetase-*Primern* bestätigt das Vorliegen von Müllerzell-cDNA. Jeweils ein Panx2-Amplikon der *PCR* mit Horizontalzellen und Müllerzellen wurde sequenziert. Die Sequenzen der *PCR*-Produkte zeigten 100%ige Übereinstimmung mit der von Panx2.



Abbildung 3-50. Einzellzell-*RT-PCR* mit mRNA aus Horizontal- und Müllerzellen. Alle sechs Horizontalzell-Proben (HZ) und alle fünf Müllerzell-Proben (MZ) zeigten unter Verwendung der Panx2-*Primer* "Panx2Exon2" das erwartete *PCR*-Produkt von 318 bp. Eine Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA wurde durch ein *PCR*-Produkt von 546 bp mit Intronüberspannenden  $\beta$ -Aktin-*Primern* ausgeschlossen. Eine *RT-PCR* mit Cx57-*Primern* belegte das Vorliegen von Horizontalzell-DNA durch eine Bande von 383 bp. Das Vorliegen von MüllerzellcDNA wurde durch Glutaminsynthetase-*Primer* mit Fragmenten von 460 bp bestätigt. Eine Sequenzierung der Proben "HZ 1" und "MZ 1" dokumentierten das Vorliegen der Panx2-Sequenz. Es sind jeweils zwei Bilder der gesammelten Horizontal- und Müllerzellen dargestellt (rechts). MR = Maus-Retina; NK = Negativkontrolle.

### 3.5.2 Analyse der retinalen Panx2-Lokalisation mit einer RNA-Sonde

Um die mit *RT-PCR* gezeigte mRNA-Expression von Panx2 in retinalen Zellen zu bestätigen, wurden *In-situ*-Hybridisierungen mit Panx2-spezifischen RNA-Sonden durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine Rhodopsin-spezifische RNA-Sonde als Positivkontrolle hergestellt. Da Rhodopsin nur in Stäbchen exprimiert wird, war es mit dieser Sonde möglich, in Doppelfluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierungen zu analysieren, ob Panx2 in Stäbchen, in Zapfen oder beiden Photorezeptortypen zur Expression kommt. Die Sondensequenz wurde mit den *Primern* "Rhodopsin mm F1" und "Rhodopsin mm R1" aus der Maus-Retina isoliert (Sequenz vgl. Anhang, Abschnitt 8.4). Aus dieser DNA wurde eine zur mRNA komplementäre RNA-Antisense-Sonde hergestellt. Eine der mRNA-Sequenz entsprechende Sense-Sonde wurde unter gleichen Bedingungen hergestellt und als Negativkontrolle verwendet. Mit den *Primern* "Panx2full length" wurde auf die gleiche Weise eine Panx2-spezifische RNA-Sonde hergestellt. Die zur Herstellung der Sonde verwendete Sequenz umfasste die komplette codierende Sequenz von der in Abschnitt 3.4.2 detektierten Sequenz von Panx2 (Genbank-*Accession*-Nummer NM 001002005). In Abbildung 3-51 sind die

Ergebnisse der konventionellen *In-situ*-Hybridisierung mit der Panx2- und der Rhodopsin-spezifischen RNA-Sonde dargestellt. Die Panx2-Antisense-Sonde (Abbildung 3-51, rechts) ergab Markierungen in der Photorezeptorschicht, der Ganglienzellschicht und der inneren Kernschicht. In der Photorezeptorschicht zeigte sie mit einer besonders starken Markierung der Innensegmente das gleiche Muster wie die Rhodopsin-Antisense-Sonde. Die Hybridisierung der Retinaschnitte mit der Panx2-Sense-Sonde und der Rhodopsin-Sense-Sonde wies keine Markierungen auf.



**Abbildung 3-51.** *In-situ*-Hybridisierung mit der Panx2-RNA-Sonde. Die Hybridisiering mit der Panx2-Antisense-Sonde (Panx2 AS) zeigte kräftige Signale in der Ganglienzellschicht (GCL) und der inneren Kernschicht (INL). Die Markierung der Innensegmente (IS) und die schwache Markierung in der äußeren Kernschicht (ONL) entsprechen jener der durch die Rhodopsin-Antisense-Sonde (Rho AS) markierten Retina. Die als Negativkontrollen mit der Panx2-Sense-Sonde (Panx2 S) und der Rhodopsin-Sense-Sonde (Rho S) behandelten Retinaschnitte zeigten keine Markierungen. IPL = innere plexiforme Schicht; OPL = äußere plexiforme Schicht.

Weitere In-situ-Hybridisierungen mit Panx2-Sonden wurden im Rahmen einer Diplomarbeit unter meiner Betreuung weitergeführt (Katharina Schmidt, Diplomarbeit 2009). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten die hier dargestellten Daten mit Cterminalen Panx2-Sonden. In Abbildung 3-52 wurde eine Doppelfluoreszenz-In-situ-Hybridisierung auf vertikalen Retinaschnitten mit einer Rhodopsin-spezifischen RNA-Sonde (Abbildung 3-52 A, grün) und einer Panx2-spezifischen RNA-Sonde (Abbildung 3-52 B, magenta) durchgeführt. In Stäbchen fanden sich Panx2-Transkripte kolokalisiert mit Rhodopsin-Transkripten in den Innensegmenten, dem Ort der Translation der mRNA in Proteine (Abbildung 3-52 C, Pfeilköpfe). Panx2mRNA wurde außerdem in den Innensegmenten der Zapfen beobachtet, die proximal zu den Stäbchen-Innensegmenten lokalisiert sind (Abbildung 3-52 C. Pfeile). In der äußeren Kernschicht waren Markierungen durch die Panx2-spezifische RNA-Sonde im Bereich der Zellsomata zu sehen. In der inneren Retina wurde Panx2-mRNA rund die Kerne der Kernschicht um inneren und der Ganglienzellschicht detektiert. Die Ganglienzellen waren unterschiedlich stark oder gar nicht gefärbt; möglicherweise hängt die Panx2-Expression hier von dem jeweiligen Ganglienzelltyp ab. Die Kontrolle mit einer Panx2- und einer Rhodopsinspezifischen Sense-Sonde zeigte keine Markierungen, was die Spezifität der Antisense-Sonden bestätigt (Abbildung 3-52 D).



Abbildung 3-52. Doppelfluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierung mit einer Panx2- und einer Rhodopsin-spezifischen RNA-Sonde. Die Rhodopsin-Antisense-Sonde (grün) markiert Transkripte in den Innensegmenten (IS) der Stäbchen (A). Panx2-Transkripte (magenta) wurden in den Innensegmenten der Photorezeptoren, in der inneren und äußeren Kernschicht und in der Ganglienzellschicht (GCL) detektiert (B). In den Innensegmenten wurde eine Kolokalisation von Panx2- und Rhodopsin-Transkripten in den Innensegmenten der Stäbchen beobachtet (C, Pfeilköpfe). Proximal zu den Innensegmenten der Stäbchen war Panx2-mRNA in den Innensegmenten der Zapfen zu sehen (C, Pfeile). Alle Bilder zeigen Projektionen von Einzelaufnahmen über 2  $\mu$ m; Maßstab: 20  $\mu$ m. Die Kontrolle mit einer Panx2- und einer Rhodopsin-spezifischen Sense-Sonde zeigte keine Markierungen (D). IPL = innere plexiforme Schicht; INL = innere Kernschicht; OPL = äußere plexiforme Schicht; ONL = äußere Kernschicht.

## 3.5.3 Lokalisation des Panx2-Proteins in Photorezeptoren

Die Expression von Panx2-mRNA in Photorezeptoren warf die Frage auf, an welchen Stellen das Protein in diesen Zellen lokalisiert ist. Um diese Frage beantworten zu können, wurden sowohl immunhistochemische Untersuchungen auf dissoziierten Zellen und retinalen Schnitten als auch ultrastrukturelle Analysen durchgeführt.

Dissoziierte Retinazellen wurden mit dem Panx2-Antikörper und dem Photorezeptorspezifischen Antikörper *PSD95* angefärbt. Panx2-Immunoreaktivität wurde in *PSD95* markierten Photorezeptoren vorwiegend in der Nähe des Somas und in den Terminalien gefunden (Abbildung 3-53 A). Die Detektion des Panx2-Proteins in isolierten Photorezeptoren bestätigte die auf mRNA-Ebene gefundenen Expression von Panx2 in Stäbchen und Zapfen. Für eine Lokalisation von Panx2 in Photorezeptoren innerhalb des Gewebes wurden immunhistochemische Analysen auf vertikalen Retinaschnitten durchgeführt. Erste Analysen zeigten eine starke

**Ergebnisse** 

Lokalisation von Panx2-Proteinen in der äußeren plexiformen Schicht. Zur detaillierten Analyse von Panx2 in der äußeren plexiformen Schicht wurden Doppelimmunfärbungen mit einem Antikörper gegen PSD95 durchgeführt (Abbildung 3-53 B). Der Antikörper gegen PSD95 markiert die Membranen der Zapfen- und der Stäbchen-Terminalien. Deutliche Panx2-Immunoreaktivität wurde in den Innensegmenten und in der äußeren plexiformen Schicht beobachtet. In den Innensegmenten erschienen die Panx2-Markierungen in einer feinen Verteilung, wohingegen in der äußeren plexiformen Schicht größere Plaques zu sehen waren. In der äußeren Kernschicht erschienen vorwiegend im proximalen Bereich vereinzelte Panx2-Plaques. Diese Markierungen im Bereich der Photorezeptor-Kerne könnten mit dem Transport der Panx2-Proteine vom Proteinsynthese-Apparat der Innensegmente zu den Terminalien der Photorezeptoren erklärt werden, wie es auch für Cx36 hypothetisiert wurde (Feigenspan et al., 2004). Im Bereich der Photorezeptor-Terminalien war Panx2 innerhalb der durch PSD95 gefärbten Membranen der Stäbchen-Spherules und Zapfen-Pedikel zu sehen (Abbildung 3-53 C). Diese Markierungen zeigten Panx2-Proteine in den Photorezeptor-Synapsen oder den Terminalien von Bipolarzellen oder Horizontalzellen. Die Auflösung der konfokalen Mikroskopie war zu gering, um diese Signale einem Zelltyp zuordnen zu können. Um die genaue Lokalisation von Panx2 innerhalb der Photorezeptor-Synapse festlegen zu können, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen mit dem Panx2-Antikörper durchgeführt. Dadurch wurden deutliche Panx2-Markierungen in den Membranen der Stäbchen-Spherules beobachtet, die stets auf eine zytoplasmatische Membran beschränkt waren (Abbildung 3-53 D). Damit wurde das in den Expressionsanalysen gezeigte Ergebnis, dass Panx2 keine interzellulären Gap-Junction-Kanäle ausbildet, im retinalen Gewebe bestätigt. Im Gegensatz zu transfizierten Zellen, in denen die Panx2-Expression auf zytoplasmatische Kompartimente beschränkt war, wurde Panx2 hier jedoch zum ersten Mal in Plasmamembranen beobachtet. In Zapfen waren Panx2-Markierungen ebenfalls in der Plasmamembran bzw. in der Nähe der Plasmamenbran lokalisiert (Abbildung 3-53 E). Die Stäbchen- und Zapfen-Synapsen sind vor allem durch ihre synaptischen Bänder zu erkennen, einem elektronendichten Material, an dem die Glutamat-Freisetzung erfolgt (Abbildung 3-53D, E Pfeile). In Stäbchen-Photorezeptoren findet sich nur eine, in Zapfen mehrere Bandsynapsen in den Terminalien (tom Diek und Brandstätter, 2006).

102



Abbildung 3-53. Panx2-Lokalisation in Photorezeptoren der Maus. Panx2- Immunoreaktivität (grün) in PSD95-gefärbten (magenta) Photorezeptoren bestätigte die Expression von Panx2-Proteinen in Photorezeptoren. Diese Markierungen lagen im Bereich der Somata und der Terminalien (A). In vertikalen Retinaschnitten wurde Panx2-Immunoreaktivität (grün) in einer feinen, diffusen Verteilung in den Innensegmenten (IS) beobachtet. Die äußere Kernschicht (ONL) zeigte vereinzelte Panx2-positive Plaques, während in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) eine starke Immunoreaktivität im Bereich der PSD95-markierten Photorezeptor-Terminalien beobachtet wurde (B). Eine Vergrößerung des umrahmten Bereiches der OPL zeigt, dass Panx2 innerhalb der durch PSD95 gefärbten Membranen der Photorezeptor-Terminalien lokalisiert ist (C). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden tangentiale Retinaschnitte der OPL mit dem Panx2-Antikörper markiert. Die Pfeilköpfe zeigen Panx2-Immunoreaktivität in Zellmembranen von Stäbchen-Spherules. Die Rechtecke umschließen eine stärkere Vergrößerung der Panx2-markierten Membranstellen I und II. An die Panx2-markierten Membranen angrenzende Stäbchen wurden nicht durch den Panx2-Antikörper markiert (D). In Zapfen war Panx2-Immunoreaktivität in der zytoplasmatischen Membran und im Zytoplasma in der Nähe dieser Membran lokalisiert (Pfeilkopf). Die angrenzende Membran eines Stäbchens zeigte keine Markierung (E). In den ultrastrukturellen Aufnahmen liegen die Sterne innerhalb von Horizontalzellfortsätzen in Photorezeptor-Terminalien, Pfeile zeigen auf die synaptischen Bänder. Maßstab: 10 µm in A; 20 µm in B; 5 µm in C; 500 nm in D und E; Vergrößerungen in D 100 nm; Projektionen in A und B; Einzelscan in C. INL = innere Kernschicht. (Elektronenmikroskopie in Zusammenarbeit mit Dr. Konrad Schultz; Bolte et al., in Ausarbeitung).

#### 3.5.4 Lokalisation von Panx2-Proteinen in Horizontalzellen

Aufgrund der gezeigten Lokalisation von Panx2 in der Photorezeptorsynapse könnten diese Proteine an der Modulation von Photorezeptor-Signalen beteiligt sein. Die Expression auf Horizontalzell-Fortsätzen wurde für Panx1 im Zebrafisch beschrieben (Prochnow *et al.*, 2009). Deshalb wurde untersucht, ob Panx2 in der Photorezeptor-Synapse nicht nur präsynaptisch auf Photorezeptoren, sondern auch postsynaptisch auf Horizontalzellen exprimiert wird. Für diese Analyse wurden zunächst dissoziierte Retina-Zellen mit dem Panx2-Antikörper und dem Horizontalzell-spezifischen (Herstellerinformation) Antikörper Calbindin angefärbt (Abbildung 3-54 A, D). Starke Panx2-Immunoreaktivität wurde in der Nähe der Somata und eine feine Panx2-Punktierung entlang der Horizontalzell-Dendriten gefunden (Abbildung 3-54 B, C). In den Axonen wurde Panx2-Immunorektivität ebenfalls entlang des gesamten Fortsatzes beobachtet (Abbildung 3-54 E, F).

In vertikalen Schnitten der Retina wurden auf den Zellkörpern der Horizontalzellen nur sehr schwache Panx2-Signale gefunden. Deutliche Panx2-Markierungen waren direkt neben Calbindin-gefärbten Horizontalzell-Fortsätzen zu sehen (Abbildung 3-54 G, H). Um zu analysieren, ob Panx2 in den Fortsätzen der Horizontalzellen lokalisiert ist, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen mit dem Panx2-Antikörper durchgeführt. Abbildung 3-54 I zeigt die charakteristische Triade eines Stäbchen-Spherules mit den kontaktierenden Horizontal- und Bipolarzelldendriten in der Nähe des synaptischen Bandes. Panx2-Markierungen wurden in den Axonen der Horizontalzellen beobachtet, die Stäbchen-Terminalien invaginierten. Die Signale waren in der Nähe der zytoplasmatischen Membran lokalisiert. Es wurden keine Panx2-Proteine in Gap-Junction-ähnlichen Strukturen beobachtet, wie es für Cx57 in Horizontalzellen beschrieben wurde (Janssen-Bienhold et al., 2009). Obwohl es in den Aufnahmen der isolierten Horizontalzellen so aussieht, als sei Panx2 in den Dendriten lokalisiert (Abbildung 3-54 A und B), konnten in ultrastrukturellen Analysen keine Markierungen in den Dendriten innerhalb von Zapfen-Pedikeln beobachtet werden. Da Zapfen in der Maus-Retina jedoch nur 3% der Photorezeptoren ausmachen (Jeon et al., 1998), ist die Anzahl der beobachteten Zapfen-Pedikel vergleichsweise gering, so dass keine eindeutige Aussage über die Panx2-Lokalisation in Dendriten der Horizontalzellen gemacht werden kann.



Abbildung 3-54. Panx2-Lokalisation in Horizontalzellen der Maus. Die Panx2-Immunoreaktivität (grün) in Calbindin-gefärbten (magenta) Horizontalzellen bestätigte die Expression von Panx2-Proteinen in Horizontalzellen. In Calbindin-gefärbten dissoziierten Horizontalzellen (A, D) wurde Panx2-Immunoreaktivität in den Somata durch weiße Kolokalisation beobachtet (C, F). In Horizontalzell-Fortsätzen zeigten sich Panx2-Signale in den Dendriten (B, C) und im gesamten Axon (E, F). In vertikalen Kryoschnitten wurden nur vereinzelte Panx2-Signale (grün) in den Calbindin-markierten (magenta) Zellkörpern gefunden (Pfeilköpfe). Neben Horizontalzell-Terminalien waren deutliche Panx2-Signale zu sehen (G, H). Elektronenmikroskopische Untersuchungen tangentialer Retinaschnitte mit einem Panx2-Antikörper zeigten Immunoreaktivität in Axonen der Horizontalzellen innerhalb der Stäbchen-Spherules (langer Pfeil). Die Markierungen befanden sich in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran (I). Der Stern markiert ein zweites Horizontalzell-Axon, das in das Stäbchen-Spherule invaginiert. Der kurze Pfeil zeigt auf das synaptische Band des Stäbchens. Maßstab: 10 µm in A, B und D; 20 µm in C; 500 nm in E. A-D: Projektionen konfokaler Einzelscans; GCL = Ganglienzellschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; INL = innere Kernschicht; OPL = äußere plexiforme Schicht. (Elektronenmikroskopie in Zusammenarbeit mit Dr. Konrad Schultz; Bolte et al., in Ausarbeitung).

## 3.5.5 Lokalisation von Panx2 in Bipolarzellen

Hybridisierungen mit der Panx2-spezifischen RNA-Sonde zeigten eine deutliche Markierung der Bipolarzellen in der inneren Kernschicht (Abbildung 3-51 und Abbildung 3-52). Um die mRNA-Expression auf Protein-Ebene zu bestätigen, wurden immunhistochemische Analysen in der inneren Retina durchgeführt. Zur Untersuchung der Panx2-Expression in verschiedenen Bipolarzelltypen wurden Doppelmarkierungen mit Panx2 unterschiedliche und Markern gegen Bipolarzelltypen durchgeführt. Mit Antikörpern gegen die α-Untereinheit des G0-Proteins wurden die Membranen von ON-Zapfen-Bipolarzellen markiert (Haverkamp und Wässle, 2000b). Typ-3b-OFF-Bipolarzellen wurden durch PKARIIß und Typ-3a-OFF-Bipolarzellen durch HCN4-Antikörper detektiert (Mataruga et al., 2007). Zur Markierung der Typ-2- und Typ-6-Zapfen-Bipolarzellen wurden ZNP-1-Antikörper verwendet (Fox und Sanes, 2007; Hilgen et al., 2011). Panx2-Immunoreaktivität wurde ausschließlich in PKARIIß-markierten Typ-3b-OFF-Bipolarzellen beobachtet (Abbildung 3-55). In der inneren Retina wurden Panx2-Signale in einer punktuellen Verteilung in der inneren plexiformen Schicht und etwas schwächer in der inneren Kernschicht beobachtet (Abbildung 3-55 A). Der weiße Rahmen markiert einen Bereich der inneren Kernschicht, der in Abbildung 3-55 B vergrößert dargestellt ist. Panx2-Immunoreaktivität war sehr häufig auf PKARIIß-markierten Membranen rund um die Somata von Typ-3b-OFF-Bipolarzellen lokalisiert.



**Abbildung 3-55. Expression von Panx2 in Typ-3b-OFF-Bipolarzellen.** Der mit PKARIIβ-Antikörpern markierte Retina-Schnitt (A) zeigt Panx2-Signale (grün) in einer feinen Verteilung in der inneren und äußeren plexiformen Schicht. Die innere Kernschicht zeigte weniger Markierungen als die plexiformen Schichten (B, C). Der vergrößerte Bereich innerhalb des Rahmens in C zeigt Panx2-Immunoreaktivität in PKARIIβ-markierten (magenta) Membranen der Typ-3b-*OFF*-Bipolarzellen (**D-F**). Bei allen Abbildungen handelt es sich um einzelne Scans.

## 3.5.6 Lokalisation des Panx2-Proteins in Müllerzellen

Die Expression von Panx2-mRNA in Müllerzellen wurde durch RT-PCR-Analysen gezeigt (Abschnitt 3.5.1). Dissoziierte Retinazellen wurden mit dem Panx2-Antikörper und dem Müllerzell-spezifischen Antikörper Glutaminsynthetase angefärbt. Panx2-Immunoreaktivität wurde in Müllerzellen vorwiegend in der Nähe der Kerne beobachtet. Am Endfuß und am apikalen Ende der Müllerzelle war nur eine leichte Immunoreaktivität zu sehen (Abbildung 3-56). Die Detektion des Panx2-Proteins in isolierten Müllerzellen bestätigte die auf mRNA-Ebene gefundene Expression von Panx2. Die in dissoziierten Müllerzellen beobachtete Panx2-Immunoreaktivität konnte jedoch auf retinalen Gewebeschnitten nicht bestätigt werden. Doppelimmunmarkierungen von Panx2 und Glutaminsynthetase auf verikalen Retinaschnitten zeigten keine Kolokalisation.



Abbildung 3-56. Panx2-Expression in einer isolierten Müllerzelle. Dissoziierte Müllerzellen (A) wurden mit einen Calbindin-Antikörper in magenta (B) und Panx2 in grün (C) markiert. Deutliche Panx2-Immunoreaktivität wurde vorwiegend in der Nähe der Zellkörper beobachtet. Das apikale Ende und der Endfuß der Müllerzelle zeigten nur eine geringe Panx2-Immunoreaktivität. Projektion (C, D).

# 4 Diskussion

## 4.1 Analyse des Cx36-Kopplungspartners in Stäbchen

## 4.1.1 Keine Expression von Cx36 in Stäbchen

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Cx36 in Zapfen, jedoch nicht in Stäbchen zur Expression kommt. In der äußeren plexiformen Schicht zeigte sich Cx36-Immunoreaktivität rund um die und innerhalb der Zapfen-Pedikel sowie in den Telodendrien; in der äußeren Kernschicht war Cx36 in den Zellkörpern der Zapfen lokalisiert. Die Expression von Cx36 in Zapfen wird durch zahlreiche Studien in Maus-Retinen bestätigt: Cx36 wurde in Zapfen immunhistochemisch an Stäbchen-defizienten Retinen (Dang et al., 2004), mit Hilfe von Reportergen-Genexpression (Deans et al., 2004; Feigenspan et al., 2004), mit RT-PCR an Wildtyp-Mäusen (Feigenspan et al., 2004) sowie in Mäusen nachgewiesen, die ein Cx36-GFP-Fusionsprotein exprimierten (Feigenspan et al., 2004). Elektrophysiologisch wurde an Cx36-defizienten Mäusen gezeigt, dass Cx36 an der Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen beteiligt ist (Trümpler et al., 2008). Auch in Vögeln wurde Cx36 in Zapfen-Terminalien beobachtet (Kihara et al., 2009). In der Fischretina konnte Cx35 – ein Ortholog des Cx36-Proteins – ebenfalls in Zapfen identifiziert werden (O'Brien et al., 2004; Li et al., 2009).

Zu der Frage, ob Cx36 auch in Stäbchen exprimiert wird, gibt es in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. Die umfassendste Untersuchung hierzu wurde in unserer Arbeitsgruppe von Prof. Andreas Feigenspan durchgeführt (Feigenspan et al., 2004). Mittels RT-PCR identifizierten er und seine Kollegen Cx36-mRNA in Proben, die beide Photorezeptortypen enthielten, jedoch nicht in Proben, die ausschließlich Stäbchen beinhalteten. In transgenen Mäusen, die ein Fusionsprotein aus Cx36 und GFP exprimierten, wurden GFP-Signale in der gesamten äußeren Kernschicht beobachtet. Prof. Feigenspan schloss nicht völlig aus, dass Stäbchen ebenfalls Cx36 exprimieren, da die Verteilung der Cx36-GFP-Signale in der Kernschicht der Photorezeptoren zu dicht war, um ausschließlich in Zapfen generiert worden zu sein. In Mäusen, in denen die codierende Cx36-Gensequenz durch das Reportergen β-Galactosidase ersetzt wurde, zeigte sich β-Galactosidase-Aktivität in Zellkernen der Zapfen in der distalen Region der äußeren Kernschicht. Die innere Hälfte der nukleären Schicht, die ausschließlich Stäbchen enthält, zeigte keine Reportergen-Aktivität, was darauf hindeutete, dass Stäbchen Cx36 nicht exprimieren. In der Region der Innensegmente lagen die LacZ-Signale allerdings so

dicht, dass eine Expression von Cx36 in Stäbchen nicht ganz ausgeschlossen werden konnte (Feigenspan et al., 2004). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte in und postulierte eine Cx36-Expression in Zapfen und Stäbchen (Deans et al., 2002). Zu anderen Spezies gibt es ebenfalls widersprüchliche Daten bezüglich der Expression von Cx36 in Stäbchen. So wurde in Stäbchen des Tigersalamanders immunhistochemisch die Expression von Cx35, einem Cx36-Ortholog, nachgewiesen (Zhang und Wu, 2004), während ultrastrukturelle Untersuchungen der Meerschweinchen-Retina Cx36-Markierungen ausschließlich in Zapfen zeigten (Lee et al., 2003).

Die Frage, ob Cx36 in Stäbchen der Maus exprimiert wird, konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal eindeutig beantwortet werden. Markierungen lateral und distal der Zapfen-Terminalien lagen in dem Bereich, in dem Telodendrien benachbarte Photorezeptoren kontaktieren. Eine Lokalisaton von Cx36 in Telodendrien, die keinen benachbarten Zapfen kontaktierten, zeigte putative Gap Junctions zwischen Stäbchen und Zapfen. Im Bereich der Stäbchen-Spherules, die lateral und distal der Pedikel lagen, fanden sich nur sehr wenige Cx36-Signale. Dies war zunächst ein Beleg dafür, dass Gap Junctions zwischen Stäbchen nicht aus Cx36 aufgebaut sind. In der äußeren Kernschicht wurden Cx36-Signale nahezu ausschließlich in Zapfen beobachtet. In früheren Studien wurden Cx36-Markierungen in der äußeren Kernschicht als Cx36-Vesikel interpretiert, die vom Proteinsynthese-Apparat der Innensegmente zu den Terminalien der Zapfen transportiert werden (Feigenspan et al., 2004). Da die Maus-Retina zu nur 3% aus Zapfen besteht (Carter-Dawson und LaVail, 1979; Jeon et al., 1998), würde man bei einer Expression von Cx36 in Stäbchen ein stärkeres Signal zwischen den Zapfen der äußeren Kernschicht erwarten. Im Gegensatz dazu wurden in transgenen Cx36-GFP-Mäusen eine dichte Verteilung der GFP-Signale in der gesamten äußeren Kernschicht beobachtet (Feigenspan et al., 2004). Möglicherweise waren die in dieser Arbeit verwendeten Cx36-Antikörper nicht empfindlich genug, um alle Cx36-Signale zu detektieren. Um eindeutig zu zeigen, dass Cx36 im Gap-Junction-Kanal zwischen Stäbchen und Zapfen nur in den Membranen der Zapfen lokalisiert ist, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Cx36-Markierungen fanden sich in der äußeren plexiformen Schicht ausschließlich in Zapfen-Pedikeln und nie in Stäbchen-Spherules. In einem Gap-Junction-Kanal zwischen einem Zapfen-Telodendrium und einem Stäbchen war Cx36-Immunoreaktivität ausschließlich in der Membran des Zapfens lokalisiert. Dieses

Diskussion

Ergebnis entsprach ultrastrukturellen Daten der Meerschweinchen-Retina, die Cx36-Markierungen in Gap Junctions zwischen Stäbchen und Zapfen ausschließlich in der Zapfenmembran nachwiesen (Lee et al., 2003). 3'RACE-Nested-PCRs zeigten, dass in Photorezeptoren und in der Retina keine Cx36-Spleißvariante mit einem alternativen 3'-Terminus exprimiert wird. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass ein alternatives Cx36-Spleißprodukt in Stäbchen vorkommt, das von dem verwendeten Antikörper nicht erkannt wurde. Es wurde keine 5'RACE-PCR durchgeführt, die eine 5'-Spleißvariante von Cx36 in der Retina ausschließen kann. Selbst wenn jedoch eine Sequenz mit einem alternativen N-Terminus in Stäbchen zur Expression käme, hätte diese ebenfalls von dem C-terminalen Antikörper detektiert werden müssen, da in allen retinalen Cx36-Seguenzen die Antikörperbindestelle exprimiert wurde.

#### 4.1.2 Keine Expression bekannter Connexine in Stäbchen

Nachdem die Expression von Cx36 in Stäbchen weitgehend ausgeschlossen werden konnte, wurden alle bekannten Connexine auf ihre Expression in Photorezeptoren untersucht. Durch Nested-RT-PCR-Analysen wurden neben Cx36 Transkripte der Maus-Connexine Cx32, Cx43, Cx45, Cx50 und Cx57 in Photorezeptoren nachgewiesen. Dass ein in Stäbchen exprimiertes Connexin durch Nested-RT-PCR nicht amplifiziert werden konnte, ist unwahrscheinlich. Photorezeptoren bestehen nur zu 3% aus Zapfen und zu 97% aus Stäbchen (Jeon et al., 1998). Da Cx36 mittels RT-PCR in Zapfen nachgewiesen werden konnte, müsste ein in Stäbchen exprimiertes Connexin mit dieser Methode problemlos zu identifizieren sein. Für Cx30.2 gilt dies allerdings nur eingeschränkt. RT-PCR-Analysen mit Cx30.2-Primern zeigten, dass in der Maus-Retina eine alternativ gespleißte Isoform vorliegt, die durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen schwer zu amplifizieren ist. Die PCR-Bedingungen, die unter Verwendung spezieller Zusatzreagenzien eine Amplifikation auf Retina, Hirn und Herz ermöglichten, waren möglicherweise nicht sensitiv genug, um eine Amplifikation auf Photorezeptoren zu gewährleisten. Eine Expression von Cx30.2 in Photorezeptoren kann daher trotz negativer PCR-Ergebnisse nicht vollständig ausgeschlossen werden. Sobald ein Cx30.2-Antikörper zur Verfügung steht, sollten deshalb immunhistochemische Untersuchungen vorgenommen werden, die einen eindeutigen Rückschluss auf eine Cx30.2-Expression in Stäbchen geben können. Allerdings zeigten Expressionsmuster einer Cx30.2-LacZ-Reportergen-Maus ausschließlich Markierungen in der inneren Kernschicht und den Ganglienzellen (Müller *et al.*, 2010), was eine Expression von Cx30.2 unwahrscheinlich macht. Cx30.2 war das einzige Connexin, das möglicherweise nicht mittels *RT-PCR* in

sehr geringen *Template*-Mengen keine Probleme bei der Amplifikation. Die Expression der mittels RT-PCR in Photorezeptoren detektierten Connexine wurde immunhistochemisch auf Protein-Ebene überprüft. Cx32-Immunoreaktivität konnte in der Leber, nicht jedoch in retinalem Gewebe von 129/Sv- oder C57BL/6-Mäusen beobachtet werden. Die gleichen Ergebnisse zeigten Studien mit Cx32-Antikörpern in Ratten- und Goldfischretina (Ball und Reynolds, 1998). In der Maus-Retina wurde ebenfalls Cx32-mRNA, jedoch kein Cx32-Protein nachgewiesen (Söhl et al., 2000; Güldenagel et al., 2000). Die Autoren spekulierten, dass Cx32-mRNA in der Retina nicht in Proteine translatiert wird. Cx43-Proteine konnten ebenfalls nicht in Photorezeptoren nachgewiesen werden. In 129/Sv- und C57BL/6-Mäusen zeigte sich eine Cx43-Markierung ausschließlich im Bereich der Ganglienzellschicht und im Pigmentepithel. Ähnliche Studien in Maus-Retinen bestätigten die Lokalisation von Cx43 in der Ganglienzellschicht und in der Nervenfaserschicht und beobachteten ebenfalls keine Immunoreaktivität in der äußeren plexiformen Schicht (Güldenagel et al., 2000; Kihara et al., 2006). Cx43 wurde außerdem in Müllerzellen von Kaninchen (Johansson et al., 1999), Ratte (Zahs et al., 2003) und Maus (Kihara et al., 2006) identifiziert. Da die äußere Kernschicht neben Photorezeptoren auch Fortsätze der Müllerzellen enthält, ist es möglich, dass einige Photorezeptor-Proben zusätzlich Müllerzell-mRNA enthielten, die der Cx43-Amplifikation zugrunde lag. Cx50-Immunoreaktivität wurde in der distalen inneren Kernschicht im Bereich der Horizontalzell-Somata beobachtet. Die Markierungen befanden sich proximal der Stäbchen- und der Zapfen-Terminalien. Studien zu Cx50 in der Maus-Retina beschränken sich auf Daten, welche die retinale Expression von Cx50-mRNA zeigen (Güldenagel et al., 2000; Kihara et al., 2006). Da im Kaninchen gezeigt werden konnte, dass Cx50 in axonlosen A-Typ-Horizontalzellen exprimiert wird (O'Brien et al., 2006), liegt auch in der Maus möglicherweise eine Expression von Cx50 in Horizontalzellen vor. Allerdings besitzen Maus-Retinen ausschließlich axontragende B-Typ-Horizontalzellen (Peichl und Gonzalez-Soriano, 1994), deren Kopplung in einer Cx57-defizienten Maus komplett unterbrochen war (Hombach et al., 2004), so dass eine Kopplung zwischen Horizontalzellen wahrscheinlich ausschließlich über Cx57 vermittelt wird. Wo genau Cx50 in Horizontalzellen der Maus lokalisiert ist, wird momentan in unserer Arbeitsgruppe weiterverfolgt. Für das positive Ergebnis der RT-PCR mit Cx50-Primern war wahrscheinlich eine Kontamination Photorezeptor-

Photorezeptoren zu detektieren war. Alle anderen Connexine bereiteten auch auf

Proben mit Horizontalzell-mRNA verantwortlich, da bei der Isolierung der Photorezeptoren Stäbchen-kontaktierende Horizontalzell-Axone leicht in die Probe gelangen können. Immunhistochemische Untersuchungen von Cx57 zeigten die typische Markierungen der Gap-Junction-Kanäle zwischen Horizontalzell-Terminalien in den Photorezeptor-Synapsen (Janssen-Bienhold et al., 2009). Die Auflösung der konfokalen Mikroskopie war zu gering, um Signale in Horizontalzell-Terminalien von potentiellen Markierungen zwischen Stäbchen und Zapfen zu unterscheiden. Da Doppelimmunmarkierungen ergaben, dass Cx57 und Cx36 in der Retina nicht kolokalisiert vorliegen, kam auch Cx57 nicht als Kopplungspartner von Cx36 in Frage. Der Nachweis von Cx57-mRNA in Photorezeptoren erfolgte wie bei Cx50 wahrscheinlich durch eine Kontamination mit Horizontalzell-Axonen. Immunologische Untersuchungen mit einem Cx45-Antikörper zeigten in der äußeren plexiformen Schicht proximal deutliche Signale, während distal nur feine Markierungen zu sehen waren. Dieses Immunoreaktivitätmuster wurde bereits in der Maus-Retina beschrieben, wobei die proximalen Markierungen der äußeren plexiformen Schicht Gap Junctions zwischen OFF-Bipolarzellen in Zapfen-Terminalien zugeordnet werden konnten (Dedek et al., 2006; Hilgen et al., 2011). Die distalen Markierungen äußeren plexiformen Schicht könnten Gap Junctions in Stäbchender kontaktierenden OFF-Bipolarzellen (Haverkamp et al., 2008; Mataruga et al., 2007, Hilgen et al., 2011) oder zwischen Stäbchen und Zapfen zeigen. In der inneren plexiformen Schicht waren Markierungen der Gap Junctions zwischen Amakrin- und Bipolarzellen zu sehen, die aufseiten der Amakrinzellen aus Cx36 und aufseiten der Bipolarzellen aus Cx45 aufgebaut sind (Maxeiner et al., 2005; Dedek et al., 2006). Die Fähigkeit von Cx45, mit Cx36 heterotypische Gap Junctions auszubilden, und die Lokalisation im Bereich der Photorezeptor-Terminalien machten Cx45 zu einem interessanten potentiellen Koppungspartner von Cx36 in Stäbchen. Deshalb gab es bereits Studien anderer Arbeitsgruppen an Maus- und Kaninchen-Retinen, welche die Cx45-Expression in Stäbchen untersuchten. Diese Analysen (mündliche Aussage Prof. Stuart Mangel, Prof. John O'Brien) und Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe (Hilgen et al., 2011) deuten darauf hin, dass Cx45 mit Cx36 in der äußeren plexiformen Schicht keine heterotypischen Gap-Junction-Kanäle ausbildet. Allerdings wurde für diese Untersuchungen die C57BL/6-Mauslinie verwendet, für die eine Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen oft nur schwach (Trümpler et al., 2008) oder gar nicht (mündliche Aussage Prof. Botond Roska, RETICIRC Mid-term meeting Luzern 2010) nachgewiesen werden konnte. C57BL/6-Mäuse unterliegen keinem zirkadianen Rhythmus, der die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen

kontrolliert (Ribelayga et al., 2008, Li et al., 2009; Mangel und Ribelayga, 2010). Deshalb werden in C57BL/6-Mäusen möglicherweise weniger Gap-Junction-Kanäle zwischen Stäbchen und Zapfen ausgebildet, die immunhistochemisch schwer nachzuweisen sind. Untersuchungen zur Kolokalisation von Cx45 und Cx36 in der äußeren plexiformen Schicht wurden deshalb an 129/Sv-Mäusen durchgeführt, in denen elektrophysiologisch eine wesentlich stärkere Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen gemessen wurde als in C57BL/6-Mäusen (Trümpler et al., 2008). Auch immunhistochemische Analysen in 129/Sv-Mäusen zeigten jedoch keine Kolokalisation von Cx36 und Cx45 in der äußeren plexiformen Schicht. Dass es mit dieser Methode prinzipiell möglich ist, heterotypische Gap Junctions in der Retina zu identifizieren, zeigte die Kolokalisation von Cx36 und Cx45 in Gap-Junction-Kanälen zwischen Amakrin- und Bipolarzellen. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen bestätigen Studien mit einer transgenen Mauslinie, in der die codierende Region eines Allels für Cx45 durch ein LacZ-Reportergen ersetzt wurde. In der Retina dieser Mäuse wurden Reportergen-Signale in der inneren Kernschicht und in der Ganglienzellschicht, jedoch nicht in den Innensegmenten und Kernen der Photorezeptoren oder in der äußeren plexiformen Schicht beobachtet (Güldenagel et al., 2000). Transgene Mäuse, bei denen die codierende Cx45-Region beider Allele durch ein Reportergen ausgetauscht wurde, erwiesen sich als lethal (Krüger et al., 2000). Möglicherweise ist also eine heterozygote Expression nicht ausreichend, um das Reportergen in Photorezeptoren zu detektieren. Auch über die Frage, ob Gap-Junction-Kanäle zwischen Stäbchen und Zapfen immunhistochemisch mittels konfokaler Mikroskopie zu detektieren sind, gibt es kontroverse Ansichten. Gefrierbruchanalysen ergaben, dass mit konfokalen Analysen nur Gap Junctions nachgewiesen werden können, die mehr als fünfzig Connexone enthielten (Kamasawa et al., 2006). Einige Analysen lassen vermuten, dass Gap Junctions zwischen Zapfen von Vertebraten aus weniger als fünfzig Connexonen bestehen (Raviola und Gilula, 1975) und damit möglicherweise nicht detektierbar sind. Immunhistochemische Studien an Meerschweinchen zeigten jedoch in den Pedikel-Membranen dissoziierter Zapfen Cx36-Immunoreaktivität (Lee et al., 2003). Außerdem wurde im Zebrafisch das Cx36-Ortholog Cx35 zwischen Zapfen-Pedikeln und Telodendrien benachbarter Zapfen immunhistochemisch nachgewiesen (Li et al., 2009). Diese Studien zeigen, dass Gap Junctions zwischen Zapfen im Zebrafisch und im Meerschweinchen mit konfokaler Mikroskopie beobachtet werden konnten. Sollten Gap-Junction-Kanäle zwischen Stäbchen und Zapfen eine geringere Anzahl an Connexonen aufweisen, als die Gap Junctions zwischen Zapfen, sind sie durch konfokale Analysen möglicherweise nicht detektierbar. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Meerschweinchen zeigten allerdings keine größeren Cx36-Markierungen zwischen Zapfen als zwischen Stäbchen und Zapfen (Lee et al., 2003). Auch in Mäusen zeigten die Cx36-Plaques in Stäbchen-kontaktierenden Zapfen mit 200 bis 400 Nanometern eine ähnliche Größe wie Cx36-Markierungen zwischen Zapfen des Meerschweinchens (Lee et al., 2003). Konfokal aufgelöste Cx36-Immunoreaktivität zeigte im Bereich der Stäbchen-Terminalien und in Stäbchen-kontaktierenden Telodendrien von Mäusen vermutlich Gap-Junction-Kanäle zwischen Stäbchen und Zapfen. Im Meerschweinchen wurden Cx36-Signale lateral der Spherules ebenfalls als Gap Junctions zwischen Stäbchen und Zapfen interpretiert (Lee et al., 2003). Damit deuten einige Daten darauf hin, dass Connexone der Stäbchen immunologisch mit konfokaler Mikroskopie nachweisbar sind. Cx36-Immunoreaktivität zeigte sich nicht nur in Form von Gap Junctions im Bereich der Synapsen, sondern im Rahmen von Proteinsynthese und -transport in den Innensegmenten und in der äußeren Kernschicht der Photorezeptoren. Deshalb könnte ein in Stäbchen exprimiertes Connexin möglicherweise in diesen Bereichen nachgewiesen werden, selbst wenn es als Gap-Junction-Plaque nicht nachweisbar wäre. Durch eine geringe Größe und der damit verbundenen schwachen Expression kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das in Stäbchen exprimierte Connexin mit konfokaler Mikroskopie nicht nachgewiesen werden kann. Zudem ist die Nachweisbarkeit abhängig von der Qualität des Antikörpers und damit für jedes Connexin unterschiedlich. Um die Protein-Expression der mittels RT-PCR detektierten Connexine in Stäbchen vollständig ausschließen zu können, müssen elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. dies gilt insbesondere für Cx45.

#### 4.1.3 Stäbchen exprimieren Panx2, bilden aber keine Panx2-Gap-Junctions

Da zu Beginn der hier dargestellten Studien die Annahme bestand, dass die Pannexine *Gap-Junction*-Kanäle ausbilden (Bruzzone *et al.*, 2003), stellten die Mitglieder dieser Gen-Familie ebenfalls potentielle Kopplungspartner für Cx36 in Stäbchen dar. Um dies zu überprüfen, wurden die beiden im Nervengewebe exprimierten Pannexine Panx1 und Panx2 (Baranova *et al.*, 2004) auf ihre Expression in Photorezeptoren untersucht. Die mRNA-Expression von Panx1 wurde in Photorezeptoren der Maus bereits durch *RT-PCR* und *In-situ*-Hybridisierung gezeigt (Ray *et al.*, 2005) und konnte durch *RT-PCR*-Analysen auf Photorezeptor-

Proben bestätigt werden. Das Panx1-Protein konnte jedoch immunhistochemisch nicht in Photorezeptoren nachgewiesen werden. Panx1 wurde über eine Einzelzell-*PCR* zusätzlich auf Müllerzellen, Bipolarzellen und Horizontalzellen detektiert. Deshalb lag der Amplifikation von Panx1 in Photorezeptor-Proben möglicherweise eine Kontamination mit einem oder mehrerer dieser Zelltypen zugrunde. In vertikalen Retinaschnitten war Panx1-Immunoreaktivität weder in den Innensegmenten noch in der äußeren Kernschicht zu sehen. Die Immunoreaktivität in der äußeren plexiformen Schicht konnte auf eine Expression in Bipolarzellen und Horizontalzellen zurückgeführt werden (Schmidt *et al.*, in Ausarbeitung). Auch in früheren Studien konnte Panx1 immunhistochemisch in Ganglienzellen, Amakrinzellen und Horizontalzellen und Horizontalzellen, jedoch nicht in Photorezeptoren der Maus-Retina lokalisiert werden (Dvoriantchikova *et al.*, 2006).

Panx2 wurde auf mRNA-Ebene und auf Protein-Ebene in Photorezeptoren Immunhistochemisch identifiziert. wurden Panx2-Proteine in Photorezeptor-Terminalien im Bereich der Gap Junctions zwischen Stäbchen und Zapfen beobachtet. Die einzige Studie zur Panx2-Expression in der Retina bestätigt die mRNA-Expression in Photorezeptoren (Dvoriantchikova et al., 2006). Doppelimmunmarkierungen mit Panx2- und Cx36-Antikörpern zeigten keine Kolokalisation, was gegen eine Ausbildung gemeinsamer Gap-Junction-Kanäle dieser beiden Proteine spricht. Zusätzlich zeigten funktionelle Expressionsstudien, dass Panx2 nicht in der Lage ist, funktionelle Gap-Junction-Kanäle auszubilden. In HeLa-Zellen und N2A-Neuroblastom-Zellen konnte Panx2 weder allein noch zusammen mit Cx36 interzelluläre Kanäle ausbilden. Dieses Ergebnis wurde durch Studien mit verschiedenen Säugerzelllinien unterstützt. Diese ergaben, dass Panx2 keine funktionellen Gap-Junction-Kanäle in MDCK- (Ambrosi et al., 2009), N2A- (Swayne et al., 2010), NRK- und HEK-293T-Zellen (Penuela et al., 2009) ausbildet. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten diese Studien auch im retinalen Gewebe. Panx2 wurde in den Plasmamembranen der Photorezeptoren beobachtet, bildete dort aber keine Gap-Junction-ähnlichen Strukturen aus. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch Studien, die belegen, dass Pannexine als Glykoproteine vorliegen (Penuela et al., 2007; Boassa et al., 2007; Boassa et al., 2008; Penuela et al., 2009) und deshalb wahrscheinlich keine interzellulären Gap-Junction-Kanäle ausbilden.

#### 4.1.4 Kein unbekanntes Connexin in Stäbchen

Da Pannexine keine *Gap-Junction-*Kanäle in Photorezeptoren ausbildeten und keines der bekannten Connexine in Photorezeptoren identifiziert werden konnte, wurden Photorezeptoren auf die Expression unbekannter Connexinsequenzen untersucht. Hierzu wurden in einer *Nested-RT-PCR* degenerierte *Primer* eingesetzt, die mit konservierten Sequenzen aller bekannten Maus-Connexine hybridisierten. Da alle Connexine ähnliche konservierte Sequenzen enthalten, bestand mit dieser Methode die Möglichkeit, sowohl bekannte, als auch unbekannte Sequenzen zu detektieren. Mit degenerierten *Primern* wurden zum Beispiel Cx31.1, Cx33, Cx37 und Cx40 als neue Mitglieder der Connexin-Genfamilie identifiziert (Haefliger *et al.*, 1992). Diese Methode ermöglichte auch die Amplifikation unbekannter Connexine und alternativer Spleißprodukte, wie sie bereits für Cx23, Cx30, Cx32, Cx36, Cx39, Cx45 und Cx57 beschrieben wurden (Neuhaus *et al.*, 1995; Söhl *et al.*, 1996; Söhl und Willecke, 2003).

Mit degenerierten *Primern* wurden die Connexine Cx57 und Cx31 in Photorezeptoren nachgewiesen. Da Cx31 in Form der humanen Sequenz identifiziert wurde, handelte es sich um eine Kontamination mit menschlicher DNA, die wahrscheinlich durch Hautschuppen erfolgt war. Die Amplifikation der menschlichen Cx31-Variante bewies, dass mit der angewandten Methode schon mit sehr geringen DNA-Mengen ein Connexin-Gen vervielfältigt werden kann, das sich in seiner Sequenz von den bekannten Mausgenen unterscheidet. Trotzdem konnten unter verschiedenen Stringenz-Bedingungen und der Verwendung unterschiedlicher *Primer* keine weiteren unbekannten Sequenzen identifiziert werden.

Die 3'*RACE-PCR* stellte einen weiteren Ansatz dar, unbekannte Connexinsequenzen zu detektieren. Die Spezifität ist in der *RACE-PCR* durch die Verwendung nur eines degenerierten Connexin-*Primers* zusammen mit einem 3'-Anker-*Primer* stark herabgesetzt. Mit dieser Methode wurden zahlreiche unterschiedliche Gene amplifiziert, von denen aber keines homologe Sequenzen zu den Connexin-Genen aufwies.

*RT-PCR*-Analysen mit degenerierten *Primern* ermöglichen zwar theoretisch die Identifikation unbekannter Connexinsequenzen, die Versuchsbedingungen konnten jedoch nicht anhand einer einzigen Connexinsequenz optimiert werden. Bei der Auswahl der *Primer* und der Versuchsbedingungen musste ein Kompromiss zwischen verschiedenen Connexinsequenzen gefunden werden, so dass diese Methode keine Garantie dafür bietet, jedes in Stäbchen exprimierte Connexin zu detektieren. Eine schwer zu amplifizierende Sequenz, die wie Cx30.2 Sekundärstrukturen ausbildet, wäre über diese Methode nicht nachweisbar.

#### 4.1.5 Ein unbekanntes Protein als Partner für Cx36 in Stäbchen?

In Form der Connexin- und der Pannexin-Genfamilie wurden alle bekannten *Gap-Junction*-Proteine auf ihre Expression in Photorezeptoren untersucht. Abgesehen von Cx30.2 waren die hier verwendeten *RT-PCR*-Analysen und immunhistochemischen Experimente sensitiv genug, um ein in Stäbchen exprimiertes *Gap-Junction*-Protein zu detektieren. Trotzdem ist es bisher weder im Rahmen dieser Arbeit noch in anderen Arbeitsgruppen (mündliche Aussagen Prof. Stuart Mangel, Prof. John O'Brien, Prof. Stephen Massey; Dr. Hongyan Li) gelungen, den Kopplungspartner zu Cx36 in Stäbchen zu identifizieren. Friso Postma berichtete 2010 auf der ARVO-Konferenz, dass er und seine Kollegen *RT-PCR*s mit Transkripten aus einzelnen Stäbchen und Zapfen durchführten. Während sie mit diesen Experimenten Cx36 in Zapfen nachweisen konnten, war in Stäbchen weder Cx36 noch irgendein anderes Connexin zu detektieren.

Wie bereits diskutiert wurde, kann es sich bei dem gesuchten Protein um eine Connexin-Spleißvariante handeln, obwohl keine alternative Connexinsequenz mit degenerierten *Primern* amplifiziert werden konnte. Wenn die Sequenz eines Connexins dergestalt in Stäbchen vorliegt, dass sich die *PCR-Primer* bzw. Antikörper nicht mehr anlagern können, würde das erklären, warum das Stäbchen-Connexin bisher nicht nachweisbar war. Ein solcher Umstand erschwerte zum Beispiel die Identifikation von Cx57 in Horizontalzellen (Aussage apl. Prof. Ulrike Janssen Bienhold). Die retinale Cx57-Sequenz besitzt durch funktionelles Spleißen einen alternativen C-Terminus, der sich von der ursprünglich publizierten Cx57-Sequenz (Manthey *et al.*, 2004) in 25 Aminosäuren unterscheidet (Hombach *et al.*, 2004). Erst nach der Aufklärung der retinalen Spleißvariante war es möglich, Cx57 mit einem Antikörper gegen die retinale Cx57-Sequenz in Horizontalzellen zu detektieren (Janssen-Bienhold *et al.*, 2009).

Die Expression eines völlig unbekannten Connexins in den Stäbchen der Maus ist kaum anzunehmen, da im Mausgenom wahrscheinlich bereits alle Connexine durch Sequenzanalysen identifiziert wurden (Söhl und Willecke, 2003; Cruciani und Mikalsen, 2006). Denkbar wäre jedoch, dass ein Mitglied einer bisher unbekannten *Gap-Junction*-Proteinfamilie an der Ausbildung des gesuchten *Gap-Junction*-Kanals beteiligt ist. Es wurde spekuliert, dass eine noch nicht identifizierte Familie von *Gap*-

*Junction*-Proteinen existiert (Litvin *et al.*, 2006; Shestopalov und Panchin, 2008). Sequenzanalysen zeigten, dass die Genome verschiedener Tierstämme weder Connexin- noch Pannexinsequenzen besitzen, obwohl *Gap-Junction*-Kanäle in diesen Tieren ausgebildet werden (Yazaki *et al.*, 1999; Mire *et al.*, 2000). Es könnte eine weitere Familie von Proteinen existieren, die z.B. in Schwämmen, Echinodermaten und vielleicht auch in Wirbeltieren *Gap-Junction*-Kanäle ausbilden (Litvin *et al.*, 2006; Shestopalov und Panchin, 2008).

#### 4.2 Subzelluläre Lokalisation von Panx2 in der Maus-Retina

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte subzelluläre Expression von Panx2 in der Maus-Retina weist auf eine Beteiligung von Panx2 an der retinalen Signalverarbeitung hin. Die Expressionsanalyse von Panx2 war ursprünglich nicht in der Zielsetzung dieser Arbeit vorgesehen; im Rahmen der Suche nach dem Kopplungspartner von Cx36 in Stäbchen-Terminalien wurde jedoch die Expression von Panx2 in den Synapsen der Photorezeptoren beobachtet. Da es keine Studien über die Lokalisation von Panx2-Proteinen in der Retina gab und die Funktion von Panx2 weitgehend unbekannt war, wurde der Frage nachgegangen, an welcher Stelle dieses Protein in der Maus-Retina lokalisiert ist und welche Rolle es dort spielen könnte.

Bisher verfügbare Studien zur Panx2-Expression in der Retina beschränken sich auf eine grobe Lokalisation der mRNA. *In-situ-*Hybridisierungen zeigten über die gesamte Retina verteilte Panx2-Transkripte mit Akkumulation in den Ganglienzellen (Dvoriantchikova *et al.*, 2006). Vergleichbare Studien mit RNA-Sonden in der vorliegenden Arbeit stimmten mit diesen Daten überein. Zusätzlich zu *In-situ-*Hybridisierungsergebnissen, in denen die Markierungen nur einzelnen Schichten und meist keinem spezifischen Zelltyp zugeordnet werden konnten, wurde die mRNA mittels *RT-PCR* in einzelnen Zelltypen wie Photorezeptoren, Horizontalzellen, Müllerzellen und Bipolarzellen detektiert.

Die Expression von Panx1-Proteinen wurde immunhistochemisch in Ganglienzellen, Amakrinzellen und Horizontalzellen der Maus-Retina gezeigt (Dvoriantchikova *et al.*, 2006). Über die Lokalisation von Panx2-Proteinen in der Retina von Wirbeltieren gab es bisher keine Daten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation von Panx2-Proteinen in Photorezeptoren, Horizontalzellen und Bipolarzellen dargestellt. Immunhistochemische Doppelmarkierungen mit einem neu generierten Antikörper zeigten Panx2-Immunoreaktivität direkt neben *Calbindin*-gefärbten Horizontalzellfortsätzen und innerhalb der *PSD95*-gefärbten Photorezeptor-Terminalien. Immunologische Untersuchungen an dissoziierten Retinazellen ergaben ebenfalls Panx2-Markierungen in diesen beiden Zelltypen. Ultrastrukturell wurden Panx2-Proteine präsynaptisch in den Plasmamembranen von Zapfen-Pedikeln und Stäbchen-Spherules sowie postsynaptisch in Horizontalzellaxonen beobachtet. Ob die Panx2-Proteine in den Horizontalzellfortsätzen in der Plasmamembran oder in zytoplasmatischen Kompartimenten vorliegen, konnte nicht festgestellt werden. Bedingt durch die Schnittebene wurden möglicherweise nur die Bereiche der Fortsätze erfasst, in denen sich die Panx2-Proteine im Transport an die Plasmamembran befanden. Panx2-Proteine wurden jedoch meist in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran beobachtet. Eine Lokalisation in Horizontalzellen zeigten Panx1-Proteine in Zebrafischen und Mäusen (Dvoriantchikova et al., 2006; Prochnow et al., 2009). In Zebrafischretinen waren die Signale jedoch nicht in den Axonen, sondern in den Dendriten der Horizontalzellen lokalisiert (Prochnow et al., 2009).

Durch Immunhistochemie an dissoziierten Retinazellen und an Retinaschnitten konnten Panx2-Proteine in Bipolarzellen nachgewiesen werden. Doppelimmunmarkierungen zeigten eine Panx2-Expression in Typ-3b-OFF-Bipolarzellen. Die Expression von Panx2 in weiteren Bipolarzell-Typen konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, da nicht alle Bipolarzelltypen getestet wurden. Der immunologische Nachweis von Panx2 in Müllerzellen gelang nur auf dissoziierten Zellen und konnte auf retinalem Gewebe nicht bestätigt werden. Die Detektion des Panx2-Proteins an isolierten Müllerzellen bestätigte zwar die auf mRNA-Ebene gefundene Expression von Panx2. Da jedoch nie ein dissoziierter Zelltyp beobachtet wurde, der sich nicht mit dem Panx2-Antikörper markieren ließ, ist der Nachweis von Panx2 auf dissoziierten Müllerzellen nicht ausreichend, um auf eine Panx2-Expression in diesen Zellen schließen zu können. Dissoziierte Zellen können möglicherweise aufgrund ihrer Oberflächenbeschaffenheit immunologisch markiert werden, ohne das Protein zu exprimieren. Die mRNA-Expression von Panx2 konnte also nur in Photorezeptoren, Horizontalzellen und Bipolarzellen eindeutig auf Protein-Ebene bestätigt werden.

Voraussetzung für die Glaubwürdigkeit der immunhistochemischen Daten ist die Spezifität des verwendeten Antikörpers für Panx2-Proteine in der Retina. In dieser Arbeit wurde in immunzytochemischen Untersuchungen und in *Western-Blot*-Analysen gezeigt, dass der Antikörper das Panx2-Protein in transfizierten HeLa-

Zellen detektiert. Im Western-Blot retinaler Proteine markierte der Panx2-Antikörper in der Membranfraktion eine deutliche Proteinbande mit dem für Panx2-Proteine erwarteten Molekulargewicht. Durch die Markierung von zwei weiteren schwachen Banden in der zytoplasmatischen und der Membranfraktion kann eine leichte unspezifische Markierung in der Maus-Retina nicht ganz ausgeschlossen werden. Der Antikörper markierte im Western-Blot transfizierter HeLa-Zellen Proteine mit einem Molekulargewicht von ~86 kDa, während er in der Retina ~73 kDa umfassende Proteine detektierte. In Abhängigkeit vom Gewebe und Zellentwicklung wurden bereits Panx2-Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten gezeigt. So wurde in der Cochlea von Maus und Ratte mit einem Panx2-Antikörper ein Protein mit ~110 kDa detektiert, während im Western-Blot des Gehirns dieser Tiere ein ~62 kDa umfassendes Protein markiert wurde (Wang et al., 2009). In reifen Neuronen von Mäusen wurde ein Panx2-Protein mit einer Größe von ~60 kDa detektiert, in neuronalen Vorläuferzellen zeigte der Western-Blot eine Bande von ~85 kDa. Als posttranslationale Modifikationen besitzt Panx2 putative Sequenzen für Phosphorylierung, Sumovlierung, N-Glykosylierung und Palmitovlierung. Phosphorylierung und Sumoylierung, sowie alternatives Spleißen konnten als Ursache für die unterschiedlichen Molekurargewichte von Panx2 ausgeschlossen werden. Das in neuronalen Vorläuferzellen beobachtete Molekulargewicht von ~85 kDa reduzierte sich jedoch durch Depalmitoylierung um etwa ~35 kDa (Swayne et al., 2010). Eine Glykosylierung von Panx2 in einer mannosereichen Form konnte zwar gezeigt werden, eine Deglykosylierung führte jedoch nur zu einem sehr geringen Unterschied des Molekulargewichtes (Penuela et al., 2009; Swayne et al., 2010). die palmitoylierte Panx2-Form mit ~85 kDa annähernd das Da Molekulargewicht von Panx2 in transfizierten HeLa-Zellen zeigte, lag das Protein in diesem Expressionssystem möglicherweise palmitoyliert und in der Retina unpalmitoyliert vor. Um dies zu überprüfen, könnten Proteine aus Panx2exprimierenden HeLa-Zellen und aus der Retina durch Hydroxylamin depalmitoyliert Western-Blot untersucht werden. Dass unter dem Einsatz von im und Präimmunserum und der Verwendung präadsorbierter Panx2-Antikörper keine Proteine detektiert wurden, bestätigt den spezifischen Nachweis von 73 kDa-Proteinen durch den Panx2-Antikörper. Da der Antikörper Panx2-Proteine in transfizierten Zellen erkannte und in retinalen Proteinen eine spezifische Membran-Proteinbande mit dem für Panx2 erwarteten Molekulargewicht detektierte, markiert er in der Retina wahrscheinlich spezifisch Panx2-Proteine. Als absoluter Beweis, dass es sich bei diesem Protein um Panx2 handelt, müsste jedoch gezeigt werden, dass

der Panx2-Antikörper keine Proteine in einer Panx2-defizienten Retina markiert. Dieser Nachweis konnte nicht erbracht werden. Zwar wurde eine Panx2-defiziente Maus von der Arbeitsgruppe um Hannah Monyer von der Universitätsklinik Heidelberg zur Verfügung gestellt. Bisherige Analysen deuten jedoch darauf hin, dass diese Maus-Linie nicht Panx2-defizient ist, sondern in der Lage ist, Panx2-Proteine zu exprimieren.

#### 4.2.1 Plasmamembrankanäle aus Panx2 in Photorezeptoren

Panx1 und Panx3 weisen eine N-Glykosylierung in einer der extrazellulären Schleifen auf, die eine Ausbildung von Gap-Junction-Kanälen unwahrscheinlich macht. Das Vorliegen von Panx1 und Panx3 in Form von Glykoproteinen wurde zunächst in transfizierten Zellinien gezeigt und für zahlreiche Gewebe der Maus bestätigt (Penuela et al., 2007; Boassa et al., 2007; Boassa et al., 2008). Panx2 besitzt keine komplexen Glykoproteinstrukturen wie Panx1 und Panx3, sondern ist nur in einer mannosereichen Form glykosyliert (Penuela et al., 2009). Im Gegensatz zu Panx1 und Panx3 konnte eine Glykosylierung der Panx2-Proteine im Gewebe noch nicht nachgewiesen werden. Deshalb wird spekuliert, ob Panx2 im Gegensatz zu den anderen beiden Pannexinen in der Lage ist, Gap-Junction-Kanäle auszubilden (Ambrosi et al., 2010). Außerdem wurde kürzlich gezeigt, dass Panx3 in Osteoblasten sowohl Plasmamembran-Kanäle als auch Gap-Junction-Kanäle ausbildet (Ishikawa et al., 2011). Humanes PANX1 bildete bei Expression in Säugerzellen kalziumdurchlässige Gap-Junction-Kanäle zwischen LNCaP-Zellen (Vanden-Abeele et al., 2006). Möglicherweise können Pannexine sowohl in einer glykosylierten als auch in einer unglykosylierten Form funktionell sein.

In transfizierten HeLa- und N2A-Zellen war Panx2 weder allein, noch zusammen mit Panx1 in der Lage, funktionelle *Gap-Junction-Kanäle* auszubilden. Expressionsstudien in anderen Zellinien erbrachten das gleiche Ergebnis (Lai *et al.*, 2009; Penuela *et al.*, 2009; Ambrosi *et al.*, 2010). Es konnte bislang jedoch nicht gezeigt werden, ob Panx2 im Gewebe Kanäle in den Plasmamembranen ausbildet. Die ultrastrukturellen Analysen in der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Panx2 in Photorezeptoren Plasmamembran-Kanäle, jedoch keine *Gap Junctions* ausbildet. In Stäbchen-*Spherules* und in Zapfen-Pedikeln waren Panx2-Markierungen stets nur in einer Membran lokalisiert. In Horizontalzellen wurde Panx2 im Bereich gegenüberliegender Membranen ebenfalls nie in *Gap-Junction-*ähnlichen Strukturen gefunden, wie es zum Beispiel für Cx57 in Horizontalzellen gezeigt wurde (Janssen-Bienhold *et al.*, 2009).

#### 4.2.2 Keine heteromeren Kanäle aus Panx2 und Panx1

Studien, die darauf hinweisen, dass Panx2 zusammen mit Panx1 heteromere Kanäle ausbilden könnte (Bruzzone *et al.*, 2003; Penuela *et al.*, 2009), wurden für die Retina nicht bestätigt. Panx1 und Panx2 lagen in der Retina, ähnlich wie in der Cochlea (Wang *et al.*, 2009), oft nicht in denselben Zelltypen vor. In der Retina war Panx2, nicht jedoch Panx1, in Photorezeptoren und 3b-*OFF*-Bipolarzellen exprimiert. Panx1-Expression wurde dagegen in 3a-*OFF*-Bipolarzellen beobachtet (Schmidt *et al.*, in Ausarbeitung), die keine Panx2-Proteine exprimierten. Die Expression in unterschiedlichen Zelltypen deutet darauf hin, dass Panx2 in der Retina eine von Panx1 unabhängige Funktion besitzt.

In Expressionsstudien mit N2A- und HeLa-Zellen zeigte sich ebenfalls keine Kolokalisation von Panx1 und Panx2. Die gleichen Ergebnisse wurden bei einer Koexpression der beiden Pannexine in C6-Glioma-Zellen beobachtet (Lai et al., 2009). Zusammen mit Daten. die homomere Panx2-Kanäle in der Zytoplasmamembran von Xenopus-Oozyten zeigten (Ambrosi et al., 2010), deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Panx2-Proteine unabhängig von Panx1 Membrankanäle ausbilden. Bei Koexpression waren Panx1 und Panx2 zwar in der Lage, heteromere Kanäle zu bilden, diese Kanäle waren jedoch instabil und zerfielen nach einigen Stunden. Außerdem wiesen diese Studien darauf hin, dass Panx2-Kanäle als Octamere und nicht wie Panx1 hexamere Kanäle in der Plasmamembran vorliegen (Ambrosi et al., 2010).

#### 4.2.3 Panx2 in Plasmamembran und endoplasmatischem Retikulum?

Zusammen mit den in der Literatur verfügbaren Daten weisen die Studien in der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass Panx2 sowohl eine Funktion in der Plasmamembran als auch in zytoplasmatischen Kompartimenten besitzen könnte. In den hier dargestellten Expressionsstudien wurde Panx2 im Gegensatz zu Panx1 bei einer Expression in HeLa- und N2A-Zellen nicht in die Plasmamembran eingebaut. Panx2 wurde mit und ohne GFP-Anhang, bei unterschiedlich langen Transfektionszeiten, verschiedenen extrazellulären Kalzium-Konzentrationen, mit und ohne Panx1 und unter Verwendung unterschiedlicher Transfektionsreagenzien zur Expression gebracht. Die Proteine wurden jedoch unter allen Bedingungen

ausschließlich in zytoplasmatischen Kompartimenten beobachtet. In der Literatur bestätigen Studien in weiteren Zelllinien dieses Ergebnis: Im Gegensatz zu Panx1und Panx3-Proteinen, die nach Expression in der Zytoplasmamembran lokalisiert vorlagen, wurde Panx2 bei einer Expression in C6-Glioma-Zellen (Lai et al., 2009), NRK-Osteoblastenzellen und HEK-293-T-Zellen (Penuela et al., 2009) ausschließlich in zytoplasmatischen Kompartimenten beobachtet. Es wurde hypothetisiert, dass Pannexine in der Plasmamembran von kultivierten Zellen immunologisch schwer zu detektieren sind, da sie nicht in Plagues, sondern in Form einer feinen Verteilung auf der Plasmamembran vorkommen können (Huang et al., 2007). Um auszuschließen, dass Panx2 Kanäle ausbildet, die immunlogisch nicht zu lokalisieren sind, wurden Panx2 exprimierende HeLa- und N2A-Zellen mittels Patch-Clamp-Ableitungen untersucht. Elektrophysiologisch wurde gezeigt, dass Panx2 in HeLa- und N2A-Zellen weder funktionelle Kanäle zwischen dem Zytoplasma und dem Extrazellulärraum, noch Gap-Junction-Kanäle ausbildet. Dies war bei Koexpression mit Panx1 oder Cx36, unterschiedlich langen Transfektionszeiten, sowie unter Verwendung verschiedener Transfektionsreagenzien der Fall. Bedingungen, unter denen sich Panx1-Kanäle öffnen, wie eine erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentration (Bao et al., 2004) und eine erhöhte extrazelluläre ATP-Konzentration (Locovei et al., 2006a; Locovei et al., 2007), führten ebenfalls nicht zur Ausbildung funktioneller Panx2-Kanäle. Im Western-Blot wurde gezeigt, dass es sich bei Panx2 um ein Membranprotein handelt, da der Panx2-Antikörper und ein GFP-Antikörper Panx2-GFP-Konstrukt in der Membranfraktion der HeLa-Zellproteine das detektierten. Zusammen mit den immunzytochemischen Untersuchungen und den elektrophysiologischen Daten deuten diese Studien darauf hin, dass Panx2 in transfizierten HeLa- und N2A-Zellen in zytoplasmatischen Membranen lokalisiert vorlag. Zwar wurde eine Panx2-Sequenz zur Expression gebracht, die sich von der neuesten Datenbank-Sequenz in den ersten zehn N-terminalen Aminosäuren unterscheidet. Neueste Studien konnten jedoch zeigen, dass zwischen beiden Proteinen kein Unterschied in Struktur oder Membrantransport besteht. In Expressionsstudien bildeten beide Panx2-Proteine in Plasmamembranen von Xenopus-Oozyten funktionelle Kanäle aus (Ambrosi et al., 2010). Auch im retinalen Gewebe war Panx2 in Photorezeptor-Terminalien in der Plasmamembran lokalisiert. Es gibt zwei Möglichkeiten, warum Panx2 in einigen Zelllinien nicht in die Plasmamembran transportiert wird: Entweder liegt Panx2 im nativen Gewebe Plasmamembran ausschließlich in der und vor wurde aufgrund der Expressionsbedingungen nicht in die Membran transportiert oder es besitzt sowohl zytoplasmatischen Kompartimenten als auch eine Funktion in in der Plasmamembran (Vanden-Abeele et al., 2006). Kürzlich wurde hypothetisiert, dass Pannexine neben einer Funktion in der Plasmamembran auch im endoplasmatischen Retikulum als Kalzium-Sickerkanal eine Rolle spielen könnten (D'hondt et al., 2011). In Expressionsstudien an LNCaP-Zellen bildete humanes PANX1 kalziumdurchlässige lonenkanäle im endoplasmatischen Retikulum und in der Plasmamembran. Auch für Panx3 konnte eine Funktion als Kalzium-freisetzender Kanal am endoplasmatischen Retikulum von Osteoblastenzellen nachgewiesen werden (Ishikawa et al., 2011). Für Panx2 wurde eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum von Gliomazellen gezeigt (Lai et al., 2009). Panx2-Kanäle können möglicherweise in Abhängigkeit von posttranslationalen Modifikationen in der Plasmamembran oder in zytoplasmatischen Kompartimenten funktionell sein. Dies wurde an Studien im Hippokampus gezeigt. Neuronale Vorläuferzellen exprimierten hier eine palmitoylierte Panx2-Form mit einem Molekulargewicht von ~85 kDa, die in Membranen des Golgi-Apparates und des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert war, während nicht palmitoyliertes Panx2 mit ~60 kDa in der Plasmamembran von reifen Neuronen vorlag (Swayne et al., 2010). Für retinale Panx2-Proteine mit ~73 kDa konnte eine Lokalisation in der Plasmamembran gezeigt werden, während ~85 kDa umfassende Panx2-Proteine in HeLa-Zellen in zytoplasmatischen Kompartimenten beobachtet wurden. Eine Depalmitoylierung von Proteinen aus Retina und transfizierten HeLa-Zellen könnte zeigen, ob an Panx2 angehängte Fettsäuregruppen für die unterschiedliche Lokalisation der Proteine verantwortlich waren.

### 4.2.4 Panx2-Kanäle in einem ephaptischen Mechanismus?

Eine ähnliche Lokalisation wie für Panx2 in den Horizontalzellaxonen der Maus wurde im Zebrafisch für Panx1 gezeigt, das in zapfenkontaktierenden Horizontalzelldendriten gefunden wurde (Prochnow *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang wurde spekuliert, dass Panx1 im Fisch an einem ephaptischen Mechanismus beteiligt sein könnte. Die Hypothese des ephaptischen Mechanismus wurde für Fische beschrieben und besagt, dass Kanäle in der Plasmamembran eine negative Rückkopplung von Horizontalzellen zu Zapfen vermitteln (Kamermans *et al.*, 2001; Kamermans und Fahrenfort, 2004; Fahrenfort *et al.*, 2009). Da Panx2 immunhistochemisch auf den Dendriten dissoziierter Horizontalzellen gefunden

wurde, könnte Panx2 eine ähnliche Funktion in der Zapfensynapse der Maus spielen. Zwar wurden in ultrastrukturellen Daten keine Panx2-markierten Horizontalzell-Dendriten gefunden. Dies kann jedoch darauf zurückgeführt werden, dass Zapfen nur etwa 3% der Photorezeptoren ausmachen (Jeon et al., 1998). Damit ist die Wahrscheinlichkeit, in Zapfen invaginierende Horizontalzell-Dendriten zu beobachten, vergleichsweise gering. Die Frage, ob ein ephaptischer Mechanismus in Säugetier-Retina eine Rolle spielt und ob Stäbchen ebenfalls der ein Rückkopplungs-Signal von den Horizontalzellen erhalten, wurde noch nicht geklärt. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Hyperpolarisation von Horizontalzellen eine Rückkopplung auf Stäbchen-Terminalien auslöst (Thoreson et al., 2008). Wenn es in Mäusen eine Rückkopplung von Horizontalzellen auf Stäbchen gibt, die einem ephaptischen Mechanismus zugesprochen werden kann, könnte Panx2 einen Kanal bilden, der an dieser Interaktion beteiligt ist. Sobald Panx2-Knock-out-Mäuse verfügbar sind, können elektrophysiologische Untersuchungen Panx2-defizienter Retinen weitere Hinweise darauf geben, ob Panx2-Proteine bei einem ephaptischen Mechanismus eine Rolle spielen.

### 4.2.5 Panx2 als ATP-freisetzender Kanal in der Retina

In der Retina besitzt Panx2 im Zusammenhang mit purinergen Rezeptoren möglicherweise eine Funktion als ATP-freisetzender Kanal. Für Panx1 wurde die Funktion der ATP-Freisetzung bereits beschrieben (Bao et al., 2004; Spray et al., 2006; Locovei et al., 2006a; Vanden-Abeele et al., 2006; Locovei et al., 2007). Obwohl keine vergleichbaren Studien zu Panx2 vorliegen, könnte Panx2 aufgrund seiner Homologie zu Panx1 ebenfalls eine Funktion bei der ATP-Freisetzung besitzen. Purinerge Rezeptoren kommen in der Maus-Retina als Ligandengesteuerte P2X-Ionenkanäle und als G-Protein gekoppelte P2Y-Rezeptoren zur Expression (Brändle et al., 1998a, b; Jabs et al., 2000; Wheeler-Schilling et al., 2000, 2001; Innocenti et al., 2004). Über ihre Funktion in der Retina ist wenig bekannt. Die Expression purinerger Rezeptoren in Photorezeptoren, Horizontalzellen, Bipolarzellen, Ganglienzellen und Müllerzellen lässt jedoch vermuten, dass sie bei der Verarbeitung visueller Informationen eine Rolle spielen. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass purinerge Rezeptoren im zentralen Nervensystem zur Entstehung von Aktionspotentialen und der Freisetzung von Glutamat beitragen (Robertson, 1998; Parpura und Haydon, 2000). Ein Einfluss purinerger Rezeptoren auf die Verarbeitung optischer Informationen wurde durch den Einsatz von P2X-

Rezeptor-Agonisten gezeigt, der zu einer Steigerung der retinalen Acetylcholin- und GABA-Freisetzung führte (Neal und Cunningham, 1994; Neal *et al.*, 1998).

Purinerge P2X7-Rezeptoren wurden postsynaptisch auf Horizontalzellen und präsynaptisch auf Photorezeptor-Terminalien von Ratten und Primaten lokalisiert (Puthussery und Fletcher, 2004; Puthussery et al., 2006). Aktivierte ATPasen in der äußeren plexiformen Schicht, die die Aktivierung von purinergen Rezeptoren beenden können, wurden ebenfalls nachgewiesen (Puthussery et al., 2006). Die Herkunft von ATP im Bereich der Photorezeptor-Synapse konnte jedoch nicht ermittelt werden. Möglicherweise wird ATP in Verbindung mit Glutamat und GABA in Form von Vesikeln an Photorezeptoren und Horizontalzellen freigesetzt (Puthussery et al., 2006). Cx57, das vermutlich einzige Connexin, das in Horizontalzellen exprimiert wird (Hombach et al., 2004), bildet keine Hemikanäle in den Horizontalzellfortsätzen, die an der ATP-Freisetzung beteiligt sein könnten (Janssen-Bienhold et al., 2009). Die in dieser Arbeit dargestellten ultrastrukturellen Analysen deuten darauf hin, dass Panx2 in Photorezeptoren Kanäle ausbildet, die das Zytoplasma mit dem extrazellulären Raum verbinden. Da Panx2, wie P2X7-Rezeptoren, postsynaptisch auf Horizontalzellen und präsynaptisch auf Photorezeptor-Terminalien könnte durch beobachtet wurde, Panx2-Kanäle freigesetztes ATP die purinergen P2X7-Rezeptoren aktivieren. Welche Rolle diese Rezeptoren in der Photorezeptor-Synapse spielen, konnte bisher nicht ermittelt werden. Da P2X-Rezeptoren bei Aktivierung den Durchfluss von Kalziumionen ermöglichen (Evans et al., 1996), könnte in der äußeren plexiformen Schicht freigesetztes ATP die Kalziumkonzentration innerhalb der Photorezeptoren erhöhen und eine Depolarisation bewirken. Tatsächlich scheint ATP die Signalübertragung in der Photorezeptor-Synapse zu beeinflussen, da die retinale Injektion eines P2X7-Agonisten im Elektro-Retinogramm zu einer vergrößerten A-Welle führte, was eine veränderte Reaktion der Photorezeptoren anzeigte (Puthussery et al., 2006).

Um zu überprüfen, ob Panx2 tatsächlich eine Funktion als ATP-freisetzender Kanal im Zusammenhang mit purinergen Rezeptoren besitzt, sind weitere Experimente notwendig. Zunächst müssen die Kanaleigenschaften von Panx2 anhand von *Patch-Clamp*-Ableitungen Panx2-exprimierender Zellen ermittelt werden. Die Experimente im Rahmen dieser Arbeit lieferten hierzu keine Daten, da in Panx2-exprimierenden HeLa- und N2A-Zellen keine Kanal-Ströme gemessen werden konnten. Immunzytochemische Untersuchungen bestätigten, dass Panx2 in diesen Zelllinien nicht in die Plasmamembran eingebaut wurde. Panx2 wurde bei einer Expression in C6-Glioma-Zellen (Lai *et al.*, 2009), NRK-Osteoblastenzellen und HEK-293-T-Zellen (Penuela et al., 2009) ebenfalls nicht in die Plasmamembran eingebaut. Da Panx2-Kanäle Expressionsstudien mit *Xenopus*-Oozyten elektrophysiologisch in nachgewiesen werden konnten (Ambrosi et al., 2010), könnten die Kanaleigenschaften von Panx2 unter Verwendung dieses Expressionssystems untersucht werden. Geöffnete, ATP-durchlässige Panx2-Kanäle bei erhöhten intrazellulären Kalzium-Konzentrationen wären ein erstes Indiz für eine Panx2-Funktion als ATPfreisetzender Kanal. Der Einfluss von Panx2-Kanälen auf P2X7-Rezeptoren kann durch die Koexpression dieser beiden Proteine untersucht werden. Ob Panx2 in der äußeren plexiformen Schicht mit P2X7-Rezeptoren kolokalisiert vorliegt, kann durch Doppelimmunmarkierungen der Retina mit Panx2- und P2X7-Antikörpern ermittelt werden. Erste Studien hierzu wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführt, jedoch lieferte der P2X7-Antikörper bisher keine eindeutige Immunoreaktivität in der Maus-Retina. Untersuchungen Panx2-defizienter Mäuse könnte einen Aufschluss darüber liefern, ob Panx2 die retinale Signalverarbeitung beeinflusst.

#### 4.3 Connexine und Panx2 im Zusammenhang mit Retinitis pigmentosa

Die molekulare Aufklärung des *Gap-Junction*-Kanals zwischen Stäbchen und Zapfen sollte einen Ansatz schaffen, retinale Krankheiten zu behandeln. Voraussetzung hierfür war, dass *Gap-Junction-Kanäle* zwischen Stäbchen und Zapfen einen Übertragungsweg für Zelltod-induzierende Faktoren bilden. Dies konnte bisher in unserer Arbeitsgruppe durch Untersuchungen von Katharina Schmidt nicht bestätigt werden. In Mausmodellen für Retinitis pigmentosa gab es bezüglich der Zapfendegeneration keine signifikanten Unterschiede, wenn der *Gap-Junction*-Kanal zwischen Stäbchen und Zapfen nicht funktionsfähig war (Schmidt *et al.*, in Ausarbeitung; Poster *8<sup>th</sup> Göttingen Meeting*).

Interessanterweise könnte Panx2 als ATP-freisetzender Kanal einen Einfluss auf die Degeneration von Photorezeptoren haben. Es wurde gezeigt, dass extrazelluläres ATP sowohl apoptotische als auch nekrotische Mechanismen in neuronalen Zellen auslösen kann (Cavaliere *et al.*, 2001; Amadio *et al.*, 2002; Volonté *et al.*, 2003; Franke und Illes, 2006). Unter den Subtypen der P2X-Rezeptoren stellen die in der Retina stark exprimierten P2X7-Rezeptoren einen Sonderfall dar. Die Ligandengesteuerten P2X7-Ionenkanäle öffnen sich bei langer ATP-Applikation zu einer Pore, die durch ihre Permeabilität für bis zu 900 kDa große Moleküle zum Zelltod führen kann. Neben der Expression in Horizontalzellen und Photorezeptoren wurde P2X7-Immunoreaktivität in Amakrin- und Ganglienzellen von Ratten beobachtet (Brändle *et* 

*al.*, 1998 b). In der Retina von Ratten führte die Aktivierung purinerger P2X7-Rezeptoren zum Absterben retinaler Ganglienzellen (Zhang *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2010). In Photorezeptoren löste extrazelluläres ATP durch aktivierte purinerge Rezeptoren ein irreversibles Absterben der Zellen aus. Die Injektion von purinergen Antagonisten führte zu einer höheren Überlebensrate der Photorezeptoren in rd1-Maus-Modellen für humane Retinitis pigmentosa (Puthussery und Fletcher, 2009). Panx2 wurde in der Nähe von purinergen P2X7-Rezeptoren, postsynaptisch auf Horizontalzellen und präsynaptisch in den Membranen der Photorezeptor-Terminalien lokalisiert. Sollten Panx2-Proteine ATP-freisetzende Kanäle in der Photorezeptor-Synapse ausbilden, könnten sie eine wichtige Rolle bei der Degeneration von Photorezeptoren spielen. Eine Aufklärung dieses Mechanismus könnte einen Ansatz zur Behandlung retinaler Krankheiten schaffen.

# 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollten die Proteine der *Gap-Junction-Kanäle* zwischen Stäbchen und Zapfen der Maus-Retina identifiziert werden. Die Identifikation dieser Kanalproteine sollte einen Ansatz schaffen, retinale Krankheiten zu behandeln, falls über *Gap Junction*s Zelltod-induzierende Faktoren von degenerierten Stäbchen auf gesunde Zapfen übertragen werden.

Es wurde gezeigt, dass Cx36 in Zapfen, jedoch nicht in Stäbchen exprimiert wird. Während die Expression von Cx36 in Zapfen bereits bekannt war, konnte zum ersten Mal mit konfokaler und ultrastruktureller Mikroskopie eindeutig nachgewiesen werden, dass Cx36 nicht in Stäbchen exprimiert wird. Zusätzlich wurde ausgeschlossen, dass in Stäbchen ein Cx36-Spleißprodukt zur Expression kommt, das nicht von dem verwendeten Antikörper erkannt wurde. Bei der Untersuchung aller bekannten Connexin-Gene wurden Transkripte von Cx32, Cx36, Cx43, Cx45, Cx50 und Cx57 durch *Nested-RT-PCR* in Photorezeptoren detektiert. Immunhistochemische Untersuchungen ergaben, dass keines dieser Connexine mit Cx36 *Gap Junctions* zwischen Stäbchen und Zapfen ausbildet. Ausschließlich Cx45 und Cx57 wurden im Bereich der Stäbchen- und Zapfen-Terminalien beobachtet, lagen dort aber nicht kolokalisiert mit Cx36 vor.

Nachdem keines der bekannten Connexine als Kopplungspartner zu Cx36 in Stäbchen identifiziert werden konnte, wurden die Pannexine als putative Gap Junctions bildende Proteine auf ihre Expression in Photorezeptoren untersucht. Panx1 konnte als mRNA, nicht jedoch als Protein in Photorezeptoren identifiziert werden. Panx2 wurde sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene in Photorezeptoren identifiziert. Die Proteine wurden in Photorezeptor-Terminalien im Bereich der Gap Junctions zwischen Stäbchen und Zapfen gefunden. Funktionelle Expressionsstudien ergaben jedoch, dass Panx2 weder allein noch zusammen mit Cx36 funktionelle Kanäle in HeLa- und N2A-Zellen ausbilden kann. Außerdem zeigten immunhistochemische Untersuchungen keine Kolokalisation von Panx2 und Cx36. In ultrastrukturellen Untersuchungen war Panx2 in den Membranen der Photorezeptor-Terminalien lokalisiert, bildete dort jedoch keine Gap-Junction-Kanäle. In Form der Connexin- und der Pannexin-Genfamilie wurden alle bekannten Gap-Junction-Proteine auf ihre Expression in Photorezeptoren untersucht. Außer im Fall von Cx30.2 waren die verwendeten Methoden sensitiv genug, um ein bekanntes, in Stäbchen exprimiertes Gap-Junction-Protein zu detektieren. Da es weder im Rahmen dieser Arbeit noch in anderen Arbeitsgruppen bisher gelungen ist, den

Kopplungspartner zu Cx36 in Stäbchen zu identifizieren, muss es sich bei dem gesuchten Protein um eine unbekannte Connexinsequenz oder um ein Protein einer noch nicht identifizierten *Gap-Junction*-Proteinfamilie handeln.

Im Rahmen der Expressionsanalyse von Gap-Junction-Proteinen in Photorezeptoren wurde die Lokalisation von Panx2-Proteinen in den Synapsen der Photorezeptoren beobachtet. Da weder die Funktion noch die retinale Lokalisation von Panx2-Proteinen bekannt war, wurden diese Proteine in der Retina näher analysiert. Die einzige verfügbare Studie zur Panx2-Expression in der Retina beschränkte sich auf ein Verteilungsmuster der Panx2-mRNA in allen retinalen Schichten. Ihre Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Um diese Expression einem Zelltyp zuordnen zu können, wurden Einzelzell-RT-PCRs durchgeführt, in denen Panx2-Transkripte neben Photorezeptoren auch in Horizontalzellen, Müllerzellen und Bipolarzellen gefunden wurden. In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Panx2-Proteine in Zellen der Wirbeltier-Retina lokalisiert. Immunologische Untersuchungen an dissoziierten Retinazellen und im retinalen Gewebe zeigten eine Expression von Panx2-Proteinen in Photorezeptoren, Horizontalzellen und Bipolarzellen. Panx2-Proteine wurden präsynaptisch in den Plasmamembranen der Photorezeptor-Terminalien und postsynaptisch in Horizontalzellaxonen beobachtet. Immunologische Panx2-Markierungen in isolierten Bipolarzellen wurden durch Doppelimmunmarkierungen in Retinaschnitten näher analysiert und zeigten die Expression von Panx2 in Typ-3b-OFF-Bipolarzellen.

Für alle Pannexine wurde bereits in Expressionsstudien eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen; auch Panx2 war bei Expression in HeLa- und N2A-Zellen in zytoplasmatischen Kompartimenten lokalisiert. In diesen Studien wurde keine Kolokalisation von Panx1 und Panx2 beobachtet, so dass Panx2 wahrscheinlich keine heteromeren Kanäle mit Panx1 ausbildet. Im Gewebe konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Panx2-Proteine in zytoplasmatischen Membranen vorkommen, dort aber keine *Gap Junctions* ausbilden. Die Lokalisation von Panx1- und Panx2-Proteinen in unterschiedlichen retinalen Zelltypen deutet außerdem darauf hin, dass Panx2 in der Retina eine von Panx1 unabhängige Funktion besitzt.

Da Panx2 in der Nähe von purinergen P2X7-Rezeptoren postsynaptisch auf Horizontalzellen und präsynaptisch in den Membranen der Photorezeptor-Terminalien lokalisiert wurde, könnte Panx2 als ATP-freisetzender Kanal die Funktion der äußeren Retina beeinflussen. Für Panx1 wurde eine Funktion als ATPfreisetzender Kanal unter Einfluss von purinergen Rezeptoren bereits gezeigt. Als

130

ATP-Kanal könnte Panx2 einen Einfluss auf die Krankheit Retinitis pigmentosa haben, da extrazelluläres ATP durch aktivierte purinerge Rezeptoren zu einem irreversiblen Absterben von Photorezeptoren führt.

## 6 Summary

The aim of this thesis was to identify the proteins that make up the gap junction channels between rods and cones in the mouse retina. The identification of these channel proteins was the starting point of a new approach to treating retinal disorders; the approach assumes that cell death-inducing factors from degenerated rods pass through gap junctions to healthy cones.

Cx36 is expressed in cones but not in rods. While expression of Cx36 in cones was already known, this was the first time that confocal and ultrastructural microscopy were used to prove conclusively that Cx36 is not expressed in rods. Furthermore, this work excluded rod expression of a Cx36 splice product not recognized by the antibodies. Nested RT-PCR experiments searching for all known connexin genes detected transcripts from Cx32, Cx36, Cx43, Cx45, Cx50 and Cx57. Immunohistochemical experiments showed that none of these connexins builds gap junctions between rods and cones together with Cx36. Cx45 and Cx57 alone were observed near the rod and cone terminals, but neither was colocalized with Cx36.

After ruling out all of the known connexins as coupling partners for Cx36 in rods, the pannexins were next examined as potential gap junction-building proteins in photoreceptors. Panx1 was identified on the mRNA level but not on the protein level in photoreceptors. Panx2 was identified on both the mRNA and protein levels in photoreceptors. Panx2 protein was found in photoreceptor terminals in the region of the gap junctions between rods and cones. However, functional expression studies indicated that Panx2 cannot build functional channels in HeLa or N2A cells either on its own or together with Cx36. Furthermore, immunohistochemical experiments showed no colocalization between Panx2 and Cx36. Using ultrastructural microscopy, Panx2 was found in photoreceptor terminals, but it did not form gap junction channels there.

All known gap junction proteins in the connexin and pannexin gene families were tested for expression in photoreceptors. With the exception of Cx30.2, the methods used were sensitive enough to detect a known gap junction protein expressed in rods. Since it was not possible, either in this work or in other laboratories, to identify the coupling partner of Cx36 in rods, the sought-after protein must be an unknown connexin sequence or a protein from a further, unknown gap junction protein family.

In the expression analysis of gap junction proteins in photoreceptors, Panx2 proteins were localized in the synapses of photoreceptors. Since neither the function nor the retinal localization of Panx2 proteins were previously known, these proteins were analyzed more closely in the retina. The only previous study on Panx2 expression in
the retina limited itself to the expression pattern of Panx2 mRNA in the retinal layers. Their results were confirmed in this work. In order to assign this expression to a cell type, single-cell RT-PCR was carried out: Panx2 transcripts were found in photoreceptors, horizontal cells, Müller cells and bipolar cells. In this study, Panx2 proteins were described in cells of the vertebrate retina for the first time. Immunological experiments on dissociated retinal cells and in retinal tissue showed expression of Panx2 proteins in photoreceptors, horizontal cells and bipolar cells. Panx2 proteins were observed presynaptically in the plasma membrane of the photoreceptor terminals as well as postsynaptically in the horizontal cells. Panx2 labeling in isolated bipolar cells was examined more closely using double immunolabeling in retinal slices: Panx2 expression was observed in type 3b OFF bipolar cells.

Expression studies had previously localized all of the pannexins in the endoplasmic reticulum; Panx2 was also localized in cytoplasmic compartments when expressed in HeLa and N2A cells. In these studies, no colocalization was observed between Panx1 and Panx2, suggesting that Panx2 is unlikely to build heteromeric channels with Panx1. Experiments in tissue showed for the first time that Panx2 proteins are found in cytoplasmic membranes but do not form gap junctions there. The localization of Panx1 and Panx2 proteins in different retinal cell types further supports the idea that Panx2 plays a functional role independent of Panx1 in the retina.

Since Panx2 was localized near purinergic P2X7 receptors postsynaptically on horizontal cells and presynaptically in the membranes of the photoreceptor terminals, it is possible that Panx2 acts as an ATP-releasing channel, influencing the function of the outer retina. A function for Panx1 as an ATP-releasing channel under the influence of purinergic receptors has already been shown. As an ATP channel, Panx2 could influence retinitis pigmentosa, since extracellular ATP leads to irreversible cell death in photoreceptors through activated purinergic receptors.

## 7 Literatur

Amadio S, D'Ambrosi N, Cavaliere F, Murra B, Sancesario G, Bernardi G, Burnstock G, Volonté C. P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons. Neuropharmacology 2002;42(4):489–501.

Ambrosi C, Gassmann O, Pranskevich JN, Boassa D, Smock A, Wang J, Dahl G, Steinem C, Sosinsky GE. Pannexin1 and Pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other. J Biol Chem. 2010;285(32):24420–31. Epub 2010 Jun 1.

Ball AK, McReynolds JS. Localization of Gap Junctions and tracer coupling in retinal Müller cells. J Comp Neurol. 1998;393(1):48–57.

Bao L, Locovei S, Dahl G. Pannexinmembrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. FEBS Lett. 2004;572:65–8.

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. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin Gap Junction proteins. Genomics. 2004; 83(4):706–16.

Berson EL. Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture Invest Ophthalmol Vis Sci. 1993;34:1659–76.

Beyer EC, Berthoud VM. Connexin Genes. In: Harris A, Locke D, editors. Connexins a guide. Springer 2009. pp. 12.

Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin43: a protein from rat heart homologous to a Gap Junction protein from liver. J Cell Biol. 1987;105(6 Pt 1):2621–9.

Bloomfield SA, Dacheux RF. Rod vision: pathways and processing in the mammalian retina. Prog Retin Eye Res. 2001; 20(3):351–84.

Bloomfield SA, Völgyi B. The diverse functional roles and regulation of neuronal Gap Junctions in the retina. Nat Rev Neurosci. 2009; 10(7):495–506. Epub 2009 Jun 3.

Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, Dahl G, Gaietta G, Sosinsky G. Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. J Biol Chem. 2007;282:31733–43.

Boassa D, Qiu F, Dahl G, Sosinsky G. Trafficking dynamics of glycosylated pannexin 1 proteins. Cell Commun Adhes. 2008;15:119–32.

Brändle U, Guenther E, Irrle C, Wheeler-Schilling TH. Gene expression of the P2X receptors in the rat retina. Mol Brain Res. 1998s;59:269–272.

Brändle U, Kohler K, Wheeler-Schilling TH. Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina. Mol Brain Res. 1998b;62:106–109.

Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. Pannexins, a family of Gap Junction proteins expressed in brain. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:13644–9.

Budd SL, Lipton SA. Calcium tsunamis: do astrocytes transmit cell death messages via Gap Junctions during ischemia? Nat Neurosci. 1998;1(6):431–2.

Bukauskas FF, Kreuzberg MM, Rackauskas M, Bukauskiene A, Bennett MV, Verselis VK, Willecke K. Properties of mouse connexin 30.2 and human connexin 31.9 hemichannels: implications for atrioventricular conduction in the heart. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103: 9726–31.

Cao F, Eckert R, Elfgang C, Nitsche JM, Snyder SA, Hulser DF, Willecke K, Nicholson BJ. A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of Gap Junctions expressed in HeLa transfectants and Xenopus oocytes. J Cell Sci. 1998;111(Pt 1):31–43.

Carter-Dawson LD, LaVail MM. Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. J Comp Neurol. 1979;188:245–62.

Cavaliere F, D'Ambrosi N, Ciotti MT, Mancino G, Sancesario G, Bernardi G, Volonté C. Glucose deprivation and chemical hypoxia: neuroprotection by P2 receptor antagonists. Neurochem Int. 2001;38(3):189–97.

Condorelli DF, Parenti R, Spinella F, Trovato Salinaro A, Belluardo N, Cardile V, Cicirata F. Cloning of a new Gap Junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. Eur J Neurosci. 1998;10:1202–8.

Cook JE, Becker D. Gap Junctions in the vertebrate retina. Microsc Res Tech. 1995;31:408–19, Review.

Cotrina ML, Kang J, Lin JH, Bueno E, Hansen TW, He L, Liu Y, Nedergaard M. Astrocytic Gap Junctions remain open during ischemic conditions. J Neurosci. 1998;18(7):2520–37.

Cotrina ML, Lin JH, Lopez-Garcia JC, Naus CC, Nedergaard M. ATP-mediated glia signaling. J Neurosci. 2000;20:2835–44.

Cruciani V, Mikalsen SO. The vertebrate connexin family. Cell Mol Life Sci. 2006;63(10):1125–40.

Dahl G, Nonner W, Werner R. Attempts to define functional domains of Gap Junction proteins with synthetic peptides. Biophys J. 1994;67:1816–22.

Dang L, Pulukuri S, Mears AJ, Swaroop A, Reese BE, Sitaramayya A. Connexin 36 in photoreceptor cells: studies on transgenic rod-less and cone-less mouse retinas. Mol Vis. 2004;10:323–7.

Deans MR, Volgyi B, Goodenough DA, Bloomfield SA, Paul DL.Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. Neuron. 2002;36(4):703–12.

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

DeVries SH, Qi X, Smith R, Makous W, Sterling P. Electrical coupling between mammalian cones. Curr Biol. 2002;12:1900–7.

DeVuyst E, Decrock E, Cabooter L, Dubyak GR, Naus CC, Evans WH, Leybaert L. Intracellular calcium changes trigger connexin 32 hemichannel opening. Embo J. 2006;25: 34–44.

D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Bultynck G, Himpens B. Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions? Bioessays. 2009;31(9):953–74.

D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Vinken M, De Vuyst E, De Bock M, Wang N, Rogiers V, Leybaert L, Himpens B, Bultynck G. Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. Cell Signal. 2011;23(2):305–16. Epub 2010 Aug 3.

Dunn FA, Rieke F. The impact of photoreceptor noise on retinal gain controls. Curr Opin Neurobiol. 2006;16(4):363–70. Epub 2006 Jul 11.

Dvoriantchikova G, Ivanov D, Panchin Y, Shestopalov VI. Expression of pannexin family of proteins in the retina. FEBS Lett 2006a;580:2178–82.

Ebihara L. Physiology and biophysics of hemi-Gap-junctional channels expressed in Xenopus oocytes. Acta Physiol Scand. 2003;179(1):5–8.

Edwards FA. ATP receptors. Curr Opin Neurobiol. 1994;4(3):347-52.

Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Fraté H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hülser DF, Willecke K. Specific permeability and selective formation of Gap Junction channels in connexin-transfected HeLa cells. J Cell Biol. 1995;129(3):805–17.

Evans RJ, Lewis C, Virginio C, Lundstrom K, Buell G, Surprenant A, North RA. Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. J. Physiol. 1996;497:413–422.

Fahrenfort I, Steijaert M, Sjoerdsma T, Vickers E, Ripps H, van Asselt J, Endeman D, Klooster J, Numan R, ten Eikelder H, von Gersdorff H, Kamermans M. Hemichannelmediated and pH-based feedback from horizontal cells to cones in the vertebrate retina. PLoS One. 2009;4(6):e6090.

Feigenspan A, Janssen-Bienhold U, Hormuzdi S, Monyer H, Degen J, Söhl G, Willecke K, Ammermüller J, Weiler R. Expression of connexin36 in cone pedicles and OFF-cone bipolar cells of the mouse retina. J Neurosci. 2004;24:3325–34.

Feigenspan A, Teubner B, Willecke K, Weiler R. Expression of neuronal connexin36 in All amacrine cells of the mammalian retina. J Neurosci. 2001;21:230–9.

Fox MA, Sanes JR. Synaptotagmin I and II are present in distinct subsets of central synapses. J Comp Neurol. 2007;503:280–96.

Franke H, Illes P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. Pharmacol Ther. 2006;109(3):297–324. Epub 2005 Aug 15.

Fromeget C, El Aoumari A, Dupont E, Briand J-P, Gros D. Changes in the expression of connexin 43, a cardiac Gap junctional protein, during mouse heart development. J Mol Cell Cadiol. 1990;22:1245–58.

Gemel J et al. Cx30.2 can form heteromeric Gap Junction channels with other cardiac connexins. Biochem Biophys Res Commun. 2008;369:388–94.

Goodenough DA. Bulk isolation of mouse hepatocyte Gap Junctions. Characterization of the principal protein, connexin. J Cell Biol. 1974;61:557–63.

Goodenough DA, Paul DL. Beyond the Gap: functions of unpaired connexon channels. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4(4):285–94.

Güldenagel M, Söhl G, Plum A, Traub O, Teubner B, Weiler R, Willecke K. Expression patterns of connexin genes in mouse retina. J Comp Neurol. 2000;425:193–201.

Haefliger JA, Bruzzone R, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Paul DL. Four novel members of the connexin family of Gap Junction proteins. Molecular cloning, expression, and chromosome mapping. J Biol Chem. 1992;267:2057–64.

Han Y, Massey SC. Electrical synapses in retinal ON cone bipolar cells: subtypespecific expression of connexins. Proc. Natl Acad. Sci. 2005;102:13313–13318.

Haverkamp S, Grünert U, Wässle H. The cone pedicle, a complex synapse in the retina. Neuron. 2000a;27(1):85–95.

Haverkamp S, Specht D, Majumdar S, Zaidi NF, Brandstätter JH, Wasco W, Wässle H, Tom Dieck S. Type 4 OFF cone bipolar cells of the mouse retina express calsenilin and contact cones as well as rods. J Comp Neurol. 2008;507:1087–101.

Haverkamp S, Wässle H. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. J Comp Neurol. 2000b;424(1):1–23.

Heikkinen H, Vinberg F, Nymark S, Koskelainen A. Mesopic background lights enhance dark-adapted cone ERG flash responses in the intact mouse retina: a possible role for Gap junctional decoupling. J Neurophysiol. 2011;105(5):2309-18

Hidaka S, Akahori Y, Kurosawa Y: Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells. J Neurosci. 2004;24:10553–67.

Hilgen G, von Maltzahn J, Willecke K, Weiler R, Dedek K. Subcellular distribution of connexin45 in OFF bipolar cells of the mouse retina. J Comp Neurol. 2011;15;519(3):433–50.

Hombach S, Janssen-Bienhold U, Söhl G, Schubert T, Büssow H, Ott T, Weiler R, Willecke K. Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. Eur J Neurosci. 2004;19:2633–40.

Hornstein EP, Verweij J, Li PH, Schnapf JL. Gap-junctional coupling and absolute sensitivity of photoreceptors in macaque retina. J Neurosci. 2005;25:11201–9.

Hornstein EP, Verweij J, Schnapf JL. Electrical coupling between red and green cones in primate retina. Nat Neurosci. 2004;7:745–50.

Horst M, Harth N, Hasilik A. Biosynthesis of glycosylated human lysozyme mutants. J. Biol. Chem. 1991;266:13914–13919.

Hu H, Lu W, Zhang M, Zhang X, Argall AJ, Patel S, Lee GE, Kim YC, Jacobson KA, Laties AM, Mitchell CH. Stimulation of the P2X7 receptor kills rat retinal ganglion cells in vivo. Exp Eye Res. 2010;91(3):425-32.

Huang Y, Grinspan JB, Abrams CK, Scherer SS. Pannexin1 is expressed by neurons and glia but does not form functional Gap Junctions. Glia. 2007;55:46–56.

Innocenti B, Pfeiffer S, Zrenner E, Kohler K, Guenther E. ATP-induced non-neuronal cell permeabilization in the rat inner retina. J Neurosci. 2004;24(39):8577–83.

Ishikawa M, Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Fukumoto S, Yamada Y. Pannexin 3 functions as an ER Ca2+ channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. J Cell Biol. 2011 Jun 20. Epub ahead of print.

Jabs R, Guenther E, Marquordt K, Wheeler-Schilling TH. Evidence for P2X3, P2X4, P2X5 but not for P2X7 containing purinergic receptors in Muller cells of the rat retina. Mol Brain Res. 2000;76:205–210.

Jacob A, Beyer E. Mouse connexin 45: genomic cloning and exon usage. DNA Cell Biol. 2001;20:11–9.

Janssen-Bienhold U, Trümpler J, Hilgen G, Schultz K, Pérez de Sevilla Müller L, Sonntag S, Dedek K, Dirks P, Willecke K, Weiler R. Connexin57 is expressed in dendro-dendritic and axo-axonal Gap Junctions of mouse horizontal cells and its distribution is modulated by light. J Comp Neurol. 2009;513(4):363–74.

Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. The major cell populations of the mouse retina. J Neurosci. 1998;18:8936–46.

Johansson K, Bruun A, Ehinger B. Gap Junction protein connexin43 is heterogeneously expressed among glial cells in the adult rabbit retina. J Comp Neurol. 1999;407(3):395–403.

Kamasawa N, Furman C, Davidson K, Sampson J, Magnie A, Gebhardt B, Kamasawa M, Yasumura T, Zumbrunnen J, Pickard G, Nagy J, Rash J. Abundance and ultrastructural diversity of neuronal Gap Junctions in the off and on sublaminae of the inner plexiform layer of rat and mouse retina. Neurosc. 2006;142:1093–117.

Kamermans M, Fahrenfort I. Ephaptic interactions within a chemical synapse: hemichannel-mediated ephaptic inhibition in the retina. Curr Opin Neurobiol. 2004;14:531–41.

Kamermans M, Fahrenfort I, Schultz K, Janssen-Bienhold U, Sjoerdsma T, Weiler R. Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. Science 2001;292(5519):1178–80.

Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Séguéla P, Voigt M, Humphrey PP. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. Pharmacol Rev. 2001;53(1):107-18.

Kihara AH, Mantovani de Castro L, Belmonte MA, Yan CY, Moriscot AS, Hamassaki DE. Expression of connexins 36, 43, and 45 during postnatal development of the mouse retina. J Neurobiol. 2006;66(13):1397–410.

Kihara AH, Paschon V, Cardoso CM, Higa GS, Castro LM, Hamassaki DE, Britto LR. Connexin36, an essential element in the rod pathway, is highly expressed in the essentially rodless retina of Gallus gallus. J Comp Neurol. 2009;512(5):651–63.

Kolb H, Famiglietti E. Rod and cone pathways in inner plexiform layer of cat retina. Science 1974;186(4158):47–9.

Koulen P, Fletcher EL, Craven SE, Bredt DS, Wässle H. Immunocytochemical localization of the postsynaptic density protein PSD-95 in the mammalian retina. J Neurosci. 1998;18:10136–49.

Kreuzberg MM, Schrickel JW, Ghanem A, Kim JS, Degen J, Janssen-Bienhold U, Lewalter T, Tiemann K, Willecke K. Connexin30.2 containing Gap Junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(15):5959–64. Epub 2006 Mar 29.

Kreuzberg MM, Söhl G, Kim JS, Verselis VK, Willecke K, Bukauskas FF. Functional properties of mouse connexin30.2 expressed in the conduction system of the heart. Circ Res. 2005;96(11):1169–77. Epub 2005 May 5.

Krüger O, Plum A, Kin J-S, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, Willecke K. Defective vascular development in connexin45-deficient mice. Development 2000;127:4179–4193.

Kumar N, Gilula N. Review: The Gap Junction communication channel. Cell 1996;84:381–8.

Kumar NM, Gilula NB. Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a Gap Junction protein. J Cell Biol. 1986;103(3):767–76.

Lai CP, Bechberger JF, Thompson RJ, MacVicar BA, Bruzzone R, Naus CC. Tumorsuppressive effects of pannexin 1 in C6 glioma cells. Cancer Res 2007;67:1545–54.

Lampe PD, Lau AF. Regulation of Gap Junctions by phosphorylation of connexins. Arch Biochem Biophys. 2000;384(2):205–15.

Lee EJ, Han JW, Kim HJ, Kim IB, Lee MY, Oh SJ, Chung JW, Chun MH. The immunocytochemical localization of connexin 36 at rod and cone Gap Junctions in the guinea pig retina. Eur J Neurosci. 2003;18:2925–34.

Li H, Chuang AZ, O'Brien J. Photoreceptor coupling is controlled by connexin 35 phosphorylation in zebrafish retina. J Neurosci. 2009;29:15178–86.

Li W, DeVries SH. Separate blue and green cone networks in the mammalian retina. Nat Neurosci. 2004;7:751–6.

Lin JH, Weigel H, Cotrina ML, Liu S, Bueno E, Hansen AJ, Hansen TW, Goldman S, Nedergaard M. Gap-Junction-mediated propagation and amplification of cell injury. Nat Neurosci. 1998;1(6):494–500.

Lin B, Jacobs TC, Masland RH. Different functional types of bipolar cells use different gap-junctional proteins. J. Neurosci. 2005;25:6696–6701.

Litvin O, Tiunova A, Connell-Alberts Y, Panchin Y, Baranova A. What is hidden in the pannexin treasure trove: the sneak peek and the guesswork. J Cell MolMed. 2006;10:613–34.

Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X7 receptor death complex. FEBS Lett. 2007;581:483–8.

Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. FEBS Lett. 2006a;580:239–44.

Locovei S, Bao L, Dahl G. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006b;16:103(20):7655-9.

Ribelayga C, Mangel SC. Identification of a circadian clock-controlled neural pathway in the rabbit retina. PLoS One. 2010; 10;5(6):e11020.

Manthey D, Bukauskas F, Lee CG, Kozak CA, Willecke K. Molecular cloning and functional expression of the mouse Gap Junction gene connexin-57 in human HeLa cells. J Biol Chem. 1999;274:14716 –23.

Mataruga A, Kremmer E, Müller F. Type 3a and type 3b OFF cone bipolar cells provide for the alternative rod pathway in the mouse retina. J Comp Neurol. 2007;502:1123–37.

Maxeiner S, Dedek K, Janssen-Bienhold U, Ammermüller J, Brune H, Kirsch T, Pieper M, Degen J, Krüger O, Willecke K, Weiler R. Deletion of connexin45 in mouse retinal neurons disrupts the rod/cone signaling pathway between AII amacrine and ON cone bipolar cells and leads to impaired visual transmission. J Neurosci. 2005;25:566–76.

McNaughton PA. Light response of vertebrate photoreceptors. Physiol Rev. 1990;70(3):847–83.

Mire P, Nasse J, Venable-Thibodeaux S. Gap junctional communication in the vibration-sensitive response of sea anemones. Hear Res. 2000;144:109–23.

Müller LP, Dedek K, Janssen-Bienhold U, Meyer A, Kreuzberg MM, Lorenz S, Willecke K, Weiler R. Expression and modulation of connexin 30.2, a novel Gap Junction protein in the mouse retina. Vis Neurosci. 2010;27(3–4):91–101.

Neal MJ, Cunningham JR. Modulation by endogenous ATP of the light-evoked release of ACh from retinal cholinergic neurons. Br J Pharmacol. 1994;113:1085–1087.

Neal MJ, Cunningham JR, Dent Z. Modulation of extracellular GABA levels in the retina by activation of glial P2X-purinoceptors. Br J Pharmacol. 1998;124:317–322.

Nelson R. Cat cones have rod input: a comparison of the response properties of cones and horizontal cell bodies in the retina of the cat. J Comp Neurol. 1977;172:109–35.

Neuhaus I, Dahl G, Werner R. Use of alternate promoters for tissuespecific expression of the gene coding for connexin32. Gene 1995;158:257–62.

Nodin C, Nilsson M, Blomstrand F. Gap Junction blockage limits intercellular spreading of astrocytic apoptosis induced by metabolic depression. J Neurochem. 2005;94(4):1111–23.

O'Brien JJ, Li W, Pan F, Keung J, O'Brien J, Massey SC. Coupling between A-type horizontal cells is mediated by connexin 50 in the rabbit retina. J Neurosci. 2006;26:1124–36.

O'Brien JJ, Nguyen HB, Mills SL. Cone photoreceptors in bass retina use two connexins to mediate electrical coupling. J Neurosci. 2004;24:5632–42.

Panchin YV. Evolution of Gap Junction proteins—the pannexin alternative. J Exp Biol. 2005;208:1415–9.

Parpura V, Haydon PG. Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:8629–34.

Paul D. Review: New functions for Gap Junctions. Curr Opin Cell Biol. 1995;7:665–72.

Paul DL. Molecular cloning of cDNA for rat liver Gap Junction protein. J Cell Biol. 1986;103(1):123–34.

Peichl L, Gonzalez-Soriano J. Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. Vis Neurosci. 1994;11:501–17.

Penuela S, Bhalla R, Gong XQ, Cowan KN, Celetti SJ, Cowan BJ, Bai D, Shao Q, Laird DW. Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of Gap Junction proteins. J Cell Sci. 2007;120:3772–83.

Penuela S, Bhalla R, Nag K, Laird DW. Glycosylation regulates pannexin intermixing and cellular localization. Mol Biol Cell. 2009;20(20):4313–23. Epub 2009 Aug 19.

Peracchia C. Chemical gating of Gap Junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. Biochim Biophys Acta. 2004;1662(1–2):61–80.

Phelan P, Bacon JP, Davies JA, Stebbings LA, Todman MG, Avery L, Baines RA, Barnes TM, Ford C, Hekimi S, Lee R, Shaw JE, Starich TA, Curtin KD, Sun YA, Wyman RJ. Innexins: a family of invertebrate Gap-Junction proteins. Trends Genet. 1998;14:348–9.

Prochnow N, Hoffmann S, Vroman R, Klooster J, Bunse S, Kamermans M, Dermietzel R, Zoidl G. Pannexin1 in the outer retina of the zebrafish, Danio rerio. Neuroscience. 2009;162(4):1039–54. Epub 2009 May 3.

Puthussery T, Fletcher EL. Synaptic localization of P2X7 receptors in the rat retina. J Comp Neurol. 2004;472(1):13-23.

Puthussery T, Fletcher E. Extracellular ATP induces retinal photoreceptor apoptosis through activation of purinoceptors in rodents. J Comp Neurol. 2009;513(4):430–40.

Puthussery T, Yee P, Vingrys AJ, Fletcher EL. Evidence for the involvement of purinergic P2X receptors in outer retinal processing. Eur J Neurosci. 2006;24:7–19.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev. 1998;50(3):413-92.

Raviola E, Gilula NB. Gap Junctions between photoreceptor cells in the vertebrate retina Proc Natl Acad Sci USA. 1973;70:1677–81.

Rawanduzy A, Hansen A, Hansen TW, Nedergaard M. Effective reduction of infarct volume by Gap Junction blockade in a rodent model of stroke. J Neurosurg. 1997;87(6):916–20.

Ray A, Zoidl G, Weickert S, Wahle P, Dermietzel R. Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system. Eur J Neurosci. 2005;21:3277–90.

Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC. The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. Neuron. 2008;1016(59):790–801.

Ribelayga C, Mangel SC. Identification of a circadian clock-controlled neural pathway in the rabbit retina. PLoS One 2010;55:e11020.

Rieke F, Baylor DA. Origin of reproducibility in the responses of retinal rods to single photons. Biophys J. 1998;75(4):1836-57.

Ripps H. Cell death in retinitis pigmentosa: Gap Junctions and the bystander' effect. Exp Eye Res. 2002;74:327–36.

Robertson SJ. Tissue distribution and functional contribution of P2X receptors in the CNS. Drug Development Res. 1998;45:336-341.

Rodiek RW. The first steps in seeing. Sinauer Associates, Inc. 1998; pp. 45.

Saez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MV. Connexin-based Gap Junction hemichannels: gating mechanisms. Biochim Biophys Acta. 2005;1711:215–24.

Scemes E, Suadicani SO, Dahl G, Spray DC. Connexin and pannexin mediated cellcell communication. Neuron Glia Biol. 2007;3:199–208.

Schmidt K, Janssen-Bienhold U, Bolte P, Weiler R. Expression of Panx2 in the mouse retina.8<sup>th</sup> Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen 2009.

Schneeweis DM, Schnapf JL. Photovoltage of rods and cones in the macaque retina. Science 1995;268:1053–6.

Schneeweis DM, Schnapf JL. The photovoltage of macaque cone photoreceptors: adaptation, noise, and kinetics. J Neurosci. 1999;19(4):1203–16.

Schock SC, Leblanc D, Hakim AM, Thompson CS. ATP release by way of Connexin 36 hemichannels mediates ischemic tolerance in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 2008;68(1):138–44.

Schubert T, Degen J, Willecke K, Hormuzdi SG, Monyer H, Weiler R. Connexin36 mediates Gap junctional coupling of alpha-ganglion cells in mouse retina. J Comp Neurol. 2005a;485:191–201.

Schubert T, Maxeiner S, Krüger O, Willecke K, Weiler R. Connexin45 mediates Gap junctional coupling of bistratified ganglion cells in the mouse retina. J Comp Neurol. 2005b; 490:29–39.

Shelley J, Dedek K, Schultz K, Hombach S, Willecke K, Weiler R. Horizontal cell receptive fields are reduced in connexin57-deficient mice. Eur J Neurosci. 2006;23(12):3176–86.

Shestopalov VI, Panchin Y. Pannexins and Gap Junction protein diversity Cell Mol Life Sci. 2008;65(3):376–94

Smith RG, Freed MA, Sterling P. Microcircuitry of the dark-adapted cat retina: functional architecture of the rod-cone network. J Neurosci. 1986;6:3505–17.

Söhl G, Degen J, Teubner B,Willecke K. The murine Gap Junction gene connexin36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. FEBS Lett. 1998;428:27–31.

Söhl G, Gillen C, Bosse F, Gleichmann M, Muller H, Willecke K. A second alternative transcript of the Gap Junction gene connexin32 is expressed in murine Schwann cells and modulated in injured sciatic nerve. Eur J Cell Biol. 1996;69:267–75.

Söhl G, Güldenagel M, Traub O, Willecke K. Connexin expression in the retina. Brain Res Brain Res Rev. 2000;32:138–45, Review.

Söhl G, Joussen A, Kociok N, Willecke K. Expression of connexin genes in the human retina. BMC Ophthalmol. 2010; 10(27).

Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. Expression and functions of neuronal Gap Junctions. Nat Rev Neurosci. 2005;6(3):191–200.

Söhl G, Willecke K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. Cell Commun Adhes. 2003;10:173–80.

Song D, Liu X, Liu R, Yang L, Zuo J, Liu W. Connexin 43 hemichannel regulates H9c2 cell proliferation by modulating intracellular ATP and [Ca2+]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2010; 42(7):472–82. Epub 2010 Jun 18.

Soucy E, Wang Y, Nirenberg S, Nathans J, Meister M. A novel signaling pathway from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. Neuron 1998;21:481–93.

Spray D, Dermietzel R. Review: X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease and other potential Gap Junction diseases of the nervous system. Trends Neurosci. 1995;18:256–62.

Spray DC, Ye ZC, Ransom BR. Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. Glia. 2006;54(7):758–73.

Stöhr H, Molday LL, Molday RS, Weber BHF, Biedermann B, Reichenbach A, Krämer F. Membrane-associated guanylate kinase proteins MPP4 and MPP5 associate with Veli3 at distinct intercellular junctions of the neurosensory retina. J Comp Neurol. 2005;481:31–41.

Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. J Biol Chem. 2002;277:10482–8.

Strettoi E, Dacheux RF, Raviola E. Synaptic connections of rod bipolar cells in the inner plexiform layer of the rabbit. J Comp Neurol. 1990;295:449–66.

Swayne LA, Sorbara CD, Bennett SA. Pannexin 2 is expressed by postnatal hippocampal neural progenitors and modulates neuronal commitment. J Biol Chem. 2010;285(32):24977–86. Epub 2010 Jun 7.

Szel A, Rohlich P, Caffe AR, Juliusson B, Aguirre G, Van Veen T. Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. J Comp Neurol. 1992;325(3):327–42.

Thoreson WB, Babai N, Bartoletti TM. Feedback from horizontal cells to rod photoreceptors in vertebrate retina. J Neurosci. 2008;28:5691–5.

tom Dieck S, Brandstätter JH. Ribbon synapses of the retina. Cell Tissue Res. 2006;326(2):339–46. Epub 2006 Jun 15.

Travis GH. Human Genetics '98: Apoptosis mechanisms of cell death in inherited retinal degenerations. Am J Hum Genet. 1998;62:503–8.

Trümpler J, Dedek K, Schubert T, de Sevilla Müller LP, Seeliger M, Humphries P, Biel M, Weiler R. Rod and cone contributions to horizontal cell light responses in the mouse retina. J Neurosci. 2008;28:6818–25.

Tsukamoto Y, Morigiwa K, Ueda M, Sterling P. Microcircuits for night vision in mouse retina. J Neurosci. 2001;21:8616–23.

Valiunas V. Biophysical properties of connexin-45 Gap Junction hemichannels studied in vertebrate cells. J Gen Physiol. 2002;119(2):147–64.

Vanden-Abeele F, Bidaux G, Gordienko D, Beck B, Panchin YV, Baranova AV, Ivanov DV, Skryma R, Prevarskaya N. Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin1. J Cell Biol. 2006;174:535–46.

Vaney DI. Many diverse types of retinal neurons show tracer coupling when injected with biocytin or Neurobiotin. Neurosci Lett. 1991;125:187–190.

Vogt A, Hormuzdi SG, Monyer H. Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain Brain Res. Mol Brain Res. 2005;141:113–20.

Völgyi B, Deans M, Paul D, Bloomfield S. Convergence and segregation of the multiple rod pathways in mammalian retina. J Neurosci. 2004;24:11182–92.

Volonté C, Amadio S, Cavaliere F, D'Ambrosi N, Vacca F, Bernardi G. Extracellular ATP and neurodegeneration. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 2003;2(6):403–12.

Wang J, Ma M, Locovei S, Keane RW, Dahl G. Modulation of membrane channel currents by Gap Junction protein mimetic peptides: size matters. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;293:C1112–9.

Wang XH, Streeter M, Liu YP, Zhao HB. Identification and characterization of Pannexin expression in the mammalian cochlea. J Comp Neurol. 2009;512:336–46.

Wässle H, Boycott BB. Functional architecture of the mammalian retina. Physiol. Rev 1991;71(2):447–80.

Wässle H, Puller C, Müller F, Haverkamp S. Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. J Neurosci. 2009;29(1):106–17.

Wässle H, Yamashita M, Greferath U, Grunert U, Müller F. The rod bipolar cell of the mammalian retina. Vis Neurosci. 1991;7(1–2):99–112.

Weiler R, Pottek M, He S, Vaney DI. Modulation of coupling between retinal horizontal cells by retinoic acid and endogenous dopamine. Brain Res Rev. 2000;32:121–9.

Wheeler-Schilling TH, Marquordt K, Kohler K, Jabs R, Guenther E. Expression of purinergic receptors in bipolar cells of the rat retina. Brain Res Mol Brain Res. 2000;76:415–418.

Wheeler-Schilling TH, Marquordt K, Kohler K, Guenther E, Jabs R. Identification of purinergic receptors in retinal ganglion cells. Mol Brain Res. 2001;92:177–180.

White TW, Goodenough DA, Paul DL. Targeted ablation of connexin50 in mice results in microphthalmia and zonular pulverulent cataracts. J Cell Biol. 1998;143(3):815–25.

White TW, Paul DL, Goodenough DA, Roberto Bruzzone. Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. Mol Biol Cell. 1995;6:459–70.

Yazaki I, Dale B, Tosti E. Functional Gap Junctions in the early sea urchin embryo are localized to the vegetal pole. Dev Biol. 1999;212:503–10.

Yeager M, Nicholson B. Structure and biochemistry of Gap Junctions. In: Hertzberg E, editor. Gap Junctions, advancec in molecular and cell biology. Stamford, CT: JAI Press; 2000. pp. 31–98.

Zahs KR, Ceelen PW. Gap junctional coupling and connexin immunoreactivity in rabbit retinal glia. Vis Neurosci. 2006;23(1):1–10.

Zahs KR, Kofuji P, Meier C, Dermietzel R. Connexin immunoreactivity in glial cells of the rat retina. J Comp Neurol. 2003;455:531–46.

Zappala A, Li Volti G, Serapide MF, Pellitteri R, Falchi M, La Delia F, Cicirata V, Cicirata F. Expression of Pannexin2 protein in healthy and ischemized brain of adult rats. Neurosci. 2007;148:653–67.

Zhang X, Zhang M, Laties AM, Mitchell CH. Stimulation of P2X7 receptors elevates Ca2+ and kills retinal ganglion cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005;46(6):2183-91.

Zhang AJ, Wu SM. Receptive fields of retinal bipolar cells are mediated mediated by heterogeneous synaptic circuitry. J Neurosci. 2009;29:789–97.

Zhang J, Wu SM. Connexin35/36 Gap Junction proteins are expressed in photoreceptors of the tiger salamander retina. J Comp Neurol. 2004;470:1–12.

# 8 Anhang

### 8.1 Vektorkarten





## 8.2 Sequenzierungen

#### Sequenzierte Gene der 3'RACE PCR:

#### Cx degeneriert α:

1. gi|158966666|ref|NM178690.4| Mus musculus RAB3 ATPase activating protein subunit 1 (Rab3gap1).

- 2. GENE ID: 75608 Chmp4b chromatin modifying protein 4B [Mus musculus].
- 3. GENE ID: 170790 MIc1 megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1 homolog (human) [Mus musculus].

4. gi|68989370|gb|AC159893.2| Mus musculus BAC clone RP23-365N23 from chromosome 9.

5. gi|118130227|ref|NM\_145955.3| Mus musculus RIKEN cDNA 1110007A13 gene (1110007A13Rik), mRNA.

Px2-peGF

6. gi|118130227|ref|NM\_145955.3| Mus musculus RIKEN cDNA 1110007A13 gene (1110007A13Rik), mRNA.

7. GENE ID: 75608 Chmp4b | chromatin modifying protein 4B [Mus musculus].

8. BC046297.1 Mus musculus RAB3 GTPase activating protein subunit 1, mRNA (cDNA clone MGC:54893 IMAGE:6486170), complete cds.

9. gi|68989370|gb|AC159893.2| Mus musculus BAC clone RP23-365N23 from chromosome 9, complete sequence.

10. gi|68989370|gb|AC159893.2| Mus musculus BAC clone RP23-365N23 from chromosome 9, complete sequence.

11. GENE ID: 11931 Atp1b1 | ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide [Mus musculus].

12. gi|312839889|ref|NM\_030700.2| Mus musculus melanoma antigen, family D, 2 (Maged2), transcript variant 1, mRNA.

13. gi|123317848|ref|NM\_010352.2| Mus musculus germ cell-specific gene 1 (Gsg1), transcript variant.

#### Cx degeneriert $\beta$ :

1. gi|89363037|ref|NM\_008612.2| Mus musculus menage a trois 1 (Mnat1), mRNA.

2. gi|126517486|ref|NM\_001081982.1| Mus musculus nuclear factor I/X (Nfix), transcript variant 1, mRNA

3. gi|26084455|dbj|AK035193.1| Mus musculus 12 days embryo embryonic body between diaphragm region and neck cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9430098F02 product:unclassifiable, full insert sequence.

4. gi|26084455|dbj|AK035193.1| Mus musculus 12 days embryo embryonic body between diaphragm region and neck cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9430098F02 product:unclassifiable, full insert sequence.

5. gi|89363037|ref|NM\_008612.2| Mus musculus menage a trois 1 (Mnat1), mRNA.

6. gi|165905584|ref|NM\_001113545.1| Mus musculus LIM domain and actin binding 1 (Lima1), transcript variant a, mRNA.

7. gi|162319513|gb|BC156092.1| Synthetic construct Mus musculus clone IMAGE:100062347, MGC:190850 FYVE and coiled-coil domain containing 1 (Fyco1) mRNA, encodes complete protein.

8. gi|89363037|ref|NM\_008612.2| Mus musculus menage a trois 1 (Mnat1), mRNA.

9. mm genomisch kein Gene of Interest in Nähe.

10. gi|74223309|dbj|AK168985.1| Mus musculus 17 days pregnant adult female amnion cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:I920070F10 product:TBC1 domain family protein C20orf140 homolog, full insert sequence.

11. gi|27452964|gb|AC131712.3| Mus musculus BAC clone RP23-193A5 from 17, complete sequence.

12. gi|19484172|gb|BC023490.1| Mus musculus split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1, mRNA (cDNA clone MGC:31011 IMAGE:5251089), complete cds. 13. gi|158854023|ref|NM\_001029978.2| Mus musculus transcription elongation factor A

Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	CCTGCTGAGTCTATAGGGGGGACCTGGAGGAACTGGGGGGGG	)
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	AACGAGAAGAT AAGAAGTTGCAAAATGC-CATTGTCAATGGGGTGCTGCAGAACACAGAG TGGGGTGCTGCAGAACACAGAG * * ******** **********************	959 39
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	ACCACCAGTAAGGAGACAGAACCAGATTGCTTAGAGGTTAAAGAGCTGACTCCACATCCA ACCACCAGTAAGGAGACAGAACCAGATTGCTTAGAGGTTAAAGAGCTGACTCCACATCCA ***************************	1019 99
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	TCTGGGCTGCGCACAGCAGCAAGGTCCAAGCTCCGAAGACAGGAAGGTATCTCCCGCTTC TCTGGGCTGCGCACAGCAGCAAGGTCCAAGCTCCGAAGACAGGAAGGTATCTCCCGCTTC ****************************	1079 159
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	TACATCATCCAAGTGGTGTTTCGAAATGCTCTGGAGATTGGGTTTCTGGTGGGCCAGTAC TACATCATCCAAGTGGTGTTTCGAAATGCTCTGGAGATTGGGTTTCTGGTGGGCCAGTAC ************************************	1139 219
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	TTTCTATATGGCTTCAGTGTTCCAGGGTTGTATGAGTGCAACCGTTACCCCTGCATCAAG TTTCTATATGGCTTCAGTGTTCCAGGGTTGTATGAGTGCAACCGTTACCCCTGCATCAAG ***********************************	1199 279
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	GAGGTAGAATGTTATGTGTCTAGACCTACCGAGAAGACAGTCTTTCTGGTGTTCATGTTT GAGGTAGAATGTTATGTGTCTAGACCTACCGAGAAGACAGTCTTTCTGGTGTTCATGTTT *********************************	1259 339
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	GCTGTGAGCGGCATTTGTGTGGTGGTCCAATCTGGCTGAACTTAACCATCTGGGATGGCGG GCTGTGAGCGGCATTTGTGTGGTGGTGCTCAATCTGGCTGAACTTAACCATCTGGGATGGCGG *********************************	1319 399
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	AAGATCAAACTGGCTGTCCGGGGGAGCCCAGGCCAAGAGGAAGTCAGTC	1379 459
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	AACAAAGATCTGCCTCGAGTCAGTGTTCCCCAATTTCGGCAGGACTCAGTCCAGTGACTCT AACAAAGATCTGCCTCGAGTCAGTGTTCCCCAATTTCGGCAGGACTCAGTCCAGTGACTCT **********************************	1439 519
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	GCCTATGTG <mark>TCA</mark> AAGGGCAGGTTTGGGGAAGGCCTGCTAGGTGGCAAGTAGCCCCAAGGC GCCTATGTGTGAAAGGGCAGGTTTGGGGAAGGCCTGCTAGGTGGCAAGTAGCCCCAAGGC ******	1499 579
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	AGATAATGACTCGGGGTTTACAGGTTTGCCCTCATTCGGGTGATGCTCGCTGTGAAGGTC AGATAATGACTCGGGGTTTACAGGTTTGCCCTCATTCGGGTGATGCTCGCTGTGAAGGTC ******	1559 639
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	TAGGATACAGATATTAAGAGGTCTTCATCAACAAAGAGGAGAGGTAGAACTGTCATCACG TAGGATACAGATATTAAGAGGTCTTCATCAACAAAGAGGAGGAGGTAGAACTGTCATCACG ***********************************	1619 699
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	TGTTACATCATCAGTTCTACAGAAACCATTGGGTAGAGTGACAAGATGGCTAAGCTGGAC TGTTACATCATCAGTTCTACAGAAACCATTGGGTAGAGTGACAAGATGGCTAAGCTGGAC ***********************************	1679 759
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	ATTCTTGGGCCTTCTTCTTTTAATGGCCCTTCCTGCTCCTGATCATAGTGAACTGGCATA ATTCTTGGGCCTTCTTTTTTAATGGCCCTTCCTGCTCCTGATCATAGTGAACTGGCATA ***********************************	1739 819
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	GCTGCCAAGCAAGAATTAGCTCTGCTGAGCTCTGTATTCTGGTGAATGGCATGAGTCAAA GCTGCCAAGCAAGAATTAGCTCTGCTGAGCTCTGTATTCTGGTGAATGGCATGAGTCAAA **********************************	1799 879
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	CACTCATTGATATAAAATTTGTGACCCATCTCAGCACATACCCTTATCCTGGGCTGCAGA CACTCATTGATATAAAATTTGTGACCCATCTCAGCACATACCCTTATCCTGGGCTGCA ******	1859 937
Cx36-mRNANM010290.2 Sequenzierung	AAAAAAAATCCTGGAGGATATTTCTCCCCCTTCAGCATGCCCCTTTCCCAAACCCAGGAT	1919 947

Abbildung 8-1. Sequenzierung der RACE-PCR mit Cx36-Primern. Unter Einsatz der Cx36-Primer zeigte die RACE-PCR mit Photorezeptor-Templates eine und die der Maus-Retina-Probe vier Banden. Das Alignment des sequenzierten Photorezeptor-Amplikons zeigt 100%ige Übereinstimmung mit der Datenbanksequenz NM010290.2. Die Sequenzen der Maus-Retina-Amplikons waren zu fast 100% mit der hier dargestellten Sequenz identisch mit dem Unterschied, dass drei der vier PCR-Produkte kürzere Fragmente aufwiesen. Die Bindestelle des Antikörpers ist in grün, die *Primer*-Bindestelle violett und das Stopp-Codon rot dargestellt.

Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	GAAAGAGGGACCCAGAGGGA <mark>CAGGTCCCAGCTGTCTCTAAGGTC</mark> CTCCG <mark>CTCAGCTCTA</mark>	60
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	AGGCCCAGGTCCCC <mark>GG</mark> GTAAGTGGGGTTGGGGACATCTAGAGGCCACTAAGGGTCTACAG	120
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	GGACGGGACGTGGTGTATTCTGTGTGTCTGGGGAGGCTTACAAGAGATGCTTGATAATTG	180
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	CTATCAGAGAGGAGTCGAGGGGGGCTGTGCCCGGTCTCCTTGGCTGAGGTTGGTGAGGAAG	240
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	GGAAGATTGAGGGCGGGCGAGAGATCCTAAGTTGGAAAAACAGGCTTCTGTGTCAGCTTC	300
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	CAACCCCAAAAGGCGTTCCCTGCTGCGAGGTGAGAGAGAAAGGAGACAGTGGGGGGCTCAC	360
Sequenzierung Cx30.2 ( <b>NM 178596.2)</b>	CCGGCCTGGCCCTCCCCTGCTCCCAGGGGTCTCAAACAGAAGGAACGTAGAATTCTAGA	420
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	CTCCAGTAGCCGCTCTTGCTCCTGGCACAAAAAGCCAGGCCAGCAAGGTTGGCCCTGAAG	480
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	AAGAACCTAGAATCTGGGGAACCTTAGGGTCTCCCTAGCCAAGCAGGCCCAGGCCAGGTG	540
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	TGCGGGGAAATCCCTCCTCAGCACCCCTCTATGCCCATATGAAGGAATCCCATAGCTGAG	600
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	CT GATGGACTATCCTCACACTCTGACATTAACTCATTAAACCCCAGAAAATATTCTTTCCCT **	2 660
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	ACCCCCCCGGTAGAAGCTTTGCAGGCCGTCCCAGCCGAAACAAAACA	59 720
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	CTTTTTTTTCCTTTTGAAGCGTAT <mark>CTCAGCT</mark> TT <mark>AGGCCCAGGTCCCG</mark> GG <b>CGTC</b> CAGGGGGTATTCAGCCCGCCCCAGCCTGTGACTACCCCCTTTCCTCG-TCCCCAGCGTC * * ** ** ** ** * * * * * * ** ** ** **	114 779
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	GGGGAGTGGGCGTTCCTAGGCTCCCTGCTGGACGCGGTGCAGCTACAGTCGCCGCTCG GGGGAGTGGGCGTTCCTAGGCTCCCTGCTGGACGCGGTGCAGCTACAGTCGCCGCTCG	174 839
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	TGGGTCGTCTCTGGCTGGTGATCATGCTGATCTTCCGCATCCTGGTGCTGGCCACGGTGG TGGGTCGTCTCTGGCTGGTGATCATGCTGATCTTCCGCATCCTGGTGCTGGCCACGGTGG ******	234 899
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	GAGGTGCGGTGTTCGAGGACGAGCAGGAGGAGGAGTTCGTGTGTAACACGTTGCAGCCCGGCT GAGGTGCGGTGTTCGAGGACGAGCAGGAGGAGGAGTTCGTGTGTAACACGTTGCAGCCCGGCT ******	294 959
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	GTCGCCAGACCTGCTACGATCGCGCCTTCCCGGTGTCCCACTACCGCTTCTGGCTCTTCC GTCGCCAGACCTGCTACGATCGCGCCTTCCCGGTGTCCCACTACCGCTTCTGGCTCTTCC ******	354 1019
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	ACATCCTGCTGCTGTCGGCGCCGCCGGTGCTGTTCGTCATCTACTCCATGCACCAGGCCA ACATCCTGCTGCTGTCGGCGCCGCCGGTGCTGTTCGTCATCTACTCCATGCACCAGGCCA *****	414 1079
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	GCAAGGAGGCGGGTGGTGCGCAGCTGGCCCGCCGTGCGCGCGGGGCGTGCCGAGGCGC GCAAGGAGGCGGGTGGTGCGCAGCTGGCCCCGCCGTGCGCGCGGGGCGTGCCGAGGCGC *****	474 1139
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	CGTGCTCCCCGTGCGCCCTGCGCGCGCCGCGCGCGCGCG	534 1199
Sequenzierung Cx30.2( <b>NM 178596.2</b> )	CTCTGCGCCTGCTCGCCGAGCTGGCTTTCCTGGGCGGCCAGGCGCTGCTCTACGGCTTCC CTCTGCGCCTGCTCGCCGAGCTGGCTTTCCTGGGCGGCCAGGCGCTGCTCTACGGCTTCC	594 1259

Sequenzierung	GCGTGGACCCGCACTACGCGTGCGCCGGGCCACCTTGTCCGCACACGGTCGACTGTTTCG	654
Cx30.2(NM 178596.2)	GCGTGGACCCGCACTACGCGTGCGCCGGGCCACCTTGTCCGCACACGGTCGACTGTTTCG	1319
Sequenzierung	TGAGCCGGCCCACCGAGAAGACCGTCTTCGTGGTCTTCTACTTCGCCGTCGGGCTGCTGT	714
Cx30.2(NM 178596.2)	TGAGCCGGCCCACCGAGAAGACCGTCTTCGTGGTCTTCTACTTCGCCGTCGGGCTGCTGT	1379
	***************************************	
Sequenzierung	CGGCGCTGCTCAGCGTGGCGGAGCTGGGTCACCTGCTCTGGAAGGGTCGCCAGCGCGCCA	774
Cx30.2(NM 178596.2)	CGGCGCTGCTCAGCGTGGCGGAGCTGGGTCACCTGCTCTGGAAGGGTCGCCAGCGCGCCA	1439
	***************************************	
Sequenzierung	AGCTG-TCCCGCCGC-GCCGTTGC	796
Cx30.2(NM 178596.2)	AGCTGCTCCCGCCGCCGCCGCCGTCGCC <mark>CTCTTTGCCATCGCAGCGCGG</mark> GGACCCCGACC	1499
	**** ******* **** *	

Abbildung 8-2. Alignment des in der Maus-Retina amplifizierten Cx30.2-Fragments und der Genbank-Sequenz. Während für die Genbank-Sequenz (NM 178596.2) nur ein Exon verzeichnet ist, das die codierende Region enthält (rote Schrift), wurde in der aus der Maus-Retina isolierten Spleißvariante ein weiteres untranslatiertes Exon (grüne Schrift) identifiziert. Bei der verwendeten Primer-Kombination "Cx30.2P6" (gelb unterlegt) lagen die beiden Forward-Primer 708 bp bzw. 758 bp stromaufwarts und der Reverse-Primer 710 bp stromabwärts vom Startcodon (blau unterlegt). Als Amplikon einer Nested-PCR mit diesen Primern wäre ein Fragment von 1438 bp zu erwarten gewesen, amplifiziert wurde jedoch ein PCR-Produkt von 740 bp. Der Grund hierfür wird durch das Alignment des seguenzierten PCR-Produktes mit der Genbank-Seguenz von Cx30.2 deutlich: Es zeigt sich, dass hier eine alternativ gespleißte Version des Cx30.2-Gens vorliegt (Abbildung 8-2). Die Primer-Sequenz des zweiten Forward-Primers liegt im PCR-Produkt nicht 708 bp, sondern nur 30 bp stromaufwärts vom Startcodon. Bei den dazwischen liegenden Basen muss es sich demnach um ein Intron handeln, das in der mRNA-Sequenz nicht mehr vorhanden ist. Während für die Genbank-Sequenz nur ein Exon verzeichnet ist, das die komplette codierende Region und die 3' untranslatierte Region enthält, wurde in der aus der Maus-Retina isolierten Spleißvariante ein weiteres untranslatiertes Exon identifiziert. Diese Sequenz deckt sich mit der vor kurzem in Herz und Hirn identifizierten Cx30.2-Gensequenz (Kreuzberg et al., 2005).

Sequenzierung Cx32 NM008124.2	AATGCTACGGCTTGAGGGGCATGGGGACCCCCTTCACCTGGAAGAGGTAAAGAGACACAA AATGCTACGGCTTGAGGGGGCATGGGGACCCCCTTCACCTGGAAGAGGTAAAGAGACACAA ***************************	599 371
Sequenzierung Cx32 NM008124.2	GGTGCACATCTCAGGGACACTGTGGTGGGCCTATGTCATCAGTGTGGTGTTCCGGCTGCT GGTGCACATCTCAGGGACACTGTGGTGGACCTATGTCATCAGTGTGGTGTTCCGGCTGCT ********************	659 431
Sequenzierung Cx32 NM008124.2	GTTCGAGGCTGTCTTCATGTATGTCTTCTATCTGCTCTACCCCGGCTATGCCATGGTGCG GTTCGAGGCTGTCTTCATGTATGTCTTCTATCTGCTCTACCCCGGCTATGCCATGGTGCG ********************************	719 491
Sequenzierung Cx32 NM008124.2	GCTGGTCAAGTGTGAAGCCTTCCCCTGCCCCAACACAGTGGACTGCTTCGTGTCCCGCCC GCTGGTCAAGTGTGAAGCCTTCCCCTGCCCCAACACAGTGGACTGCTTCGTGTCCCGCCC *****	779 551
Sequenzierung Cx32 NM008124.2	CACCGAGAAAACCGTCTTCACTGTCTTTATGCTCGCAGCCTCCGGCATCTGCATTATCCT CACCGAGAAAACCGTCTTTCACTGTCTTTATGCTCGCAGCCTCCGGCATCTGCATTATCCT ******************************	839 611
Sequenzierung Cx32 NM008124.2	CAACGTGGCGGAGGTGGTGTACCTCATCATCCGGGCCTGTGCCCGCCGTGCTCAGCGCCG CAACGTGGCGGAGGTGGTGTACCTCATCATCCGGGCCTGTGCCCGCCGTGCTCAGCGCCG *******************************	899 671
Sequenzierung Cx32 NM008124.2	CTCCAATCCGCCCTCCCGCAAGGGCTCGGGCTTCGGCCACCGCCTCTCACCTGAATACAA CTCCAATCCGCCCTCCCGCAAGGGCTCGGGCTTCGGCCACCGCCTCTCACCTGAATACAA	959 731
Sequenzierung Cx32 NM008124.2	GCAGAATGAGATCAACAAGCTGCTGAGCAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCG-G GCAGAATGAGATCAACAAGCTGCTGAGCGAGCAGGATGGCTCTCTGAAAGACATACTGCG **********************************	1015 791

Abbildung 8-3. Alignment des amplifizierten Cx32-Fragments und der Genbank-Sequenz. Die in Photorezeptoren amplifizierte Sequenz zeigte eine 100%ige Übereinstimmung mit der Cx32-Genbank-Sequenz NM 008124.2.

Sequenzierung	AGTCTGTCTTCGAGGTGGCCT	21
Cx43 NM010288.3	GTGGCCTGCTGAGAACCTACATCATCAGCATCCTCTTCAAGTCTGTCT	60
	***********	
Sequenzierung	TCCTGCTGATCCAGTGGTACATCTATGGGTTCAGCCTGAGTGCGGTCTACACCTGCAAGA	81
Cx43 NM010288.3	TCCTGCTGATCCAGTGGTACATCTATGGGTTCAGCCTGAGTGCGGTCTACACCTGCAAGA	120
	***************************************	
Sequenzierung	GAGATCCCTGCCCCCACCAGGTGGACTGCTTCCTCTCACGTCCCACGGAGAAAACCATCT	141
Cx43 NM010288.3	GAGATCCCTGCCCCACCAGGTGGACTGCTTCCTCTCACGTCCCACGGAGAAAACCATCT	180
	***************************************	
Sequenzierung	TCATCATCTTCATGCTGGTGGTGTCCTTGGTGTCTCTCGCTCAAAGGACTTATGATGCTG	201
Cx43 NM010288.3	TCATCATCTTCATGCTGGTGGTGTCCTTGGTGTCT	215
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

**Abbildung 8-4. Alignment der Cx43-Sequenzierung und der Genbank-Sequenz.** Das Sequenzalignment der in Photorezeptoren amplifizierten Sequenz zeigt eine 100%ige Übereinstimmung mit der Cx43-Sequenz der Datenbank NM 010288.3.

Cx45NM001159382.1 Sequenzierung	AAGCATGATGGCCGACGACGAATTCGAGAGGATGGGCTCATGAAAATCTATGTGTTGCAG AATTCGAAAGGA-GGGCTCATGAAGATCTATGTGTTGCAA ******* **** ***********************	540 42
Cx45NM001159382.1 Sequenzierung	CTGCTGGCCAGGACTGTGTTTGAGGTGGGCTTTCTAATAGGGCAGTATTTCCTGTATGGC CTGCTGGCCAGGACTGGGTTTGAGGCGGGCTTTCTAATAGGGCAGTATTTCCTGTATGGT *******************************	600 102
Cx45NM001159382.1 Sequenzierung	TTCCAAGTCCACCCATTTTATGTGTGCAGCAGACTTCCTTGCCCTCATAAGATAGACTGC TTCCAGATCCACCCATTTTATGTGTGCGCAGCAAACTTCCTTGCCCTCATAAAATAGACTGC ***********************************	660 162
Cx45NM001159382.1 Sequenzierung	TTTATTTCTAGACCCACTGAAAAGACCATCTTCCTTCTGATAATGTATGGTGTCACAGGC TTTATTTCTATACCCCCTGAAAAGACCATCTTCCTTCTGATAATGTTTGGTGTCACAGGC *********	720 222
Cx45NM001159382.1 Sequenzierung	CTCTGCCTATTGCTTAACATTTGGGAGATGCTTCACTTAGGGTTTGGGACAATTCGAGAC CTCTGCCTATTGCTTCT-ATTTGGGACATGCTTCACTTATGGTCTGGGAC	780 271

**Abbildung 8-5. Alignment der Sequenzierung und der Cx45-Sequenz der Genbank.** Das Sequenzalignment der in Photorezeptoren amplifizierten Sequenz zeigt eine 91%ige Übereinstimmung mit der Genbank-Sequenz NM 001159382.1.

Sequenzierung Cx50 NM008123.2	GTACAGGGGCCCTTGTAAAGGACCG-GAAGCTGAGGAGCTCTGTCAGCAGTCGCGCAG TCGCATGGAGGAGAAGCGAAAGGACCGTGAAGCTCAGGAGCTCTGTCAGCAGTCGCGCAG * * * ** ** ** **********************	201 359
Sequenzierung Cx50 NM008123.2	CAACGGGGGTGAGAGGGTACCAATCGCCCCAGACCAGGCCAGCATCCGGAAGAGCAGCAG CAACGGGGGTGAGAGGGTACCAATCGCCCCAGACCAGGCCAGCATCCGGAAGAGCAGCAG ************************	261 419
Sequenzierung Cx50 NM008123.2	CAGTAGCAAAGGCACCAAGAAGTTCCGGCTGGAGGGCACACTGCTAAGGACCTATGTCTG CAGTAGCAAAGGCACCAAGAAGTTCCGGCTGGAGGGCACACTGCTAAGGACCTATGTCTG *********************************	321 479
Sequenzierung Cx50 NM008123.2	CCACATCATCTTCAAGACCCTCTTTGAGGTGGGCTTCATCGTGGGCCATTACTTCCTGTA CCACATCATCTTCAAGACCCTCTTTGAGGTGGGCTTCATCGTGGGCCATTACTTCCTGTA ***********************************	381 539
Sequenzierung Cx50 NM008123.2	TGGTTTCCGCATCCTGCCCCTCTATCGCTGCAGCCGGTGACTGCCCCAATTCC TGGTTTCCGCATCCTGCCCCTCTATCGCTGCAGCCGGTGGCCCTGCCCCAATGTGGTAGA	434 599

**Abbildung 8-6. Alignment der Sequenzierung und der Cx50-Sequenz der Genbank.** Das Sequenzalignment der in Photorezeptoren amplifizierten Sequenz zeigt eine 98%ige Übereinstimmung mit der Genbank-Sequenz NM 008123.2.

Sequenzierung	TTCACAAACTACTCAGGGACCCAGCAGTGTATGGTCTGTTCTTTTACCTGAAAGAATC 60
Cx57	ACAAACTACTCAGGGACCCAGCAGTGTATGATCTGTTCTTCTTTACCTGAAAGAATC 840
	**************************************
Sequenzierung	TCACTACTTCAAGCCAACAATAAGCAGCGAGTCATCCGAGTCAATATACCACGGTCTAAA 120
Cx57	TCACTACTTCAAGCCAACAATAAACAGCAAGTCATCCGAGTCAATATACCACGGTCTAAA 900
	**************************************
Sequenzierung	AGCATGTGGCAAATTCCACACCCCAGGCAACTTGAGGTAGATGTATCCTG 172
Cx57	AGCATGTGGCAAATTCCACACCCCAGGCAACTTGAGGTAGATGTATCCTGTGGCAAAAGA 960
	******

Abbildung 8-7. Alignment der Sequenzierung und der Cx57-Sequenz. Ein Sequenzvergleich zwischen der aus Photorezeptor-cDNA amplifizierten Sequenz und der Cx57-Genbank-Sequenz NM 010289.2 ergab eine Übereinstimmung von 98%.

Panx1mRNA Sequenzierung	GAGAAGAACTCTCGCCAGAGGCTTCTGAATCCGTCCTGCTAATGGTTTCCTTCTTGAATT TCGTCCTGCT-ATGGTTTCCTTCTTGAATT ******** **************************	1740 29
Panx1mRNA Sequenzierung	TCAAGCCTGTGACTTCTGTGGGCTGACGCACCCCTGTTGGATCTGTAGTTAGT	1800 89
Panx1mRNA Sequenzierung	GATGTTTTTGGTATTGATGTAGTGTGTGTGTCCTACCAATCTCTAATAGACATAATGGCCAA GATGTTTTTGGTATTGATGTAGTGTGTGTGTCCTACCAATCTCTAATAGACATAATGGCCAA *********************************	1860 149
Panx1mRNA Sequenzierung	CAGCGTCATAGAAGAATAGATTAGAAACGTCCCACAAGAGTAAGTGTGCTTTGTGTGAAG CAGCGTCATAGAAGAATAGATTAGAAACGTCCCACAAGAGTAAGTGTGCTTTGTGTGAAG ****************************	1920 209
Panx1mRNA Sequenzierung	TCCTCATTGCAGGGCTGTTAAGAGCACAGAGCCTCAGCCACAGAGGAGCAGCATTCTGGA TCCTCATTGCAGGGCTGTTAAGAGCACAGAGCCTCAGCCACAGAGGAGCAGCATTCTGGA ***********************************	1980 269
Panx1mRNA Sequenzierung	CTGGCAGGTGCTAGAGGACCTGGGGCTTCTAGAGAGCAAGCA	2040 287
Panx1mRNA Sequenzierung	ТТGTGAGGTAATAAACATGTGAGGATGAAACTTAAAAAAAAA	2100

Abbildung 8-8. Alignment der Sequenzierung und der Panx1-Sequenz der Genbank. Das Sequenzalignment der in Photorezeptoren amplifizierten Sequenz zeigt eine naherzu 100%ige Übereinstimmung mit der Genbank-Sequenz NM 019482.

Sequenzierung	1	AGGAAGAGCACAAGACAGACACACTTATTGCCCCGCT	37
"Isoform2"	1351	cccaagcccgtgcgcaggaagacagccacagacacacttattgccccgct	1400
Sequenzierung	38	GCTGGACGCTGGTGCCCGTGCTGCCCACCACTACAAGGGCAGTGGAGGTG	87
"Isoform2"	1401	gctggacgctggtgcccgtgctgcccaccactacaagggcagtggaggtg	1450
Sequenzierung	88	ATTCAGGCCCCTCCTCTGCCCCGCCTGCTGCCTCTGAGAAAAGCATACC	137
"Isoform2"	1451	attcaggcccctcctctgccccgcctgctgcctctgagaaaaagcatacc	1500
Sequenzierung	138	CGCCACTTCTCCTTGGACGTGCATCCCTATATCCTAGGTACCAAGAAGGC	187
"Isoform2"	1501	cgccacttctccttggacgtgcatccctatatcctaggtaccaagaaggc	1550
Sequenzierung	188	CAAGACTGAGGCGGTACCCCTGCCCTACCAGCCTCCCGCAGCCAAGAAG	237
"Isoform2"	1551	caagactgaggcggtacccctgccctaccagcctcccgcagccaagaag	1600

Sequenzierung	238	GTGGCTTCCTGTCCCAGACAGAGGAATGTGGGCTGGGCCTAGCTGCAGCA	287
"Isoform2"	1601	gtggcttcctgtcccagacagaggaatgtgggctgggcctagctgcagca	1650
Sequenzierung	288	CCCACCAAAGATGCTCCACTCCCCGAGAAGGAAATCCCGTACCCCACAGA	337
"Isoform2"	1651	cccaccaaagatgctccactccccgagaaggaaatcccgtaccccacaga	1700
Sequenzierung	338	GCCTGCCCTGCCAGGGCTCCCATCTGGGGGGATCATTCCATGTCTGCTCAC	387
"Isoform2"	1701	gcctgccctgccagggctcccatctgggggatcattccatgtctgctcac	1750
Sequenzierung	388	CCCCCGCAGCCCCGCCGCTGCTTCCCTGTCACCAGGCAGTCTGGGCAAG	437
"Isoform2"	1751	cccccgcagcccccgccgctgcttccctgtcaccaggcagtctgggcaag	1800
Sequenzierung	438	GCTGACCCTCTCACCATCCTGAGCCGGAACGCCACTCACCCCTGCTCCA	487
"Isoform2"	1801	gctgaccctctcaccatcctgagccggaacgccactcaccccctgctcca	1850
Sequenzierung	488	CATCAGCACGCTGTATGAGGCCCGGGAAGAGGAGGAAGGA	537
"Isoform2"	1851	catcagcacgctgtatgaggcccgggaagaggaggaggaggaggcccctgtg	1900
Sequenzierung	538	CCCCCTCAGACATGGGCGACCTCCTCAGCAT	568
"Isoform2"	1901	ccccctcagacatgggcgacctcctcagcatacccccgccccagcagatc	1950

**Abbildung 8-9. Alignment zur Detektion der retinalen Panx2-Sequenz.** Das Amplikon einer *RT-PCR* mit retinaler mRNA unter Einsatz der *Primer* "Panx2lens/brainF/R" ergab nach Sequenzierung eine 100%ige Übereinstimmung des *PCR*-Produktes mit der in der Linse entdeckten "Isoform2". Die in der 2004 in der Retina detektierte "Isofom1" wurde nicht amplifiziert.

#### 8.3 Primer-Sequenzen

 Tabelle 8-1 Primer. Die Amplikongröße in Klammern bezieht sich auf die Amplifikation auf genomischer DNA.

0	
Primer-Name	Sequenz 5'→3'
β-Aktin F	TGTTACCAACTGGGACGACA
β-Aktin R	AAGGAAGGCTGGAAAAGAGC
β-Aktin Rnest	TTTGATGTCACGCACGATTT
β-Aktin nest neu	GATCTGGCACCACACCTTCT
Calbindin F	AGGCTGGATTGGAGCTATCA
CalbFnest	ATGCCAGCAACTGAAGTCCT
CalbindinR	AGCAAAGCATCCAGCTCATT
ConeArrestinF	GGGGTCAATGCCTATCCTTT
ConeArrestinR	CAAAGGTCTGGGAGAAGCTG
ConeArrestnestF	GTTGCTAACCTGCCCTGTTC
Cx23forw	AAAATGCATGGTTCCAGAGC
Cx23revNest	GCCTTTAATCCCAGCACTCA
Cx23rev	ATGAGCTATCGCCAGTTGGT
Cx23Okt09F	GATGTTCTTCCTCGGAGTGC
Cx23Okt 09R	AGCCGAAGAGGTGAATCTGA
Cx23Okt09FN	TCAGCTGTGACCCAGACAAG
Cx26USP	CGGAAGTTCATGAAGGGAGAGAT
Cx26.DP4	TGGGCCGGGACACGAAGCAGTC
Cx26carpRACE3.1A	ACCTACACCACCAGCATCTTCTTCCGGGTC
Cx26DSP PhBiotech	GGTCTTTTGGACTTTCCT
Cx26Okt09F	CAAACACTCCACCAGCATTG
Cx26Okt09R	TACGGACCTTCTGGGTTTTG
Cx26Okt09FN	GATGAGCAAGCCGATTTTGT

Primer-Name	Sequenz 5'→3'
Cx29cytLoopF	GGGAGGTACCAGGAAAGGAA
Cx29cTermR	CCACCACTGACAATTCATCG
Cx29cytLoop Fnest	CAAGGAGCAAGAGACCCAGA
Cx29Okt09F	CAAGGATGTCTCAGGGGCTA
Cx29Okt09R	CGGTTGTGTCCTTGGATCTT
Cx29Okt09FN	CAAGCTTCTCTGGGCCTATG
Cx30F	GACATCAAACGGCAGAAGGT
Cx30R	CTCTGCGCCTGTGTTCTTT
Cx30RNested 1.PCR	CTCTCTTTCAGGGCATGGTT
Cx30.2 Kreutzb F (P6)	CTCAGCTCTAAGGCCCAGGTCCCG
Cx30.2Kreutz. P2F (P6)	CAGGTCCCAAGCTGTCTCTCAAGGTC
Cx30.2 Kreutzb R (P6)	CCGCGCTGCGATGGCAAAGAG
Cx30.2 Forw(P2)	GTTCCTAGGCTCCCTGCTG
Cx30.2 Rev(P2)	GTAGCCAGCGACGCTTTG
Cx30.2 Forw nest (P3)	ACGCGGTGCAGCTACAGT
Cx30.2 Rev nest (P3)	GACCCTTCCAGAGCAGGTG
Cx30.2neuF(P4)	GAGGACGAGCAGGAGGAGTT
Cx30.2neuFnest (P4)	GTGTCCCACTACCGCTTCTG
Cx30,2neuR(P4)	GGCGAAGTAGAAGACCACGA
Cx30.2Feb10F (P5)	AAAGCGTCGCTGGCTACC
Cx30 2Feb10R (P5)	CAGCACTAGGAAGTGCGACA
30 2NtermE (P1)	GTTCCTAGGCTCCCTGCTG
30 2N-termR(P1)	GATGTGGAAGAGCCAGAAGC
30 2NtermNestF (P1)	CTCTGGCTGGTGATCATGC
30 2N-termNestR (P1)	AAGAGCCAGAAGCGGTAGTG
Cx30.3F	CCTGTACAGCAACCTGAGCA
Cx30.3R	CTTGAGGGTGACCTCCTTTG
Cx30.3Enest	GACTATGACATGCCCCGAGT
Cx31Jan2010F	AGCGCTGGGATGGTACA
Cx31.Jan2010R	TGTGTCTCAAGCAGCAGT
Cx31Jan10Rnest	GATATACGCCGGGGATATGA
Cx31 1F	CCAGGAAAAGATTGGTGAAGG
Cx31.1R	ATTCTTTGCATGTGCAGTGG
Cx31.1Enest	CTTCAGCCTCTCGTTCAAGG
Cx32cvtl oopF	GAAAATGCTACGGCTTGAGG
Cx32ctermR	GGCGCAGTATGTCTTTCAGA
Cx32cterm nest	GCTCAGCAGCTTGTTGATCTC
Cx33cvt LoopF	GGAAAGGCACTTGGAGACAA
Cx33c-termR	TCATCCTCCGCTTTTCTCAT
Cx33nestF	GCAGTTCAAGTGTGGCAGTG
Cx33Okt09F	TCTTTTCATTTTCCGCATCC
Cx33Okt09R	GCTCTCCTGCAATTGTCTCC
Cx33Okt09EN	TTGGAGTGACGAGCAGTTTG
Cx36cvt LoopE	TTCCTAGCCCTGGACAGAGA
Cx36c-termB	
Cx36cvtl oon Friest	GAGGGAGCAAACGAGAAGAT
Cx37cvtl oopF	
Cx37ctermR	ATGAGAGCCCGTTGTAGGTG
Cx37nestR	GGTAAGGGTCTGAGGCACTG
Cx39cvtl oopF	AGGTGCCCGACCTGTCTACT
Cx39c-termR	

Primor-Namo	Sequenz 5'->3'
Cx39c-termRNest	
Cx40forw	
Cx40Okt09R	GTTTGGCACTTCCCCAGTG
Cx40Okt09FN	
Cx40Okt09RN	
Cx43Forw	AACAGICIGCCIIICGCIGI
Cx43Rev	GAGCGAGAGACACCAAGGAC
Cx43Revnest	GAGAGGAAGCAGTCCACCTG
Cx43Okt09F	GAACACGGCAAGGTGAAGAT
Cx43Okt09R	GAGCGAGAGACACCAAGGAC
Cx43Okt09FN	GTGGCCTGCTGAGAACCTAC
Cx45 forw	TTTGTGTGCAACACAGAGCA
Cx45Rev	CTGGGCAATATTGGCTTTGT
Cx45Forw nest	AAGAGCAGAGCCAACCAAAA
Cx45Okt09F	GAAACGGAAGAGGACCATGA
Cx45Okt09R	CCCAAACCCTAAGTGAAGCA
Cx45Okt09FN	AAGAGCAGAGCCAACCAAAA
Cx46F	AGGAGAGACAACCCTCAGCA
Cx46R	CCTGCTTGAGCTTCTTCCAG
Cx46Nested F1 PCR	AGAAAGAGCGGGGAGGAAGAG
Cx46Nested R1 PCR	TTTGCCTGTACTGTGGGGACA
Cx47cvtl oopE	
	COTEGTOATETACETEETT
Cx47Feb10Epost	
Cx47 Feb Tornest	
CX50Okt09R	GCGACTGATAACATGAAGAGGA
Cx50Okt09FN	GAAAGGACCGTGAAGCTGAG
Cx50Okt09RN	
Cx57No3F	
Cx57No3R	CATCTCGGCATCAGGAAAAT
Cx57PetR	AAGCCGTCATTGTACCGAAC
Cx57No3Fnest	CAGCAGTGGGAACACTGAGA
Cx degeneriertaF	SCTSTTCATYTTCMGMATBCT
Cx degeneriert aFnest	TGYRAVAAYGTCTGYTAYGA
Cx degeneriert αR	AAGATRGTYTTCTCNGWRGG
Cx degeneriert βF	CTMTGGKCYCTGCAGCT
Cx degeneriert βFnest	YMCTGCAGMTBATCHTBGT
Cx degeneriert βR	KGGRAYGWARCARTYYAC
CxAlphBetGam1F	TGYAAYACNVNNCARCCNGGBTG
CxAlphBetGam2F	TGYAAYACNVNNCARCCNGGBTGYVMVAAYGTCTGCTA
-	YGA
CxBeta1F	TTCCCSRTSTCYMACRTSCGVCTMTGGKCYCTGCAGCT
CxBeta2F	CGVCTMTGGKCYCTGCAGCTBATC
CxBeta3F	CGVCTMTGGKCYCTGCAGCTBATCHTBGT
	· R R

Primer-Name	Sequenz 5'→3'
CxGamma1F	CTGCTRGAGGAGATCCACAA
CxGamma2F	AGCAYGATGGSCGRCGACGMAT
GAPDH mm for	GACTCCACTCACGGCAAATTC
GAPDH mm rev	CACATTGGGGGTAGGAACAC
GlutSynthF	GCGACATGTACCTCCATCCT
GlutSynthR	TGGGGTCAAAGGTTGCTATC
GlutSyntNestR	ACCCGATGCAAGATAAAACG
HCN4Forw	CTCCTCCAGGTCACCATCAT
HCN4Rev	TGAGCTTCAGGTCCTGTGTG
HCN4ForwN	CAGCCTCCTGGAGAGTTGTC
Mutagenese t67r	ACTAGTCCAGTGTGGTGGAARTCATGGCGACC
Mutagenese c823g	CCTGTGCCCTGGGCGCCTCACCT
Mutagenese c1001t	ATCTTCCGCAAGAGCAACTTCATCTTCGACAAACTAAAC
Mutagenese a2062g	CCGAGAACAGTTGTGAGTACTGTGGAGTTTTGAGG
Mutagenese c1124t	CCACATCAAGTCGCTGAACCGGCTGGACT
MutKozak-t67r forw	ACTAGTCCAGTGTGGTGGAARTCATGGCGACC
Mutc823g Forw	CCTGTGCCCTGGGCGCCTCACCT
Mutc1001tForw	ATCTTCCGCAAGAGCAACTTCATCTTCGACAAACTAAAC
Mutc1124tForw	CCACATCAAGTCGCTGAACCGGCTGGACT
Muta2062gForw	CCGAGAACAGTTGTGAGTACTGTGGAGTTTTGAGG
Muta t85g	GCGAATTCACTAGTGATTATTGAAGTCATGGCGACCGC
	G
Mutat85g antisense	CGCTTAAGTGATCACTAATAACTTCAGTACCGCTGGCG
	C
Panx1 cds nest F	GCTGCTCAGCCTCATTAACC
Panx1 cds nest R	TTCTTCTCCCCATTGTTTGC
Panx1 cds R	TTAGCAGGACGGATTCAGAA
Panx1_SC_F1	AGGCCACGGAGTATGTGTTCT
Panx1_SC_R1	AGCGCGGTTGTAGACTTTGTCA
Panx1_SC_R2	AGAGAAGCGCCAGAAGAGTG
Panx1SondeNeu1F	ATGTCTGAAGGTGCTGGAGAA
Panx1SondeNeu1R	TTCTTCTCCCCATTGTTTGC
Panx1SondeNeu2F	AGCCCACCTTCGATGTTCTAC
Panx1SondeNeu2R	TACGTGGGAATTTTTCCATCA
Panx1Exon5F	GCAAACAATGGGGAGAAGAA
Panx1Exon5R	GCTCTCTAGAAGCCCCAGGT
Panx1Exon5RNest	TCCTCTAGCACCTGCCAGTC
Panx2 full length EcoF	ATTGAATTCATGGCGACCGCGCTGCTGGCG
Panx2 full length Xhol R	AACCTCGAGTACCCAAGCCTAGGCTCAGC
Panx2fullEGFPanxhoF	AACCTCGAGATGGCGACCGCGCTGCTGGCG
Panx2NeufullXhoF	AACATATCACTCGAGATGGCGACCGCGCTGCTGGCG
Panx2lens/brainF	GGAAGACAGCCACAGACACA
Panx2lens/brainR	ACAACTGTTCTCGGCTCCTC
Panx2ScF1	ACAGGTGTGGACATCGTCTTG
Panx2ScR1	TGTCTGTGGCTGTCTTCCTG
Panx2ScR2	AGTGGGGATCCACTTCATTTTC
Panx2Petra1	AACCTCGAGAAACTCCACAGTACTCACAAC
Panx2fullEGFPecoR	AGCGAATTCCCAAAACTCCACAGTACTCAC
Panx2Neufull EcoR	AGCGAATTCCCAAAACTCCACAGTACTCACAACTGTTCT
Panx2intronspF1	AGCCTGATGGTTCTGCTGAG
Panx2intronspF2	AGGCCCCGTAAGAAAATGAAGTG

Primer-Name	Sequenz 5'→3'
Panx2 intronspR1	AGTGAGCAGACATGGAATGATCC
Panx2Exon2F	GACCACATCAAGTCGCTGAA
Panx2Exon2R	TGTCTGTGGCTGTCTTCCTG
Panx2Exon2RNest	CTTGGGCTTCTCAGTCTTGC
Panx2 AK F	CAGGAAGACAGCCACAGACA
Panx2 KozakBamF	AGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAGTCATG
	GC
Panx2KozakR	TTGCTGTTTTCCACGCGCATAATGGCCAGCTGCTCC
Panx2AK R	GCGGGTATGCTTTTCTCAG
Rho mmF1	ATCACCACCACCTCTACACA
Rho mm R1	AGTCGTCATCTCCCAGTGGAT
Rho mm F2	AGCCACACTTGGAGGTGAAAT
Rho mmR2	AAGCAAAGAAAGCTGGCAGAG
RhoNeuF	TGTTCATGCGGGATTGACTA
RhoNeuR	AGCAAAGAAAGCTGGCAGAG
RhoNeuFnest	GCCTGAGGTCAACAACGAAT
RhoNeuRnest	TGGCAGAGTCATGAAGATGG

## Degenerierte Primer im Connexin-Alignment:

Primer-Kombination "Cx d	egeneriert α":
Cx degeneriert α F	(GC)CT(GC)TTCAT(CT)TTC(AC)G(AC)AT(GCT)CT
	SCTSTTCATYTTCMGMATBCT
Cx degeneriert α Fnest	TG(CT)(AG)A(AGC)A A(CT)GTCTG(CT)TA(CT)GA
-	TGYRAVAAYGTCTGYTAYGA
Cx degeneriert α R	AAGAT(AG)GT(CT)TTCTC(AGCT)GT(AG)GG
-	AAGATRGTYTTCTCNGWRGG

#### *Primer*-Kombination "Cx degeneriert $\beta$ ":

CT(AC)TGG(GT)C(CT)CTGCAGCT
CTMTGGKCYCTGCAGCT
(CT)(AC)CTGCAG(AC)T(GCT)ATC(ACT)T(GCT)GT
YMCTGCAGMTBATCHTBGT
(GT)GG(AG)A(CT)G(AT)A(AG) CA(AG)T(CT)(CT)AC
KGGRAYGWARCARTYYAC

Cx47	ATGAGCTGGAGCTTCCTGACGCGGCTGCTGGAGGAGATCCACAATCATT-CCAC 5	i3
Cx36	ATGGGGGAATGGACCATCTTGGAGAGGCTGCTGGAAGCCGCGGTGCAGCAGCACT-CCAC 5	9
Cx45	ATGAGTTGGAGCTTCCTGACTCGCCTGCTAGAGGAGATCCACAACCATT-CGAC 5	i3
Cx30.3	ATGAACTGGGGATTTCTCCAGGGAATCCTGAGTGGTGTGAACAAGTACT-CCAC 5	i3
Cx31.1	ATGAACTGGAGTGTTTTTGAGGGACTCCTGAGCGGAGTCAACAAGTACT-CCAC 5	i3
Cx31	ATGGACTGGAAGAAGCTCCAAGACCTATTGAGTGGCGTGAACCAGTACT-CCAC 5	i3
Cx32	ATGAACTGGACAGGTCTATACACCTTGCTCAGTGGCGTGAATCGGCACT-CTAC 5	i3
Cx26	ATGGATTGGGGCACACTCCAGAGCATCCTCGGGGGTGTCAACAAACACT-CCAC 5	i3
Cx30	ATGGACTGGGGGACCCTGCACACCGTCATCGGTGGCGTGAACAAGCACT-CTAC 5	i3
Cx50	ATGGGCGACTGGAGTTTCCTGGGAAACATCTTGGAAGAGGTGAATGAGCACT-CCAC 5	6
Cx43	ATGGGTGACTGGAGCGCCTTGGGGAAGCTGCTGGACAAGGTCCAAGCCTACT-CCAC 5	6
Cx33	ATGAGTGATTGGAGTGCCTTACACCAGCTCCTAGAAAAGGTTCAACCCTACT-CCAC 5	6
Cx37	ATGGGCGACTGGGGCTTCCTGGAGAAGTTGCTAGACCAGGTCCAGGAACACT-CGAC 5	6
Cx46	ATGGGCGACTGGAGCTTCCTGGGGCGGCTGCTGGAGAACGCACAGGAGCACT-CTAC 5	6
Cx57	ATGGGAGATTGGAATTTACTGGGTGGCATCCTAGAGGAAGTCCACTCCCACT-CCAC 5	6
Cx40	ATGGGTGACTGGAGCTTCCTGGGGGGGGTTCCTGGAGGAGGTCCACAAGCACT-CCAC 5	6
Cx30.2	ATGGGGGAGTGGGCGTTCCTAGGCTCCCTGCTGGACGCGGTGCAGCTACAGT-CGCC 5	6
Cx39	ATGGAGAAGTTGAACTTGTTGGGATTCCTCATCATCACCTTA-AACTGTAACGTGAC 5	6
Cx29	ATGTGCGGCAGGTTCCTGAGACAGCTATTGGCTCAGGAGAGCCAGCACT-CCAC 5	53
Cx23	ATGTCTCTAAATTACATCAAGAACTTCTATGAAGGATGTGTTAAGCCTCCAAC 5	53
Cx47	CTTCGTGGGCAAAGTTTGGCTCACTGTGCTGGTGGTCTTCCGCATTGTGCTGACAGCCGT 1	.13
Cx36	TATGATTGGGAGGATCCTGTTGACTGTGGTGGTGGTCTTCCGGATACTCATTGTGGCCAT 1	.19
Cx45	ATTTGTAGGGAAGATCTGGCTCACTGTGCTGATTGTCTTTCGAATTGTCCTAACTGCTGT 1	.13
Cx30.3	GGCACTGGGCCGCATCTGGCTGTCTGTGGTCTTCATCTTCCGGGTGCTGGTGTATGTGGT 1	.13
Cx31.1	AGCCTTTGGTCGCATCTGGCTGTCTCTGGTCTTCCGTGTGCTGGTGTACCTGGT 1	.13
Cx31	GGCATTTGGGCGCATCTGGCTGTCAGTAGTGTTCGTCTTCCGGGTGCTGGTGTACGTGGT 1	.13
Cx32	AGCCATTGGCCGAGTATGGCTGTCTGTCATCTTCATCTTCAGAATCATGGTGCTGGTGGT 1	.13
Cx26	CAGCATTGGAAAGATCTGGCTCACGGTCCTCTTCATCTTCCGCATCATGATCCTCGTGGT 1	.13
Cx30	CAGCATAGGGAAGGTGTGGATCACGGTCATCTTTATTTTCCGAGTCATGATCCTAGTGGT 1	.13
Cx50	TGTCATCGGCAGAGTCTGGCTCACAGTGCTCTTCATCTTCCGCATCCTCATCCTCGGGAC 1	.16
Cx43	GGCCGGAGGGAAGGTGTGGCTGTCGGTGCTCTTCATTTTCAGAATCCTGCTCCTGGGGAC 1	.16
Cx33	AGCTGGAGGAAAGGTATGGATCAAGGTTCTTTTCATTTTCCGCATCCTGCTCCTGGGCAC 1	.16
Cx37	CGTGGTGGGCAAGATCTGGTTAACGGTGCTCTTCATCTTCCGCATCCTCATCCTGGGGCT 1	.16
Cx46	AGTCATCGGCAAAGTGTGGCTGACCGTGCTGTTCATCTTCCGCATTCTGGTGTTAGGGGC 1	.16

Cv57	ͲϪͲϪϹͲϹϹϹϹϪϪϹϪͲϹͲϹϹϹͲϹϪϹϹϪͲ <mark>ϹϹͲϹͲͲϹϪͲϹͲͲϹϹϲ</mark> ϪϪͲϹϹͲϹϹͲϪϹͲͲϹϹͲϹͲ	116
CxJ7		116
CX40		116
Cx30.2		116
Cv20		113
Cv23	TETELTCECCOLCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCOCCACTOCICCACTOCICCOCCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICACTOCICCACTOCICCACTOCICACTOCICCACTOCICACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICCACTOCICACTOCICCACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICACTOCICAC	113
OA25		115
Cx47	CGGTGGTGAGT-CCATCTATTCAGATGAGCAATCCAAGTTCACCTGCAACACGCGGCAAC	172
Cx36	TGTAGGGGAGA-CGGTGTACGATGATGAGCAGACCATGTTTGTGTGCAACACCCTACAGC	178
Cx45	AGGAGGAGAGT-CCATCTACTATGATGAACAAAGCAAATTTGTGTGCAACACAGAGCAGC	172
Cx30.3	GGCGGCAGAGG-AGGTGTGGGACGACGATCAAAAGGATTTCATCTGCAATACCAAGCAGC	172
Cx31.1	GACAGCTGAGC-GCGTGTGGGGAGACGACCAGAAGGATTTTGACTGCAACACCAGGCAAC	172
Cx31	GGCTGCCGAGC-GTGTGTGGGGTGACGAGCAAAAAGACTTTGACTGTAACACCAGGCAAC	172
Cx32	GGCTGCTGAGA-GCGTGTGGGGGGGGATGAGAAGTCCTCTTTCATCTGTAACACCCTCCAGC	172
Cx26	GGCTGCAAAGG-AGGTGTGGGGGAGATGAGCAAGCCGATTTTGTCTGCAACACGCTCCAGC	172
Cx30	GGCTGCCCAGG-AAGTGTGGGGTGATGAGCAGGAGGACTTTGTCTGCAACACTCTGCAGC	173
Cx50	AGCAGCGGAGT-TTGTGTGGGGGCGATGAGCAATCTGATTTTGTATGCAACACCCAGCAGC	175
Cx43	AGCGGTTGAGT-CAGCTTGGGGTGATGAACAGTCTGCCTTTCGCTGTAACACTCAACAAC	175
Cx33	TGCTATCGAGT-CGGCTTGGAGTGACGAGCAGTTTGAGTTCCATTGCAACACTCAGCAGC	175
Cx37	GGCTGGCGAGT-CGGTGTGGGGCGACGAGCAGTCTGATTTTGAGTGTAACACAGCCCAGC	175
Cx46	GGCAGCCGAGG-AGGTGTGGGGCGACGAGCAATCGGACTTCACCTGCAACACACAGCAGC	175
Cx57	CGCTGCTGAGG-ACGTCTGGGATGATGAGCAGTCCGCCTTTGCCTGCAACACCCAGCAGC	175
Cx40	CGCTGCTGAGT-CCTCCTGGGGAGATGAGCAGGCCGACTTCCGGTGCGATACCATTCAGC	175
Cx30.2	GGTGGGAGGTG-CGGTGTTCGAGGACGAGCAGGAGGAGTTCGTGTGTAACACGTTGCAGC	175
CX39		170
CX29		172
CX23	-GCTGGGCTTTGCTGTCTACGGGAATGAGGCGTTGCACTTCAGCTGTGACCCCAGACAAGC	1/2
Crr 47		222
Cx36	CCCCCTCTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	232
Cv45	CCCCCTCTCTCCCCTCTCCCCTCTCCCCCTCTCCCCCTCT	230
Cx30 3		232
Cx31.1	CGGGCTGTACCAATGTCTGCTACGATGAGTTCTTCCCCCGTGTCTCACGTGCCCCCTCTGGG	232
Cx31	CCGGCTGTACCAACGTGTGCTATGACAACTTCTTCCCCCATCTCCAACATCCGACTCTGGG	232
Cx32	CGGGCTGCAACAGCGTCTGCTATGACCATTTTTTTCCCCCATCTCCCACGTGCGCCTATGGC	232
Cx26	CTGGCTGCAAGAATGTATGCTACGACCACCATCTCCCCATCTCACATCCGGCTCTGGG	232
Cx30	CAGGGTGCAAGAACGTCTGCTATGACCATTTCTTCCCCGGTGTCTCACATCCGGCTCTGGG	233
Cx50	CAGGCTGTGAGAATGTCTGCTACGATGAGGCCTTTCCCATCTCACACATCCGCCTCTGGG	235
Cx43	CCGGTTGTGAAAATGTCTGCTATGACAAGTCCTTCCCCATCTCTCACGTGCGCTTCTGGG	235
Cx33	CTGGTTGTGAAAATGTCTGCTATGACCATGCCTTCCCAATCTCTCACGTGCGCCTCTGGG	235
Cx37	CGGGCTGCACCAACGTCTGCTATGACCAGGCCTTCCCCATCTCCCACATCCGATACTGGG	235
Cx46	CAGGCTGTGAGAACGTCTGCTACGACCGCGCTTTCCCCATTTCGCACATCCGCTTCTGGG	235
Cx57	CCGGTTGCAACAATATCTGTTACGATGATGCTTTCCCCATCTCTTTGATCAGATTCTGGG	235
Cx40	CTGGTTGCCAAAATGTCTGCTATGACCAAGCCTTCCCCATCTCCCACATTCGTTATTGGG	235
Cx30.2	CCGGCTGTCGCCAGACCTGCTACGATCGCGCCTTCCCGGTGTCCCACTACCGCTTCTGGC	235
Cx39	CAGGATGTGCCAACGTTTGCTACGACCTCTTTTCCCCAGTGTCACCGCTGCGATTCTGGC	235
Cx29	CAGGCTGCAAGACCATTTGCTATGATGTCTTCCGCCCTCTCTCCCATTGCGCTTCTGGG	232
Cx23	GAGAGATAAACCTGTTCTGTTACAATCAGTTCCGGCCAATAACTCCCCAAGTGTTCTGGG	232
Cx47	TCTTCCAGATAGTGGTCATCTCCACACCTTCTGTCATGTACCTGGGCTATGCAGTCCACC	292
Cx36	TCTTCCAGATCATAATGGTGTGCACCCCCAGTCTCTGTTTTATCACCTATTCTGTGCACC	298
Cx45	TATTCCAGATCATCCTGGTTGCAACTCCCTCTGTGATGTACCTGGGATATGCTATTCATA	292
Cx30.3	CCCTGCAGCTCATCCTGGTCACCTGTCCTTCCCTGTTAGTGGTCATGCATG	292
Cx31.1	CTCTGCAGCTCATCCTGGTCACCTGCCCCTCTTTGCTTGTGGTCATGCATG	292
Cx31	CCCTGCAGCTCATCTTCGTCACGTGTCCGTCTATGCTGGTCATCCTGCATGTAGCCTACC	292
Cx32	CCCTGCAGCTTATCTTGGTTTCCACCCCAGCTCTCCTCGTGGCAATGCACGTAGCTCACC	292
CX26		292
CX30 CX50		293
Cx43		295
Cv33		295
Cx37	TGCTGCAGTTCCTCTTCGTCAGCACCACCCCCCCGATCTACCTGGGCCCACGTCATCTACC	295
Cx46	CGCTGCAAATCATCTTCGTGTCTACGCCCACCCTCATCTATCT	295
Cx57	TTTTTGCAGATCATCTTTGTGTGTCTTCCCCCTTCTTTGGTGTATATGGGGCCCATGCCCTTTATA	295
Cx40	TACTGCAGATCATCTTTGTGTCCACGCCTTCTCTAGTGTACATGGGCCATGCCATGCACA	295
Cx30.2	TCTTCCACATCCTGCTGCTGTCGGCGCCGCCGGTGCTGTTCGTCATCTACTCCATGCACC	295
Cx39	TAGTGCAGAGCCTGGCCTTGCTTCTGCCTTCGGTGGTCTTTGGCACTTACACCCTACACC	295
Cx29	CCTTCCAAGTCATTCTGATGGCTGTACCCAGTGCCATTTATGTGGCTTTCACTCTGTATC	292
Cx23	CATTGCAGCTAGTGATTGTCCTGCTTCCTGGAGCTATTTTCCACCTGTATGCTGCATGCA	292
Cx47	GCTTGGCGCGGGCCTCGGAACAGGAGCGCAGACGCGCTCTCCGACGTCGCCCTGGCACCC	352
Cx36	AATCCGC-CAAGCAGCGAGAACGCCGGTACTCTACTGTCTTCCTAGC	344
Cx45	AGATTGCCAAAATCGGAGCATGGCC-	315
CX3U.3	GTGAAGAGCGAGAAAGGAAA	312
CX31.1	GARAGGUTUGAGAGAAGAAG	312 210
CX31	GUGA GUAGUGGGAALGGAAG	ンエZ 21つ
CX32		ು⊥ು ३1.4
CX20		ンエや 317
Cx50		336 J1/
Cx43	TGATGAGAAAGGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGA	336
Cx33		336
Cx37	TGTCTCGGCGGGAAGAGGCGGTTGCGGCAGAAAGACCCACAC	336
Cx46	TCGTGCGCATGGAGGAGAAGAAGAAGAAGAGGGGGAGGAAGAG	336
Cx57	GACTCAGGGACTTTGAGAAGCAGAGGGGGGGGGAGAAGAAGTTA	336
Cx40	CTGTGCGCATGCAGGAAAAGCAGAAATTGCGGGATGCTGAG	336
Cx30.2	AGGCCAGCAAGGAGGCGGGTGGTGCGCAG	324
Cx39	GCGGTGCGAAGCTGGCTGCAGTGGGG	321
Cx29	ATGTGATTGGATACTGGGAGGTACCAGGAAAGGA	326
Cx23	AA	294
Cx47	GGCGCTTGCCCAGGGCGCAGCTGCCACCGCCGCCACCTGGCCGGCC	412
Cx36	CCTGGACAGAGACCCTGCTGAGTCTATAGGGGGGACCTGGAGGAACTGGGGG	395
Cx45	GAGGCAGACAAGAAGGCAGCT-CGGAGCAAACCCTATGCCAT-GCGT	360
Cx30.3	AT	336
Cx31.1	AG	334
CX31	AA	336
Cx32	CC	340
UA20		243
Cv30		311
Cx30 Cx50	TCATGARGGARGATAAAGAACGAGT TTATACGTGGGGGAGAAGAAACGAGT GAGCTCTGTCAGCAGTCGCGCAGCAACGGGTACCAABTCGCCCCACACCAC	344 396

Cx33	CTGGAAGCTGCTCATTTTAATGAGGCCAGCGTGGAAAGGCACTTGGAGACAATT	390
Cx37	CTCCGGGCGCTGCCATCCAAGGACCTACATGTAGAGCGGGCACTGGCTGCCATC	390
Cx46	CTGCTGAGGAGAGACAACCCTCAGCACGGCCGTGGTCGCGAGCCAATGCGTACAGGGA	394
Cx57	TACCTTAGAGCCCAGATGGAGAATCCAGAGCTCGACCTGGAGGAGCAACAAAGGGTA	393
Cx40	AAAGCTAAAGAGGCCCACCGCACTGGTGCCTATGAGTACCCAGTAG	382
Cx30.2	GT	301
Cx29	AAACAAGGAGCAAGAGACCCAGATTAGCAAAGG	359
Cx23	AGCATCAATCAAG	307
Cx47	TGGGAGAGGCGGAGCCCATATTGGCTCTAGAGGAGGATGAGG-ACGAGGAGCCGGGGGGG	471
Cx36	TGGGGGCAGCGGAGGGAGCAAACGAGAAGATAAGAAGTTGCAAAATGCCATTGTCA	451
Cx45	TGGAAACAGCACCGGGCTCTGGAAGAAACGGAAGAGGACCATGAAG	406
Cx30.3	GCCCCAGCCCTGTACAGCAACCTGAGCAAGAAGAG	371
Cx31.1	GTTACCTTTACCCGAATCCCGGCAAGAAGCG	365
Cx31 Cv32		383
Cx26	TTAAGGACATCGAAGAGATCAAAAACCCAGAAGGTCCGTATCGA	386
Cx30	TTAAAGACCTGGAGGACATCAAACGGCAGAAGGTGCGCATTGA	387
Cx50	GCCAGCATCCGGAAGAGCAGCAGCAGTAGCAAAGGCACCAAGAAGTTCCGGCTGGA	452
Cx43	GAAATCAAGAAGTTCAAGTATGGGATTGAAGAACACGGCAAGGTGAAGATGAG	443
Cx33	GCAGGAGAGCAGTTCAAGTGTGGCAGTGAAGAACAGAGTAAGGTGAAAATGAG	443
Cx37	GAACATCAGATGGCCAAGATCTCGGTGGCAGAGGACGGTCGTCTTCGGATTCG	443
Cx46 Cw57	GCCCGCGGGACCCTCCACTACGCGATGACCGTGGCAAGGTGCGCATCGC	443
Cx37		449
Cx30.2	GCCGAGGCGCCGTGCTCCCCGTGCGCCCTGCGCGCCT	387
Cx39	GCCCGACCTGTCTACTGCCTACCTGGTGCACC	373
Cx29	GGATCATAGCAAGGATGTCTCAGGGGCTAAAAGCC	394
Cx23	ACTGCATTCTTCAGAAGCCCGT	329
Cx47	CCCGAGGGCCCCGGAGAAGACACGGAGGAGGAGCGAGCG	529
Cx36	ATGGGGTGCTGCAGAACACAGAGACCACCAGTAAGGAGACAGAACCAGATTGCTTA	507
Cx45	AGGATCCTATGATGTATCCAGAGATGGAGTTAGAAAGC-GAAAAA	450
CX30.3		428
Cx31		422
Cx32	AGGGACACTGTGGTGGACCTATGTCATCAGTGTGGTGTTCCGGCTGCTGTTCGAGGC	440
Cx26	AGGGTCCCTGTGGTGGACCTACACCACCAGCATCTTCTTCCGGGTCATCTTTGAAGC	443
Cx30	GGGCTCCCTGTGGTGGACGTACACCAGCAGCATTTTCTTCCGCATCATCTTCGAAGC	444
Cx50	GGGCACACTGCTAAGGACCTATGTCTGCCACATCATCTTCAAGACCCTCTTTGAGGT	509
Cx43	AGGTGGCCTGCTGAGAACCTACATCATCAGCATCCTCTTCAAGTCTGTCT	500
Cx33	AGGCAGATTGCTGCTAACCTACATGGCCAGCATCTTCTTCAAGTCTGTCT	500
Cx3/	TGGGGCGCTCATGGGTACCTATGTGGTCAGCGTGCTGTGTAAGAGTGTGCTGGAGGC	500
Cx40 Cx57		506
Cx40	GGGCACCCTACTCAACACCTATGTCTGCACCATTCTGATCCGCACCACCATGGAGGT	494
Cx30.2	CGCCGCGCGCGC-CGCTGCTACCTGCTGAGCGTGGCTCTGCGCCTGCTCGCCGAGCT	443
Cx39	TACTGC-TGCGCATGCTGCTGGAGGCCGGGCTGGCCTTCCTGCACTACTTTCTCTTT	429
Cx29	TCAAGCTTCTCTGGGCCTATGTGGCACACCTTGGGGTACGGCTGGCCCTTGAGGG	449
Cx23	GTACACTGTGATTTACGTCCTCTCGGTCTTGTTAAGAATCAGCCTGGAGGT	380
Cx47	GGGGCGGAGGTGATGGCAAGACGGTGGTCACTCCTGGCCCGGCCGG	588
Cx36	GAGGTTAAAGAGCTGACTCCACATCCATCTGGGCTGCGCACAGCAGCAA-GGTCCA	562
Cx45	GAAAATAAAGAGCAGAGCCAACCAAAACCTAAGCAT-GATGGC	492
Cx30.3		400
Cx31	GGTCTTCCTGTACGTCTCCACA-CGCTCTGGCATGGCCTTCACCATGCCGCGCTCTGGT	485
Cx32	TGTCTTCATGTATGTCTTCTATC-TGCTCTACCCCGGCTATGCCATGGTGCGGCTGGT	497
Cx26	CGTCTTCATGTACGTCTTTTACA-TCATGTACAATGGCTTCTTCATGCAACGTCTGGT	500
Cx30	CGCCTTCATGTATGTGTTCTACT-TCCTCTACAATGGGTACCACCTACCCTGGGTACT	501
Cx50	GGGCTTCATCGTGGGCCATTACT-TCCTGTATGGTTTCCGCATCCTGCCCCT	560
Cx43	GGCCTTCCTGCTGATCCAGTGGT-ACATCTATGGGTTCAGCCTGAGTGCGGTCTA	554
Cx33	GGCCTTCCTCCTGATCCAGTGGT-ACATTTATGGATTTACTCTGAGTGCCCTTTA	554 554
Cx46	GGGGTTCATCGCGGGCCAGTACT-TTCTATACGGCTTCCAGCTGCAGCCACTTTA	554
Cx57	AGGGTTCATGATAGGCCAATATA-TTCTCTATGGGTTTCAAATGCACCCCATTTA	560
Cx40	GGCCTTCATCGTAGGCCAGTACC-TCCTCTATGGGATCTTCCTGGATACCCTGCA	548
Cx30.2	GGCTTTCCTGGGCGGCCAGGCGC-TGCTCTACGGCTTCCGCGTGGACCCGCACTA	497
Cx39	GGCTTTTCTGTGCCCGCCCGCG-TGTCTTGCTCGCATGTACCCT-GCTCAG	478
Cx29 Cx23	AGCAGCTCTAGGTGTTCAGTACA-ATCTGTATGGTTTCAAGATGTCCAGCACTTT GTTCGCATTCTGGCTTCAGATTC-ACCTCTTCGGCTTCCAAGTGAAGCCGATATACT	503 436
C×47	CGCCCACCCATCCAGAGGGAGGGCCTGGATCCCTCTCTCCTCCTCCCCCCCC	648
Cx36	-AGCTCCGAAGACAGGAAGGTATCTCCCGCTTCTACATCATCCAAGTGGTGTTTCGA	618
Cx45	CGACGACGAATTCGAGAGGATGGGCTCATGAAAATCTATGTGTTGCAGCTGCTGGCCAGG	552
Cx30.3	AGCTTGCTCTGTGACTCCCTGCCCCACACTGTGGACTGTTACATCG-CCCGA	537
Cx31.1	CAAGTGCCATGCGGAGCCGTGTCCCAACACAGTGGACTGCTTCATTG-CCAAG	531
Cx31	ACAGTGCGCCAGCATAGTACCCTGCCCCAACACCGTGGATTGCTACATCG-CTCGG	540
CX32		549 550
Cx20	GAAATGUAAUGUIIGGUUUTGUUUUAATAUAGTGGACTGUTTUATTI-CCAGG GAAATGTGGCATTGACCCCTGCCCCAATCCCTGCACTGUTTUATTI-CCAGG	JJ∠ 553
Cx50	CTATCGCTGCAGCCGGTGGCCCTGCCCCAATGTGGTAGACTGCTTTGTAT-CCCGG	615
Cx43	CACCTGCAAGAGAGATCCCTGCCCCCCCCGGGTGGACTGCTTCCTCT-CACGT	606
Cx33	CATCTGTGAGCAGTCTCCTTGCCCACGTCGGGTGGACTGCTTCCTCT-CTCGC	606
Cx37	TGTGTGCCAGCGTGCGCCCTGCCCCCACATCGTGGACTGCTATGTCT-CTCGA	606
Cx46	CCGCTGCGACCGCTGGCCCTGCCCCAACACTGTGGACTGTTCATCT-CCAGG	606
Cx5/	UAAGTGCACCCCAAGCCCCCTGCCCCAATTCAGTGGACTGCTTTGTTT-CCAGG	612
Cx40 Cx30 2	IGICIGUEGUAGGAGTUUUTGTUUUTGTUUUGAUGAGTUAACTGTTATGTTT-CGAGG	000 549
Cx39		532
Cx29	TATATGTCGTGAGGATCCTTGTATTGGCAGCACCACCTGTTTCCAGT-CTCAC	555
Cx23	TGTGTGATACTGAATCTCTTGGTAAAAAACCAAATATTCTAAAATGCATGGTTC-CAGAG	495
Cx47	GCGGCCTTCGAGGTGGCCTTTCTGGTGGGCCAGTACCTACTATACGGCTTCGAGGTGCCA	708
Cx36		678
	AATGCTCTGGAGATTGGGTTTCTGGTGGGCCAGTACTTTCTATATGGCTTCAGTGTTCCA	
Cx45	AATGCTCTGGAGATTGGGTTTCTGGTGGGCCAGTACTTTCTATATGGCTTCAGTGTTCCA ACTGTGTTTGAGGTGGGCTTTCTAATAGGGCAGTATTTCCTGTATGGCTTCCAAGTCCAC	612
Cx45 Cx30.3	AATGCTCTGGAGATTGGGTTTCTGGTGGGCCAGTACTTTCTATATGGCTTCAGTGTTCCA ACTGTGTTTGAGGTGGGCTTTCTAATAGGCAGSTATTCCTGTATGGCTTCCAAGTCCAC CCCACAGAGAAGAGGCTTTCACCTA-CTTCATGGTAGTCACGGCAGCCATTT-GTA	612 592
Cx45 Cx30.3 Cx31.1	AATGGCTCTGGAGATTGGGTTTCTGGTGGGCCAGTACTTTCTATATGGCTTCAATGTTCA ACTGGTTGAGGGGGGCTTTCTAATAGGCAGTATTTCCTGTATGGCTTCCAAGTCAA CCCACAGAGAAGAAGATCTTCACCTA-CTCATGGTAGTC-ACGGCGGCCATTT-GTA CCCTCCGAGAAAAACATCTTCATTGTCTTCATGGTGGTCACGGCCGTCATCT-GCA	612 592 586
Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31	AATGGTCTGGAGATTGGFTTCTGGTGGGCCAGTACTTTCTATATGGCTTCAGTGTTTCA ACTGGTTGAGGGGGGCTTTCTAATAGGCAGTATTTCCTGTATGGCTTCCAGTGCCAC CCCACAGAGAAGAAGGTCTTCACCTA-CTTCATGGTAGTC-ACGGCGGCCATT-GTA CCCTCCGAGAAAAACATCTTCATTGT-CTTCATGGTGGTC-ACGGCCGTCATC-GCA CCCACTGAGAAGAAGGTCTTTACTA-CTTCATGGTGGTC-ACGGCCGTCATCCGCA CCCACTGAGAAGAAGGTCTTTACTA-CTTCATGGTAGGC-GCTTCTCCCGTCT-GCA	612 592 586 595
Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx26	AATGGTCTGGAGATTGGGTTTCTGGTGGGCCAGTACTTTCTATATGGCTTCAATGTTCCA ACTGTGTTGAGGTGGGCTTTCTAATAGGCAGTACTTTCTGATGGCTTCCAAGTCCAC CCCACAGAGAAGAAGGTCTTCACCTA-CTTCATGGTAGTCACGGCAGCCATT-GTA CCCTCCGAGAAAAACATCTTCATTGTCTTCATGGTGGTCACGGCCGTCATC-GCA CCCACCGAGAAAAACATCTTCATTGCTTCATGGTAGGCGCTTCTGCCGTCT-GCA CCCACCGAGAAAAACGTCTTTACTA-CTTCATGGTAGGCGCTTCTGCCGTCT-GCA CCCACCGAGAAAAACCGTCTTCACTGCTTTATGCTCGCAGCCTCCGCATCT-GCA	612 592 586 595 604
Cx45 Cx30.3 Cx31.1 Cx31 Cx32 Cx26 Cx30	AATGCTCTGGAGATTGGGTTTCTGGTGGGCCAGTACTTTCTATATGGCTCAGTGTTCCA ACTGTGTTTGAGGTGGGCTTTCTAATAGGCAGTATTCCTGTATGGCTTCCAAGTCCAC CCCACAGAGAAGAGGCCTTCAACTA-CTTCATGGTAGTC-ACGGCAGCATT-GTA CCCTCCGAGAAAAACATCTTCATGTCTCATGGTAGGTCACGGCCGCCATCT-GCA CCCACCGAGAAAACGTCTTTACATTGCTTATGGTTGGCGCTCTCCGGCATCT-GCA CCCACCGAGAAAACGTCTTCACCGTCTTATGGTTGCGCGCCCCGGCATCT-GCA CCCACCGAGAAAAGCTGTCTCACCGTCTTATGGTTTCTGCGCCCTCGGAATT-GCA	612 592 586 595 604 607 608

Cx43	CCCACGGAGAAAACCATCTTCATCAT-CTTCATGCTGGTGGTGTCCTTGGTGT-CTC	661
Cx33	CCCACCGAGAAAACCATCTTCATCCTCTTCATGTTTGTGGTGTCAGTGGTGT-CTT	661
Cx37	CCCACTGAGAAGACTATCTTCATCAT-CTTCATGCTGGTGGTAGGAGTCATCT-CCC	661
Cx46	CCCACAGAGAAGACCATCTTTGTCATCTTCATGCTGGCTGTGGCCTGTGCGT-CAC	661
Cx57	CCCACAGAGAAGACCATTTTCATGCTTTTCATGCACAGCATTGCAGCCATCT-CCT	667
Cx40	CCCACGGAGAAGAATGTCTTCATTGTCTTTATGATGGCTGTGGCTGGACTGT-CTC	655
Cx30.2	CCCACCGAGAAGACCGTCTTCGTGGTCTTCTACTTCGCCGTCGGGCTGCTGT-CGG	604
Cx39	TCTTTTGGGCAGTGAGTGCGCTATCCTTCCTGCTCAGCTTGGCTGACCTGCTTT-GGA	589
Cx29	CCCTCTGAGAAGACCATCTTCCTCAACATCATGTTTGGGATCAGCGGGGCCT-GTT	610
Cx23	CACTTTGAAAAGACTATTTTCCTCATTGCAATGTACACATTTACTGTGATCA-CGA	550
Cx47	CCCTTCTTTGCCTGCAGCCGCCAGCCTTGCCCCCACGTAGTGGATTGCTTCGTGTCGCGG	768
Cx36	GGGTTGTATGAGTGCAACCGTTACCCCTGCATCAAGGAGGTAGAATGTTATGTGTCTAGA	738
Cx45	CCATTTTATGTGTGCAGCAGACTTCCTTGCCCTCATAAGATAGACTGCTTTATTTCTAGA	672
Cx30.3	TTCTACTCAACCTCAGTGAGGTCGTCTACCTGGTGGGCAAGAGA-TGCATGGAGGTCTTC	651
Cx31.1	TCCTGCTTAACCTTGTGGAGCTGATCTACCTAGTGATTAAGCGG-TGTTCTGAGTGTGCG	645
Cx31	TTATTCTCACCATCTGTGAGATCTGCTACCTCATCTTCCACAGG-ATCATGCGAGGCATA	654
Cv32		663
Cv26		666
Cx20		667
Cx50		720
Cx30		730
CX43	TCGCTUTGAATATCATTGAGCTUTTUTATGTCTTUTTCAAGGGCGTTAAGGATCGCGTGA	721
Cx33	TTGTCTTGGATATCATTGAGCTGTTCTATGTCTTATTTAAGGCTATTAAGAATCGTATGA	721
Cx37	TGGTGCTCAACCTGCTGGAGCTGGTTCACCTGCTGTCGGTGTGTCAGCCGGGAGATAA	721
Cx46	TGGTACTCAACATGCTGGAGATTTACCACCTGGGCTGGAAGAAGCTCAAGCAGGGAGTTA	721
Cx57	TGTTACTCAATATCCTGGAAATATTTCATCTCGGCATCAGGAAAATCATGAGGGCACTCG	727
Cx40	TGTTTCTCAGCCTGGCTGAACTCTACCACCTGGGCTGGAAGAAGATCCGACAGCGCTTTG	715
Cx30.2	CGCTGCTCAGCGTGGCGGAGCTGGGTCACCTGCTCTGGAAGGGTCGCC	652
Cx39	TCCTGCCGAGGAGAAAGACACTGAGGACCACGCAGTGGGTGAATGGAGAGGCTAGACC	647
Cx29	TCTTATTTATTTTCTTGGAGCTTGCGCTTTTGGGTTTAGGGAGGTTTTGGAGGATATACA	670
Cx23	TGGTATTATGTGTTGCTGAGGTTTTTGAGATCATATTTAGAAGATCATGTTTTCTCTTTA	610
Cx47	CCGACCGAGAAGACGGTCTTCTTGCTGGTCATGTACGTGGTTAGCTGTCTATGCTTGTTG	8281314
Cx36	CCTACCGAGAAGACAGTCTTTCTGGTGTTCATGTTTGCTGTGAGCGGCATTTGTGTGGTG	798966
Cx45	CCCACTGAAAAGACCATCTTCCTTCTGATAATGTATGGTGTCACAGGCCTCTGCCTATTG	7321192
Cx30.3	CGTCCCCG-GCGCCGGAAAGCTTCCAGGAGGCACCAACTGCCAGATACGTGCCC	704801
Cx31.1	CAGCTGAG-GAGACCACCCACTGCACATGCAAAGAATGACCCAAACTGGGCC	696816
Cx31	AGCAAGGGCAAGTCCACAAAGAGCATCAGCTCCCCGAAGTCCTCCAGCCGGGCC	708813
Cx32	CAGCGCCGCTCCAATCCGCCCTCCCGCAAGGGCTCGGGCTTCGGCCACCGCCTC	717852
Cx26	AAAAGACCAGTC	678678
Cx30	AAAAGAACACAGGCGCAGAGAAACCACCCCCAACCATGCCCTGAAAGAGAGAGA	719787
Cx50	AGAGGCCTGTAGAGCAACCACTGGGGGGGGAGATTGCTGAGAAGTCCCTCCACTCCA	7861323
Cx43	AGGGAAGAAGCGATCCTTACCACGCCACCACCGGCCCACTGAGCCCATCCAAAGACTG	7791149
Cx33	GAAAAGCGGAGGATGAGGTTTACTGTGATGAGCTACCATGCCCTTCCCATGTCTC	776852
Cx37	AGGCACGAAGGGACCACGACGCCCGCCCGGCCCAGGGCAGTGCCTCAGACCC	7731002
Cx46	CTAACCACTTCAACCCAGATGCCTCAGAAGCCAG-GCACAAGCCCTTGGACCC	7731254
Cx57	ATGGCAAATCCAGCAGTGGGAACACTGAGAACG-AAACAGGCCCTCCATTCCAT	786.1518
Cx40	GCAAGTCACGGCAGGGTGTGGGACAAGCACCAGCTGCCTGGCCCTCCCACC-AGCC	769.1077
Cx30.2	AGCGCGCCAAGCTGCTCCCGCCGCCGCCGCCGTCGCCCTCTTTGCC	698837
Cx39	AGTCTGTGAAGTACCTGCACCTCCCCCTTGCCTCTTACAAAACCCCCCAGGCCT	700 1095
Cx29		719 777
Cx23	AACGATGA	618
U U		

#### 8.4 Gensequenzen mit Primer- und Antikörperbindestellen

Α.						
1	atgtctctaa	attacatcaa	gaacttctat	gaaggatgtg	ttaagcctcc	aactgtgatc
61	ggccagttcc	acactctctt	cttcggctca	gtgcggatgt	tcttcctcgg	agtgctgggc
121	tttgctgtct	acgggaatga	ggcgttgcac	ttcagctgtg	acccagacaa	gcgagagata
181	aacctgttct	gttacaatca	gttccggcca	ataactcccc	aagtgttctg	ggcattgcag
241	ctagtgattg	tcctgcttcc	tggagctatt	ttccacctgt	atgctgcatg	caaaagcatc
301	aatcaagact	gcattcttca	gaagcccgtg	tacactgtga	tttacgtcct	ctcggtcttg
361	ttaagaatca	gcctggaggt	gttcgcattc	tggcttcaga	ttcacctctt	cggcttccaa
421	gtgaagccga	tatacttgtg	tgatactgaa	tctcttggta	aaaaaccaaa	tattct <b>aaaa</b>
481	tgcatggttc	<pre>cagagcactt</pre>	tgaaaagact	attttcctca	ttgcaatgta	cacatttact
541	gtgatcacga	tggtattatg	tgttgctgag	gtttttgaga	tcatatttag	aagatcatgt
601	tttctcttta	aacgatga				
В.						
1	atgtctctaa	attacatcaa	gaacttctat	gaaggatgtg	ttaagcctcc	aactgtgatc
61	ggccagttcc	acactctctt	cttcggctca	gtgcg <mark>gatgt</mark>	tcttcctcgg	<pre>agtgctgggc</pre>
121	tttgctgtct	acgggaatga	ggcgttgcac	ttcagctgtg	acccagacaa	<mark>g</mark> cgagagata
181	aacctgttct	gttacaatca	gttccggcca	ataactcccc	aagtgttctg	ggcattgcag
241	ctagtgattg	tcctgcttcc	tggagctatt	ttccacctgt	atgctgcatg	caaaagcatc
301	aatcaagact	gcattcttca	gaagcccgtg	tacactgtga	tttacgtcct	ctcggtcttg
361	ttaagaatca	gcctggaggt	gttcgcattc	tggct <b>tcaga</b>	ttcacctctt	<pre>cggcttccaa</pre>
421	gtgaagccga	tatacttgtg	tgatactgaa	tctcttggta	aaaaaccaaa	tattctaaaa
481	tgcatggttc	cagagcactt	tgaaaagact	attttcctca	ttgcaatgta	cacatttact
541	gtgatcacga	tggtattatg	tgttgctgag	gtttttgaga	tcatatttag	aagatcatgt
601	+++ctct++>	aacdatda				

Abbildung 8-10. Lage der Connexin23-Primer in der Cx23-Sequenz. Genbank-Accession-Nummer NM 029722.1. A. Primer Cx23Forw, Cx23Rev, Cx23RevNest (rot); Amplikongröße: 505 bp. Die Reverse-Primer liegen hier außerhalb der codierenden Sequenz. B. Primer Cx23Okt09F, Cx23Okt09R, Cx23Okt09FN; Amplikon: 264 bp. Das Gen besteht aus drei Exonen. Exon 1 und Exon 3 sind blau dargestellt.

161

```
Α.
   atggattggg gcacactcca gagcatcctc gggggtgtca acaaacactc caccagcatt
1
61
   ggaaagatet ggeteaeggt eetetteate tteegeatea tgateetegt ggtggetgea
121 aaggaggtgt ggggagatga gcaagccgat tttgtctgca acacgctcca gcctggctgc
181 aagaatgtat gctacgacca ccacttcccc atctctcaca tccggctctg ggctctgcag
241 ctgatcatgg tgtccacgcc agccctcctg gtagctatgc atgtggccta ccggagacat
301 gaaaagaaac ggaagttcat gaagggagag ataaagaacg agtttaagga catcgaagag
361 atcaaaaccc agaaggtccg tatcgaaggg tccctgtggt ggacctacac caccagcatc
421 ttcttccggg tcatctttga agccgtcttc atgtacgtct tttacatcat gtacaatggc
481 ttcttcatgc aacgtctggt gaaatgcaac gcttggccct gccccaatac agtggactgc
541 ttcatttcca ggcccacaga aaagactgtc ttcaccgtgt ttatgatttc tgtgtctgga
601 atttgcattc tgctaaatat cacagagctg tgctatttgt tcgttaggta ttgctcagga
661 aagtccaaaa gaccagtcta a
В.
1
   atggattggg gcacactcca gagcatcctc ggggggtgtca acaaacactc caccagcatt
61 ggaaagatet ggeteaeggt eetetteate tteegeatea tgateetegt ggtggetgea
121 aaggaggtgt ggggagatga gcaagccgat tttgtctgca acacgctcca gcctggctgc
181 aagaatgtat gctacgacca ccacttcccc atctctcaca tccggctctg ggctctgcag
241 ctgatcatgg tgtccacgcc agccctcctg gtagctatgc atgtggccta ccggagacat
301 gaaaagaaac ggaagttcat gaagggagag ataaagaacg agtttaagga catcgaagag
361 atcaaaaccc agaaggtccg tatcgaaggg tccctgtggt ggacctacac caccagcatc
421 ttetteeggg teatetttga agecgtette atgtaegtet tttaeateat gtaeaatgge
481 ttcttcatgc aacgtctggt gaaatgcaac gcttggccct gccccaatac agtggactgc
541 ttcatttcca ggcccacaga aaagactgtc ttcaccgtgt ttatgatttc tgtgtctgga
601 atttgcattc tgctaaatat cacagagctg tgctatttgt tcgttaggta ttgctcagga
661 aagtccaaaa gaccagtcta a
С.
   atggattggg gcacactcca gagcatcctc ggggggtgtca acaaacactc caccagcatt
1
61
   qqaaaqatct qqctcacqqt cctcttcatc ttccqcatca tqatcctcqt qqtqqctqca
121 aaggaggtgt ggggagatga gcaagccgat tttgtctgca acacgctcca gcctggctgc
181 aagaatgtat gctacgacca ccacttcccc atctctcaca tccggctctg ggctctgcag
241 ctgatcatgg tgtccacgcc agccctcctg gtagctatgc atgtggccta ccggagacat
301 gaaaagaaac ggaagttcat gaagggagag ataaagaacg agtttaagga catcgaagag
361 atcaaaaccc agaaggtccg tatcgaaggg teeetgtggt ggaeetaeae caceageate
421 ttcttccggg tcatctttga agccgtcttc atgtacgtct tttacatcat gtacaatggc
```

481 ttcttcatgc aacgtctggt gaaatgcaac gcttggccct gccccaatac agtggactgc 541 ttcatttcca ggcccacaga aaagactgtc ttcaccgtgt ttatgatttc tgtgtctgga

601 atttgcattc tgctaaatat cacagagctg tgctatttgt tcgttaggta ttgctcagga 661 aagtccaaaa gaccagtcta a

Abbildung 8-11. Lage der Connexin26-Primer in der Cx26-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 008125.3. A. Primerkombination A: Cx26DSP, Cx26USP, Cx26 DP4 Amplikon:246 bp B. Primerkombination B: Cx26DSP, Cx26USP, Cx26carpRACE3.1A; Amplikon 271 bp C. Primer: Cx26Okt09F, Cx26Okt09R, Cx26Okt09FN (rot); Amplikongröße: 247 bp. Das Gen besteht aus zwei Exonen. Die vollständige codierende Sequenz liegt auf dem zweiten Exon.

```
Α.
   atgettetge tggagttgee aatcaagtge aggatgtgeg geaggtteet gagacageta
1
61 ttggctcagg agagccagca ctccacccct gtgggggggct tccttcttcc catgctcatg
121 ggattccgtc tcctgatctt ggtttccagt ggacctgggg ttttcggcaa tgatgagaat
181 gaattcatat gtcatttagg gcagccaggc tgcaagacca tttgctatga tgtcttccgc
241 cctctctctc cattgcgctt ctgggccttc caagtcattc tgatggctgt acccagtgcc
361 aacaaggagc aagagaccca gattagcaaa ggggatcata gcaaggatgt ctcagggggt
421 aaaagcetea agettetetg ggeetatgtg geacacettg gggtaegget ggeeettgag
481 ggagcagctc taggtgttca gtacaatctg tatggtttca agatgtccag cacttttata
541 tgtcgtgagg atccttgtat tggcagcaca acctgtttcc agtctcaccc ctctgagaag
601 accatettee teaacateat gtttgggate ageggggeet gtttettatt tattttettg
661 gagcttgcgc ttttgggttt agggaggttt tggaggatat acaagcacaa actttccttc
721 ttaaagaagt tgccaacttc agagagctct gtaagatcca aggacacaac cgatgaattg
781 tcagtggtgg aggcaaaaga gccattttga
B
   atgettetge tggagttgee aatcaagtge aggatgtgeg geaggtteet gagacageta
1
61
   ttggctcagg agagccagca ctccacccct gtgggggggct tccttcttcc catgctcatg
121 ggattccgtc tcctgatctt ggtttccagt ggacctgggg ttttcggcaa tgatgagaat
181 gaattcatat gtcatttagg gcagccaggc tgcaagacca tttgctatga tgtcttccgc
241 cctctctct cattgcgctt ctgggccttc caagtcattc tgatggctgt acccagtgcc
361 aacaaggagc aagagaccca gattagcaaa ggggatcata gcaaggatgt ctcagggggt
421 aaaagcctca agcttctctg ggcctatgtg gcacaccttg gggtacggct ggcccttgag
481 ggagcagctc taggtgttca gtacaatctg tatggtttca agatgtccag cacttttata
541 tgtcgtgagg atccttgtat tggcagcaca acctgtttcc agtctcaccc ctctgagaag
601 accatcttcc tcaacatcat gtttgggatc agcggggcct gtttcttatt tattttcttg
661 gagcttgcgc ttttgggttt agggaggttt tggaggatat acaagcacaa actttccttc
721 ttaaagaagt tgccaacttc agagagctct gtaagatcca aggacacaac cgatgaattg
781 tcagtggtgg aggcaaaaga gccattttga
```

Abbildung 8-12. Lage der Connexin29-Primer in der Cx29-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 080450.4. A. Primer. Cx29cytLoopF, Cx29ctermR, Cx29cytLoopFnest (rot); Amplikongröße: 408bp. B. Primer Cx29Okt09F, Cx29Okt09R, Cx29Okt09FN; Amplikon 344 bp. Das Gen besteht aus drei, die codierende Sequenz aus zwei Exonen. Exon 1 ist blau dargestellt.

```
1
   atggactggg ggaccctgca caccgtcatc ggtggcgtga acaagcactc taccagcata
61
   gggaaggtgt ggatcacggt catctttatt ttccgagtca tgatcctagt ggtggctgcc
121 caggaagtgt ggggtgatga gcaggaggac tttgtctgca acactctgca gccagggtgc
181 aagaacgtet getatgacea tttetteeeg gtgteteaea teeggetetg ggeeetgeag
241 ctgatctttg tgtctacccc agccctgttg gtggccatgc acgtggccta ctacagacat
301 gaaactgccc gaaagtttat acgtgggggg aagagaaacg agtttaaaga cctggaggac
361 atcaaacggc agaaggtgcg cattgagggc tccctgtggt ggacgtacac cagcagcatt
421 ttcttccgca tcatcttcga agccgccttc atgtatgtgt tctacttcct ctacaatggg
481 taccacctac cctgggtact gaaatgtggc attgacccct gccccaatct cgtggactgc
541 ttcatttcga ggccaactga gaaaacggtg ttcactgttt ttatgatttc cgcatccgtg
601 atttgcatgc tgctcaatgt ggccgagttg tgttacctgc tgcttaaatt gtgctttagg
661 agatecaaaa gaacacagge geagagaaae caececaaee atgeeetgaa agagageaag
721 cagaatgaaa tgaatgagct gatctcagat agtggccaga atgcaatcac aagtttccca
781 agttaa
```

Abbildung 8-13. Lage der Connexin30-Primer in der Cx30-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 001010937.1. Primer: Cx30F, Cx30RNested1.PCR, Cx30R (rot); Amplikongröße: 329 bp. Das Gen besteht aus drei Exonen. Die komplette codierende Sequenz befindet sich auf Exon 3.

	gaaagagg	gacccagagg	gacaggtccc	agctgtctct	caaggtcctc	cgctcagctc
	taaggcccag	gtcccggggt	aagtggggtt	ggggacatct	agaggccact	aagggtctac
	agggacggga	cgtggtgtat	tctgtgtgtc	tggggaggct	tacaagagat	gcttgataat
	tgctatcaga	gaggagtcga	gggggctgtg	cccggtctcc	ttggctgagg	ttggtgagga
	agggaagatt	gagggcgggc	gagagatcct	aagttggaaa	aacaggcttc	tgtgtcagct
	tccaacccca	aaaggcgttc	cctgctgcga	ggtgagagag	aaaggagaca	gtgggggctc
	acccggcctg	gccctcccct	tgctcccagg	ggtctcaaac	agaaggaacg	tagaattcta
	gactccagta	gccgctcttg	ctcctggcac	aaaaagccag	gccagcaagg	ttggccctga
	agaagaacct	agaatctggg	gaaccttagg	gtctccctag	ccaagcaggc	ccaggccagg
	tgtgcgggga	aatccctcct	cagcacccct	ctatgcccat	atgaaggaat	cccatagctg
	aggatggact	atcctcacac	tctgacatta	actcattaaa	ccccagaaaa	tattctttcc
	ctggcgccct	ccgagattgt	tgagggacgg	gggtgggggt	gggggtgggg	ggtggcgggg
	gacagggggt	attcagcccg	ccccagcctg	tgactacccc	ctttcctcgt	ccccagcgtc
1	atgggggagt	gggcgttcct	aggctccctg	ctggacgcgg	tgcagctaca	gtcgccgctc
61	gtgggtcgtc	tctggctggt	gatcatgctg	atcttccgca	tcctggtgct	ggccacggtg
121	ggaggtgcgg	tgttcgagga	cgagcaggag	gagttcgtgt	gtaacacgtt	gcagcccggc
181	tgtcgccaga	cctgctacga	tcgcgccttc	ccggtgtccc	actaccgctt	ctggctcttc
241	cacatcctgc	tgctgtcggc	gccgccggtg	ctgttcgtca	tctactccat	gcaccaggcc
301	agcaaggagg	cgggtggtgc	gcagctggcc	ccgccgtgcg	cgcgcgggcg	tgccgaggcg
361	ccgtgctccc	cgtgcgccct	gcgcgctcgc	cgcgcgcgcc	gctgctacct	gctgagcgtg
421	gctctgcgcc	tgctcgccga	gctggctttc	ctgggcggcc	aggcgctgct	ctacggcttc
481	cgcgtggacc	cgcactacgc	gtgcgccggg	ccaccttgtc	cgcacacggt	cgactgtttc
541	gtgagccggc	ccaccgagaa	gaccgtcttc	gtggtcttct	acttcgccgt	cgggctgctg
601	tcggcgctgc	tcagcgtggc	ggagctgggt	cacctgctct	ggaagggtcg	ccagcgcgcc
661	aagctgctcc	cgccgccgcc	gccgtcgccc	tctttgccat	cgcagcgcgg	ggaccccgac
721	cctttcggcc	cgccagccta	cgcgcaccgc	tcaccggcag	gcgacagcga	gggcgaaggc
781	ggcagcggcc	acagcaaagc	gtcgctggct	accgtgcgcc	aggacctggc	catctag

Abbildung 8-14. Lage der Connexin30.2-*Primer* in der Cx30.2-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 178596.2. *Primer* Cx30.2KreutzbP2F, Cx30.2KreutzbR, Cx30.2KreutzbF (rot); Amplikongröße: 740 bp.

1	atgaactggg	gatttctcca	gggaatcctg	agtggtgtga	acaagtactc	cacggcactg
61	ggccgcatct	ggctgtctgt	ggtcttcatc	ttccgggtgc	tggtgtatgt	ggtggcggca
121	gaggaggtgt	gggacgacga	tcaaaaggat	ttcatctgca	ataccaagca	gccaggctgc
181	cccaacgtct	gctatgatga	gttcttcccc	gtgtcccacg	tgcgcctctg	ggccctgcag
241	ctcatcctgg	tcacctgtcc	ttccctgtta	gtggtcatgc	atgtggccta	tcgtgaagag
301	cgagaaagga	aacatcgcct	caaacatggg	cccaatgccc	cagccctgta	cagcaacctg
361	<mark>agca</mark> agaaga	ggggtggcct	gtggtggaca	tacctgctga	gtctcatctt	caaggctgct
421	gtggactctg	gctttctcta	catcttccat	tgcatttaca	aggactatga	catgccccga
481	<mark>gt</mark> ggtagctt	gctctgtgac	tccctgcccc	cacactgtgg	actgttacat	cgcccgaccc
541	acagagaaga	aggtcttcac	ctacttcatg	gtagtcacgg	cagccatttg	tattctactc
601	aacctcagtg	aggtcgtcta	cctggtgggc	aagagatgca	tggaggtctt	ccgtccccgg
661	cgccggaaag	cttccaggag	gcaccaactg	ccagatacgt	gcccaccgta	tgtgatctc <mark>c</mark>
721	aaaggaggtc	accctcaaga	tgagagcgtg	atcctaacaa	aggccgggat	ggccacggtg
781	gatgcaggtg	tgtatccatg	a			

Abbildung 8-15. Lage der Connexin30.3-Primer in der Cx30.3-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 008127. Primer Cx30.3F, Cx30.3R, Cx30.3Fnest (rot); Amplikongröße: 277 bp Das Gen besteht aus zwei Exonen. Die komplette codierende Sequenz befindet sich auf Exon 2.

1	gcattccagg	cgggaggaat	caaggccagg	tctgagcaga	gagaggcaag	gtgggcacag
61	ccccccgaac	cctgagcagg	cacc <b>atg</b> gac	tggaagaagc	tccaagacct	attgagtggc
121	gtgaaccagt	actccacggc	atttgggcgc	atctggctgt	cagtagtgtt	cgtcttccgg
181	gtgctggtgt	atgtggtggc	tgccgagcgt	gtgtggggtg	acgagcaaaa	agactttgac
241	tgtaacacca	ggcaacccgg	ctgtaccaac	gtgtgctatg	acaacttctt	ccccatctcc
301	aacatccgac	tctgggccct	gcagctcatc	ttcgtcacgt	gtccgtctat	gctggtcatc
361	ctgcatgtag	cctaccgcga	ggagcgggaa	cggaagcatc	gccagaagca	cggggagcaa
421	tgcgccaaac	tgtacagcca	cccgggcaag	aagcatggcg	gcctgtggtg	gacctacttg
481	tttagcctca	tcttcaagct	catcatcgaa	ttggtcttcc	tgtacgttct	ccacacgctc
541	tggcatggct	tcaccatgcc	gcgtctggta	cagtgcgcca	gcatagtacc	ctgccccaac
601	accgtggatt	gctacatcgc	tcggcccacg	gagaagaagg	tctttaccta	cttcatggta
661	ggcgcttctg	ccgtctgcat	tattctcacc	atctgtgaga	tctgctacct	catcttccac
721	aggatcatgc	gaggcataag	caagggcaag	tccacaaaga	gcatcagctc	cccgaagtcc
781	tccagccggg	cctccacctg	tcgctgtcac	cacaagctgc	tggagagtgg	cgatccggaa
841	gcagacccag	ccagtgaaaa	gctgcaggct	tcagcgccca	gcctgacccc	catt <b>tga</b> acc
901	aggtgctaga	gaaggggtga	agccgggagg	tgctgcaggt	gaaggggtcc	tgggggcgcc
961	aagtgctccc	actttgaatt	cactaagcta	gccaattgtg	tttgaagcag	gtatttgtgg
1021	gtgctgggct	ctgtgctggc	tacctggttt	aggtagcata	acagacccag	cttccgagag
1081	acatttagat	tagcaaattt	actacaagca	tgcaagggtc	tactagcgct	gggatggtac
1141	<pre>acagggcttc</pre>	tacctactgc	aggggactgc	ccggctgggc	accctctcag	aaaaagcaca
1201	gtgaaagaaa	ggagatgggg	ctctccatca	gacatagcaa	cagcaaaaag	aactggggga
1261	tctcagagga	gaggtgctgg	ctttggactg	gggacagcca	gccagaggga	ggctttacta
1321	ctcaaccatg	agaaggtttg	gcacaacctt	ctggaggcca	aagagcaagt	gtggctagca
1381	ggtctactgc	tgcttgagac	<pre>acacccacgg</pre>	gtccctctca	atccccttt	gccaacctct
1441	accttctccc	tcccaccagg	gtgctgagcc	ctctgcaccc	tgtagccagg	accttggagg
1501	catgcgtatc	ctgtcatatc	cccggcgtat	<pre>atccttgaca</pre>	tatccaagtc	cgtttcctta
1561	aaaqcaataa	agttgtgttt	tatacaaaaa	aaaaaaaaaa	а	

Abbildung 8-16. Lage der Connexin31-Primer in der Cx31-Sequenz GenBank Accession-Nummer NM 008126.2. Primer. Cx31Jan2010F, Cx31Jan2010Rnest, Cx31Jan2010R (rot); Amplikongröße: 279 bp. Die Primer liegen hier in der 3' untranslatierten Region, um vom humanen Cx31 zu unterscheiden. Start- und Stopp-Codon sind in grün dargestellt. Das Gen besteht aus zwei Exonen. Die komplette codierende Sequenz befindet sich auf Exon 2.

```
1 atgaactgga gtgtttttga gggactoctg agoggagtoa acaagtacto cacagoottt
61 ggtogoatot ggotgtotot ggtottogto ttoogtggo tggtgtacot ggtgacagot
121 gagogogtgt ggggagacga ocagaaggat tttgactgoa acaccaggoa acogggotgt
181 accaatgtot gotacgatga gttottocoo gtgtotcacg tgogoottog ggototgoag
241 otcatootgg toacotggoo ottottgot gtggtacago atggggoda toagaggaga aagattggt ggaggtaco tttaccogaa tooggaagg
361 aagoggggtg gactoggg gacatacgto ttooggaa atacootoo tottacatgoo
241 attactoo totacoott coacgoatto tatoccagat atacootoo tottatgoto
811 aagacatg cggagoogg toccacacaa gtggactgot toottacgoo caccatagac
421 attactoo totacootto coacgoatto tatoccagat atacootoo ttotatggto
431 aagacatg cggagoogg toccacacaa gtggactgot toottacoot gottacoot
431 aagacatot toattgtott catggtggt acggoogta totgcacot gottacoott
431 aaaacatot toattgtott catggtggt acggoogta totgcacot gottacoott
431 aagacootg tootaagaa gataacgog tgttotgag tgtgoogoot gaggagacca
431 attoottoo toatactag gattaagogg tgttotgag tgtgoogoot gaggagacca
431 attoo toatagtot gagtaga tgaccaaca tgggocagot gaggagacca
431 aaaacatot toattgtott catggtggt acggoogta totcaacat gottaacott
431 aagacgogg toccacag gagtacago tgttotgag tgtgoogoot gaggagacca
431 cccactgcac atgcaaagaa tgacccaac tgggccact otcotagoa aagaaggac
432 ttoottocat gogaccota ctttotgggo toggacgott accegoott gttaccaga
433 cgocotcgag cccacgtgaa gaaaccatt ctgtga
```

Abbildung 8-17. Lage der Connexin31.1-Primer in der Cx31.1-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 010291.3. Primer: Cx31.1F, Cx31.1R, Cx31.1Fnest (rot); Amplikongröße: 292 bp. Das Gen besteht aus zwei Exonen. Die komplette codierende Sequenz befindet sich auf Exon 2.

```
1 atgaactgga caggtetata cacettgete agtggegtga ateggeacte tacageeatt

61 ggeegagtat ggetgtetgt eatetteate tteagaatea tggtgetggt ggtggetget

121 gagagegtgt ggggggatga gaagteetet tteatetgta acaeceteea geegggetge

181 aacaegetet getatgacea ttttteece ateteeeaeg tgegeetatg gteeetgeag

241 ettatettgg ttteeaecee ageteteete gtgggaagee eetteaee ggaagaggta

361 aagagaeae aggtgeeaet eteaggaea etgtggtgg eettggtgg eetteagg

421 tteeggetge tgttegagge tgeteteatg tatgteete aceeggeata

361 aegagaeae aggtgeeae etgtggaagee tteeeetge eetagetea eeeggeata

481 geeatggtge ggetggteaa gtgtgaagee tteeeetge eeeaeagg ggaetgette

541 gtgteeegee eeaeeggaa aacegtette aetgteetta teeggeeta

601 tgeattatee teaaegtgge ggaggtggtg taeeteatea teegggeetg tgeeegetg
```

```
661 gctcagcgcc gctccaatcc gccctcccgc aagggctcgg gcttcggcca ccgcctctca
721 cctgaataca agcagaatga gatcaacaag ctgctgagcg agcaggatgg ctctctgaaa
781 gacatactgc gccgcagccc tggcacaggg gccgggctcg ctgaaaagag cgaccgatgc
841 tcagcctgct ga
Abbildung 8-18. Lage der Connexin32-Primer in der Cx32-Sequenz Genbank-Accession-
Nummer NM 008124.2. Primer: Cx32 cytLoopF, Cx32ctermR, Cx32ctermnest
Amplikongröße: 451 bp. Das Gen besteht aus zwei Exonen. Die komplette codierende Sequenz
befindet sich auf Exon 2.
Α.
```

```
atgagtgatt ggagtgcctt acaccagctc ctagaaaagg ttcaacccta ctccacagct
61
   ggaggaaagg tatggatcaa ggttettte attteegea teetgeteet gggeaetget
121 atcgagtcgg cttggagtga cgagcagttt gagttccatt gcaacactca gcagcctggt
181 tgtgaaaatg tctgctatga ccatgccttc ccaatctctc acgtgcgcct ctgggtcctc
241 caggtcattt tcgtatctgt gcctattctc ttatacctgg cacatgtgta ctatgtggtt
301 cgacagaata agaagttgaa caagcaagag gaagaactgg aagctgctca ttttaatgag
361 gccagcgtgg aaaggcactt ggagacaatt gcaggagagc agttcaagtg tggcagtgaa
421 gaacagagta aggtgaaaat gagaggcaga ttgctgctaa cctacatggc cagcatcttc
481 ttcaagtctg tcttcgagat ggccttcctc ctgatccagt ggtacattta tggatttact
541 ctgagtgccc tttacatctg tgagcagtct ccttgcccac gtcgggtgga ctgcttcctc
601 tetegeecea eegagaaaac catetteate etetteatgt ttgtggtgte agtggtgtet
661 tttgtcttgg atatcattga gctgttctat gtcttattta aggctattaa gaatcgt<mark>atg</mark>
721 agaaaagcgg aggatgaggt ttactgtgat gagctaccat gcccttccca tgtctcttca
781 tcaactgttc tcaccaccat agattctagt gagcaggcgg ttccagtgga actttcttca
841 gtttgtattt aa
В.
   atgagtgatt ggagtgcctt acaccagctc ctagaaaagg ttcaacccta ctccacagct
1
61
   ggaggaaagg tatggatcaa ggttcttttc attttccgca tcctgctcct gggcactgct
121 atcgagtcgg cttggagtga cgagcagttt gagttccatt gcaacactca gcagcctggt
181 tgtgaaaatg tetgetatga ecatgeette ecaatetete acgtgegeet etgggteete
241 caggtcattt tcgtatctgt gcctattctc ttatacctgg cacatgtgta ctatgtggtt
301 cgacagaata agaagttgaa caagcaagag gaagaactgg aagctgctca ttttaatgag
361 gccagcgtgg aaaggcactt ggagacaatt gcaggagagc agttcaagtg tggcagtgaa
421 gaacagagta aggtgaaaat gagaggcaga ttgctgctaa cctacatggc cagcatcttc
481 ttcaagtctg tcttcgagat ggccttcctc ctgatccagt ggtacattta tggatttact
541 ctgagtgccc tttacatctg tgagcagtct ccttgcccac gtcgggtgga ctgcttcctc
601 tctcgcccca ccgagaaaac catcttcatc ctcttcatgt ttgtggtgtc agtggtgtct
661 tttgtcttgg atatcattga gctgttctat gtcttattta aggctattaa gaatcgtatg
721 agaaaagcgg aggatgaggt ttactgtgat gagctaccat gcccttccca tgtctcttca
781 tcaactgttc tcaccaccat agattctagt gagcaggcgg ttccagtgga actttcttca
841 gtttgtattt aa
```

Lage der Connexin33-Primer in der Cx33-Sequenz GenBank Abbildung 8-19. Accession-Nummer NM 001001496.2. A. Primer Cx33cyt LoopF, Cx33c-termR, Cx33nestF (rot); Amplikongröße: 339 bp. B. Primer Cx33Okt09F, Cx33Okt09R, Cx33Okt09FN; Amplikon: 269 bp. Das Gen besteht aus zwei Exonen. Die komplette codierende Seguenz befindet sich auf Exon 2.

```
atgqqqqaat qqaccatett qqaqaqqetq etqqaaqeeq eqqtqeaqea qeaeteeaet
61
   atgattggga ggatcctgtt gactgtggtg gtgatcttcc ggatactcat tgtggccatt
121 gtaggggaga cggtgtacga tgatgagcag accatgtttg tgtgcaacac cctacagccc
181 ggctgtaacc aggcctgcta tgaccgcgcc tttcccatct cccatatacg ttactgggtc
241 ttccagatca taatggtgtg cacccccagt ctctgtttta tcacctattc tgtgcaccaa
301 tccgccaagc agcgagaacg ccggtactct actgtcttcc tagccctgga cagagaccct
361 gctgagtcta taggggggacc tggaggaact gggggtgggg gcagcg<mark>gagg gagcaaacga</mark>
421 gaagataaga agttgcaaaa tgccattgtc aatggggtgc tgcagaacac agagaccacc
481 agtaaggaga cagaaccaga ttgcttagag gttaaagagc tgactccaca tccatctggg
541 ctgcgcacag cagcaaggtc caagctccga agacaggaag gtatctcccg cttctacatc
601 atccaagtgg tgtttcgaaa tgctctggag attgggtttc tggtgggcca gtactttcta
661 tatggettea gtgttecagg gttgtatgag tgeaacegtt acceetgeat caaggaggta
721 gaatgttatg tgtctagacc taccgagaag acagtctttc tggtgttcat gtttgctgtg
781 ageggeattt gtgtggtget caatetgget gaaettaace atetgggatg geggaagate
841 aaactggctg tccggggagc ccaggccaag aggaagtcag tctatgagat acgtaacaaa
901 gatetgeete gagteagtgt teecaattte ggeaggaete agteeagtga etetgeetat
961 gtgtga
```

Abbildung 8-20. Lage der Connexin36-Primer in der Cx36-Sequenz GenBank Accession-Nummer NM 010290.2. Primer Cx36cytLoopF, Cx36ctermR, Cx36cytLoopFnest (rot); Amplikongröße: 537 bp. Die codierende Sequenz besteht aus zwei Exonen. Exon 1 ist blau dargestellt, die Sequenz der verwendeten Antikörper ist grün dargestellt.

(rot):

1	atgggcgact	ggggcttcct	ggagaagttg	ctagaccagg	tccaggaaca	ctcgaccgtg		
61	gtgggcaaga	tctggttaac	ggtgctcttc	atcttccgca	tcctcatcct	ggggctggct		
121	ggcgagtcgg	tgtggggcga	cgagcagtct	gattttgagt	gtaacacagc	ccagccgggc		
181	tgcaccaacg	tctgctatga	ccaggccttc	cccatctccc	acatccgata	ctgggtgctg		
241	cagttcctct	tcgtcagcac	acccaccctg	atctacctgg	gccacgtcat	ctacctgtct		
301	cggcgggaag	agcggttgcg	gcagaaagag	ggagagctcc	gggcgctgcc	atccaaggac		
361	ctacatgtag	agcgggcact	ggctgccatc	gaacatcaga	tggccaagat	ctcggtggca		
421	gaggacggtc	gtcttcggat	tcgtggggcg	ctcatgggta	cctatgtggt	cagcgtgctg		
481	tgtaagagtg	tgctggaggc	aggcttcctc	tatggccagt	ggcgcctcta	tggctggacc		
541	atggagccgg	tgtttgtgtg	ccagcgtgcg	ccctgccccc	acatcgtgga	ctgctatgtc		
601	tctcgaccca	ctgagaagac	tatcttcatc	atcttcatgc	tggtggtagg	agtcatctcc		
661	ctggtgctca	acctgctgga	gctggttcac	ctgctgtgtc	ggtgtgtcag	ccgggagata		
721	aaggcacgaa	gggaccacga	cgcccgcccg	gcccaggg <mark>ca</mark>	gtgcctcaga	cccttaccct		
781	gaacaggttt	tcttctacct	ccccatgggc	gagggaccct	cttccccacc	gtgtcc <mark>cacc</mark>		
841	tacaacgggc	tctcatccac	tgagcagaac	tgggccaact	tgaccacaga	ggagagactg		
901	acctcttcca	gacctccccc	atttgtaaac	acagctcccc	agggtggccg	aaagtcccct		
961	961 ageogeoca acagetetge atocaagaag cagtatgtgt ag							

Abbildung 8-21. Lage der Connexin37-Primer in der Cx37-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 008120.2. Primer Cx37cytLoopF, Cx37ctermR, Cx37nestR (rot); Amplikongröße: 417 bp. Das Gen besteht aus zwei Exonen. Die komplette codierende Sequenz befindet sich auf Exon 2.

```
atggagaagt tgaacttgtt gggatteete ateateacet taaaetgtaa egtgaeeate
atgggeatga tetggetgat egtggaggte ttgetgagga tgetagtggt ggtettggea
1
61
121 gggtcaccta tctatgagga tgaacaagag aggtttattt gcaacacact gcaaccagga
181 tgtgccaacg tttgctacga cctcttttcc ccagtgtcac cgctgcgatt ctggctagtg
241 cagageetgg cettgettet geetteggtg gtetttggea ettacaeeet acaeegeggt
301 gcgaagctgg ctgcagtggg gggagcctgc aggccccagg tgcccgacct gtctactgcc
361 tacctggtgc acctactgct gcgcatgctg ctggaggccg ggctggcctt cctgcactac
421 tttctctttg gcttttctgt gcccgcccgc gtgtcttgct cgcatgtacc ctgctcaggg
481 gctgtggact gctacgtgtc gcggcccacg gagaagtcac tcctgatact attcttttgg
541 gcagtgagtg cgctateett eetgeteage ttggetgaee tgetttggat eetgeegagg
601 agaaagacac tgaggaccac gcagtgggtg aatggagagg ctagaccagt ctgtgaagta
661 cctgcacctc ccccttgcct cttacaaaac ccccagggct atcttagcca aggtcaggtg
721 gaccaagagg acagacagga ggaacaagtt gtgcctgagt tcccctgcat gtggacagca
781 gggcagagtg acaacagcaa tgttggtcag gcctgtgtgt cgggg<mark>ctgct ggaacattca</mark>
841 gaccaagatg ctagtgaggc cactteetca getggtgaca ggetaacagt ggeteacaca
901 gcacatgagc tcagattcca cagagagact tcactggacc tgggggggcaa aaacacccag
961 gcagatgaac tctccttggc tacccagagc cacctggcca gacacagttc agccagcaag
1021 cctcaagete catgeegget gaccaectea ggeagtgete eccatttgag aaccaaaaaa
1081 tctgagtggg tgtga
```

Abbildung 8-22. Lage der Connexin39-Primer in der Cx39-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 153086.5. Primer Cx39cytLoopF, Cx39c-termR, Cx39c-termRNest (rot); Amplikongröße: 508 bp. Die codierende Sequenz besteht aus zwei Exonen. Exon 1 ist blau dargestellt.

Α.						
1	atgggtgact	ggagcttcct	gggggagttc	ctggaggagg	tccacaagca	ctccacagtc
61	atcggcaagg	tctggctcac	tgtcctgttc	attttccgca	tgctggtcct	gggcaccgct
121	gctgagtcct	cctggggaga	tgagcaggcc	gacttccggt	gcgataccat	tcagcctggt
181	tgccaaaatg	tctgctatga	ccaagccttc	cccatctccc	acattcgtta	ttgggtactg
241	cagatcatct	ttgtgtccac	gccttctcta	gtgtacatgg	gccatgccat	gcacactgtg
301	cgcatgcagg	aaaagcagaa	attgcgggat	gctgagaaag	ctaaagaggc	ccaccgcact
361	ggtgcctatg	agtacccagt	agccgaaaag	gccgagctgt	cctgctggaa	agaagtagat
421	gggaagattg	tcctccaggg	caccctactc	aacacctatg	tctgcaccat	tctgatccgc
481	accaccatgg	aggtggcctt	catcgtaggc	cagtacctcc	tctatgggat	cttcctggat
541	accctgcatg	tctgccgcag	gagtccctgt	ccccacccag	tcaactgtta	tgtttcgagg
601	cccacggaga	agaatgtctt	cattgtcttt	atgatggctg	tggctggact	gtctctgttt
661	ctcagcctgg	ctgaactcta	ccacctgggc	tggaagaaga	tccgacagcg	ctttggcaag
721	tcacggcagg	gtgtggacaa	gcaccagctg	cctggccctc	ccaccagcct	cgtccagagc
781	ctcactcctc	cccctgactt	caatcagtgc	ctaaagaaca	gctccggaga	gaaattcttc
841	agcgacttca	gtaataacat	gggctcccgg	aagaatccag	acgctctggc	cactggggaa
901	gtgccaaacc	aggagcagat	tccaggggaa	ggcttcatcc	acatgcacta	tagcc <mark>agaag</mark>
961	ccagagtacg	<pre>ccagtggagc</pre>	ctctgcgggc	caccgccttc	ctcagggc <mark>ta</mark>	ccatagtgac
1021	aaacggcgcc	ttagtaaggc	cagcagcaaa	gcaaggtcag	atgacctgtc	agtgtga
В.						
1	atgggtgact	ggagcttcct	gggggagttc	ctggaggagg	tccacaagca	ctccacagtc
61	atcggcaagg	tctggctcac	tgtcctgttc	attttccgca	tgctggtcct	gggcaccgct
121	gctgagtcct	cctqqqqaqa	tgagcaggcc	gacttccggt	gcgataccat	tcagcctggt

181 tgccaaaatg tctgctatga ccaagcette eccateteee acattegtta ttgggtactg

241	cagatcatct	ttgtgtccac	gccttctcta	gtgtacatgg	gccatgccat	gcacactgtg
301	cgcatgcagg	aaaagcagaa	attgcgggat	gctgagaaag	ctaaagaggc	ccaccgcact
361	ggtgcctatg	agtacccagt	agccgaaaag	gccgagctgt	cctgctggaa	agaagtagat
421	gggaagattg	tcctccaggg	caccctactc	aacacctatg	tctgcaccat	tctgatccgc
481	accaccatgg	aggtggcctt	catcgtagg <mark>c</mark>	cagtacctcc	tctatgggat	cttcctggat
541	accctgcatg	tctgccgcag	gagtccctgt	ccccacccag	tcaactgtta	tgtttcgagg
601	cccacggaga	agaatgtctt	cattgtcttt	atgatggctg	tggctggact	gtctctgttt
661	ctcagcctgg	ctgaactcta	ccacctgggc	tggaagaaga	tccgacagcg	ctttggcaag
721	tcacggcagg	gtgtggacaa	gcaccagctg	cctggccctc	ccaccagcct	cgtccagagc
781	ctcactcctc	cccctgactt	caatcagtgc	ctaaagaaca	gctccggaga	gaaattcttc
841	agcgacttca	gtaataacat	gggctccc <mark>gg</mark>	aagaatccag	acgctctggc	cactggggaa
901	gtgccaaacc	aggagcagat	tccaggggaa	ggcttcatcc	acatgcacta	tagccagaag
961	ccagagtacg	ccagtggagc	ctctgcgggc	caccgccttc	ctcagggcta	ccatagtgac
1021	aaacggcgcc	ttagtaaggc	cagcagcaaa	gcaaggtcag	atgacctgtc	agtgtga

Abbildung 8-23. Lage der Connexin40-Primer in der Cx40-Sequenz GenBank Accession-Nummer NM 008121.2. A. Primer Cx40CytLoopF Cx40CtermR Cx40CtermRNest (rot); Amplikongröße: 602 bp B. Primer Cx40Okt09F, Cx40Okt09R, Cx40Okt09FN, Cx40Okt09RN Amplikon: 355 bp. Das Gen besteht aus zwei Exonen. Die komplette codierende Sequenz befindet sich auf Exon 2.

А.						
1	atgggtgact	ggagcgcctt	ggggaagctg	ctggacaagg	tccaagccta	ctccacggcc
61	ggagggaagg	tgtggctgtc	ggtgctcttc	attttcagaa	tcctgctcct	ggggacagcg
121	gttgagtcag	cttggggtga	tgaacagtct	gcctttcgct	<mark>gt</mark> aacactca	acaacccggt
181	tgtgaaaatg	tctgctatga	caagtccttc	cccatctctc	acgtgcgctt	ctgggtcctt
241	cagatcatat	tcgtgtctgt	gcccacactc	ctgtacttgg	ctcacgtgtt	ctatgtgatg
301	agaaaggaag	agaagctgaa	caagaaagaa	gaggagctca	aagtggcgca	gaccgacggg
361	gtcaacgtgg	agatgcacct	gaagcagatt	gaaatcaaga	agttcaagta	tgggattgaa
421	gaacacggca	aggtgaagat	gagaggtggc	ctgctgagaa	cctacatcat	cagcatcctc
481	ttcaagtctg	tcttcgaggt	ggccttcctg	ctgatccagt	ggtacatcta	tgggttcagc
541	ctgagtgcgg	tctacacctg	caagagagat	ccctgccccc	accaggtgga	ctgcttcctc
601	<pre>tcacgtccca</pre>	cggagaaaac	catcttcatc	atcttcatgc	tggtggt <mark>gtc</mark>	cttggtgtct
661	<pre>ctcgctctga</pre>	atatcattga	gctcttctat	gtcttcttca	agggcgttaa	ggatcgcgtg
721	aagggaagaa	gcgatcctta	ccacgccacc	accggcccac	tgagcccatc	caaagactgc
781	ggatctccaa	aatatgctta	cttcaatggc	tgctcctcac	caacggcccc	actctcacct
841	atgtctcctc	ctgggtacaa	gctggtcact	ggtgacagaa	acaattcctc	ctgccgcaat
901	tacaacaagc	aagccagcga	gcaaaactgg	gcgaattaca	gcgcagagca	aaatcgaatg
961	gggcaggccg	gaagcaccat	ctccaactcc	cacgcccagc	cgtttgattt	ccctgacgac
1021	agccaaaatg	ccaaaaaagt	tgctgctgga	cacgaactcc	agcccttagc	tatcgtggat
1081	cagcgacctt	ccagcagagc	cagcagccgc	gccagcagca	gacctcggcc	tgatgacctg
1141	gagatttaa					
В.						
1	atgggtgact	ggagcgcctt	ggggaagctg	ctggacaagg	tccaagccta	ctccacggcc
61	ggagggaagg	tgtggctgtc	ggtgctcttc	attttcagaa	tcctgctcct	ggggacagcg
121	gttgagtcag	cttggggtga	tgaacagtct	gcctttcgct	gtaacactca	acaacccggt
181	tgtgaaaatg	tctgctatga	caagtccttc	cccatctctc	acgtgcgctt	ctgggtcctt
241	cagatcatat	tcgtgtctgt	gcccacactc	ctgtacttgg	ctcacgtgtt	ctatgtgatg
301	agaaaggaag	agaagctgaa	caagaaagaa	gaggagctca	aagtggcgca	gaccgacggg
361	gtcaacgtgg	agatgcacct	gaagcagatt	gaaatcaaga	agttcaagta	tgggattgaa
421	gaacacggca	aggtgaagat	gagag <mark>gtggc</mark>	ctgctgagaa	<pre>cctacatcat</pre>	cagcatcctc
481	ttcaagtctg	tcttcgaggt	ggccttcctg	ctgatccagt	ggtacatcta	tgggttcagc
541	ctgagtgcgg	tctacacctg	caagagagat	ccctgccccc	accaggtgga	ctgcttcctc
601	tcacgtccca	cggagaaaac	catcttcatc	atcttcatgc	tggtggt <mark>gtc</mark>	cttggtgtct
661	<pre>ctcgctctga</pre>	atatcattga	gctcttctat	gtcttcttca	agggcgttaa	ggatcgcgtg
721	aagggaagaa	gcgatcctta	ccacgccacc	accggcccac	tgagcccatc	caaagactgc
781	ggatctccaa	aatatgctta	cttcaatggc	tgctcctcac	caacggcccc	actctcacct
841	atgtctcctc	ctgggtacaa	gctggtcact	ggtgacagaa	acaattcctc	ctgccgcaat
901	tacaacaagc	aagccagcga	gcaaaactgg	gcgaattaca	gcgcagagca	aaatcgaatg
961	gggcaggccg	gaagcaccat	ctccaactcc	cacgcccagc	cgtttgattt	ccctgacgac
1021	agccaaaatg	ccaaaaaagt	tgctgctgga	cacgaactcc	agcccttagc	tatcgtggat
1081	cagcgacctt	ccagcagagc	cagcagccgc	gccagcagca	gacctcggcc	tgatgacctg
11/1	a_a_t+t					

Abbildung 8-24. Lage der Connexin43-Primer in der Cx43-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 010288.3. A Primer Cx43Forw, Cx43Rev, Cx43Revnest (rot); Amplikongröße: 460 bp. B. Primer Cx43Okt09F, Cx43Okt09R, Cx43Okt09FN; Amplikon 222 bp. Das Gen besteht aus zwei Exonen. Die komplette codierende Sequenz befindet sich auf Exon 2.

A.
 atgagttgga gcttcctgac tcgcctgcta gaggagatcc acaaccattc gacatttgta
 gggaagatct ggctcactgt gctgattgtc tttcgaattg tcctaactgc tgtaggagga
 gagtccatct actatgatga acaaagcaaa tttgtgtgca acacagagca gccgggctgt

181	gagaatgtct	gctatgatgc	ctttgccccg	ctctcccacg	tgcgcttctg	ggtattccag
241	atcatcctgg	ttgcaactcc	ctctgtgatg	tacctgggat	atgctattca	taagattgcc
301	aaaatggagc	atggcgaggc	agacaagaag	gcagctcgga	gcaaacccta	tgccatgcgt
361	tggaaacagc	accgggctct	ggaagaaacg	gaagaggacc	atgaagagga	tcctatgatg
421	tatccagaga	tggagttaga	aagcgaaaaa	gaaaata <mark>aag</mark>	agcagagcca	accaaaacct
481	aagcatgatg	gccgacgacg	aattcgagag	gatgggctca	tgaaaatcta	tgtgttgcag
541	ctgctggcca	ggactgtgtt	tgaggtgggc	tttctaatag	ggcagtattt	cctgtatggc
601	ttccaagtcc	acccatttta	tgtgtgcagc	agacttcctt	gccctcataa	gatagactgc
661	tttatttcta	gacccactga	aaagaccatc	ttccttctga	taatgtatgg	tgtcacaggc
721	ctctgcctat	tgcttaacat	ttgggagatg	cttcacttag	ggtttgggac	aattcgagac
781	tcactaaaca	gtaaaaggag	ggaacttgat	gatccgggtg	cttataatta	tcctttcact
841	tggaacacac	cctctgctcc	ccctggctat	aacattgctg	tcaaaccaga	tcagatccag
901	tacactgagc	tgtccaatgc	taagattgcc	tacaagcaaa	acaaagccaa	tattgcccag
961	gaacagcagt	acggcagcca	cgaggaacac	ctcccggctg	atctggagac	tctgcagcgg
1021	gagatcagaa	tggctcagga	acgcttggac	ctagcaatcc	aggcctacca	tcaccaaaac
1081	aacccccatg	gtcctcggga	aaagaaggcc	aaagtggggt	ccaaatctgg	gtccaacaaa
1141	agcagtatta	gtagcaaatc	aggggatggg	aagacctccg	tctggattta	a
В.						
1	atgagttgga	gcttcctgac	tcgcctgcta	gaggagatcc	acaaccattc	gacatttgta
61	gggaagatct	ggctcactgt	gctgattgtc	tttcgaattg	tcctaactgc	tgtaggagga
121	gagtccatct	actatgatga	acaaagcaaa	tttgtgtgca	acacagagca	gccgggctgt
181	gagaatgtct	gctatgatgc	ctttgccccg	ctctcccacg	tgcgcttctg	ggtattccag
241	atcatcctgg	ttgcaactcc	ctctgtgatg	tacctgggat	atgctattca	taagattgcc
301	aaaatggagc	atggcgaggc	agacaagaag	gcagctcgga	gcaaacccta	tgccatgcgt
361	tggaaacagc	accgggctct	ggaa <mark>gaaacg</mark>	gaagaggacc	<mark>atga</mark> agagga	tcctatgatg
421	tatccagaga	tggagttaga	aagcgaaaaa	gaaaata <mark>aag</mark>	agcagagcca	accaaaacct
481	aagcatgatg	gccgacgacg	aattcgagag	gatgggctca	tgaaaatcta	tgtgttgcag
541	ctgctggcca	ggactgtgtt	tgaggtgggc	tttctaatag	ggcagtattt	cctgtatggc
601	ttccaagtcc	acccatttta	tgtgtgcagc	agacttcctt	gccctcataa	gatagactgc
661	tttatttcta	gacccactga	aaagaccatc	ttccttctga	taatgtatgg	tgtcacaggc
721	ctctgcctat	tgcttaacat	ttgggaga <mark>tg</mark>	cttcacttag	ggtttgggac	aattcgagac
781	tcactaaaca	gtaaaaggag	ggaacttgat	gatccgggtg	cttataatta	tcctttcact
841	tggaacacac	cctctgctcc	ccctggctat	aacattgctg	tcaaaccaga	tcagatccag
901	tacactgagc	tgtccaatgc	taagattgcc	tacaagcaaa	acaaagccaa	tattgcccag
961	gaacagcagt	acggcagcca	cgaggaacac	ctcccggctg	atctggagac	tctgcagcgg
1021	gagatcagaa	tggctcagga	acgcttggac	ctagcaatcc	aggcctacca	tcaccaaaac
1081	aacccccatg	gtcctcggga	aaagaaggcc	aaagtggggt	ccaaatctgg	gtccaacaaa
1141	agcagtatta	gtagcaaatc	aggggatggg	aagacctccg	tctggattta	a

Abbildung 8-25. Lage der Connexin45-Primer in der Cx45-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 001159382.1. A Primer Cx45Forw, Cx45Rev, Cx45ForwNest (rot); Amplikongröße: 503 bp. B. Primer Cx45Okt09F, Cx45Okt09R, Cx45Okt09FN; Amplikon 311 bp. Das Gen besteht aus drei Exonen. Die komplette codierende Sequenz befindet sich auf Exon 3.

```
1
    atgggcgact ggagcttcct ggggcggctg ctggagaacg cacaggagca ctctacagtc
61
    atcggcaaag tgtggctgac cgtgctgttc atcttccgca ttctggtgtt aggggcggca
121
    gccgaggagg tgtggggcga cgagcaatcg gacttcacct gcaacacaca gcagccaggc
181 tgtgagaacg tctgctacga ccgcgctttc cccatttcgc acatccgctt ctgggcgctg
241 caaatcatct tcgtgtctac gcccaccctc atctatctgg gccacgtgct acacatcgtg
301 cgcatggagg agaagaagaa agagcgggag gaagagctgc tgaggagaga caaccctcag
361 cacggccgtg gtcgcgagcc aatgcgtaca gggagcccgc gggaccctcc actacgcgat
421 gaccgtggca aggtgcgcat cgcaggtgcg ctgctgcgga cctacgtctt caacatcatc
481 ttcaagacac tcttcgaagt ggggttcatc gcgggccagt actttctata cggcttccag
541 ctgcagccac tttaccgctg cgaccgctgg ccctgcccca acactgtgga ctgtttcatc
    tccaggccca cagagaagac catctttgtc atcttcatgc tggctgtggc ctgtgcgtca
601
661 ctggtactca acatgctgga gatttaccac ctgggctgga agaagctcaa gcagggagtt
721 actaaccact tcaacccaga tgcctcagaa gccaggcaca agcccttgga ccccctaccc
781 acggccacca getetggeee geecagegte tecategggt teceacetta ttacacacac
841 cctgcctgtc ccacagtaca ggcaaaggcc atagggtttc ctggggcccc actatcacca
    gcagacttca cagtggtgac tctaaacgat gctcaaggca gaaaccaccc agtcaaacac
901
961 tgcaatggcc accacctgac gacagagcag aactggacca ggcaagtggc agagcagcag
1021 actocagoca goaagocoto ttoagoagoa tooagocotg atggoogoaa ggggotoatt
1081 gacagcagtg gcagcagctt acaggagagt gccttggtag tgacgccaga ggagggggaa
1141 caggetttgg ccaccacagt ggagatgcac tegecacegt tggteeteet ggaeceagga
1201 aggtccagca agtccagcaa cggacgtgcc agaccaggtg acttggccat ctag
```

Abbildung 8-26. Lage der Connexin46-Primer in der Cx46-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 016975.2. Primer Cx46F, Cx46R, Cx46NestedF1.PCR, Cx46NestedR1.PCR (rot); Amplikongröße: 373 bp. Das Gen besteht aus zwei Exonen. Die komplette codierende Sequenz befindet sich auf Exon 2.

1	atgaccaaca	tgagctggag	cttcctgacg	cggctgctgg	aggagatcca	caatcattcc
61	accttcgtgg	gcaaagtttg	gctcactgtg	ctggtggtct	tccgcattgt	gctgacagcc
121	gtcggtggtg	agtccatcta	ttcagatgag	caatccaagt	tcacctgcaa	cacgcggcaa
181	ccgggttgtg	acaacgtctg	ctatgacgcc	tttgcgcccc	tgtctcatgt	gcgcttctgg
```
241 gtcttccaga tagtggtcat ctccacacct tctgtcatgt acctgggcta tgcagtccac
301 cgcttggcgc gggcctcgga acaggagcgc agacgcgctc tccgacgtcg ccctggcacc
361 cggcgcttgc ccagggcgca gctgccaccg ccgccacctg gctggccgga caccaccgat
421 ctgggagagg cggagcccat attggctcta gaggaggatg aggacgagga gccggggggcg
541 ggcggaggtg atggcaagac ggtggtcact cctggcccgg ccgggcagca cgatgggcgg
601 cggcgcatcc agagggaggg cctgatgcgt gtgtacgtgg ctcagctggt ggttagggcg
661 gccttcgagg tggcctttct ggtgggccag tacctactgt acggcttcga ggtgccaccc
721
    ttctttgcct gcagccgcca gccttgcccc cacgtagtgg attgcttcgt gtcgcggccg
781 accgagaaga cggtcttctt gctggtcatg tacgtggtta gctgtctatg cttgttgctc
841 aacctctgtg agatggcgca cctgggtctc ggcagtgcgc aggatgctgt gcgcggccgt
901 cggggagcct cagcggcggg gcctggcccc acgccgcgcc caccgccctg cgctttcccg
961 geogeggeeg eeggeetgge ttgeeeteea gaetaeagee tggtggtgeg tgeagetgag
1021 cgcgcgcgag cgcacgacca gaacttggcg aacctagcgc tgcaggcgtt gcgcgatggg
1081 gcggcggtgg cggcggtttc cgcggaccgc gacagtccgc cgtgcgctgg gctcaatgca
1141 acctctcggg gggcacccag ggtgggcggc ctagcttccg gaaccggcag cgccacgtcg
1201 gggggcaccg ttggggagca gagccggccg ggagctcagg aacaactggc cactaagccc
1261 agggctggct ctgaaaaggg cagtacaggc agcagagacg gcaaggccac cgtgtggatc
1321 tga
```

Abbildung 8-27. Lage der Connexin47-Primer in der Cx47-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 175452.4. Primer Cx47cytLoopF Cx47cTermR Cx47cytLoopFnest (rot); Amplikongröße: 737 bp. Das Gen besteht aus zwei Exonen. Die komplette codierende Sequenz befindet sich auf Exon 2.

Α.						
1	atgggcgact	ggagtttcct	gggaaacatc	ttggaagagg	tgaatgagca	ctccactgtc
61	atcggcagag	tctggctcac	agtgctcttc	atcttccgca	tcctcatcct	cgggacagca
121	gcggagtttg	tgtggggcga	tgagcaatct	gattttgtat	gcaacaccca	gcagccaggc
181	tgtgagaatg	tctgctacga	tgaggccttt	cccatctcac	acatccgcct	ctgggtgctg
241	cagatcatct	tcgtctccac	tccatcgctg	atgtacgtgg	ggcacgcggt	acaccacgtt
301	cgcatggagg	agaagcgaaa	ggaccgtgaa	gctgaggagc	tctgtcagca	gtcgcgcagc
361	aacggggggtg	agagggtacc	aatcgcccca	gaccaggcca	gcatccggaa	gagcagcagc
421	agtagcaaag	gcaccaagaa	gttccggctg	gagggcacac	tgctaaggac	ctatgtctgc
481	cacatcatct	tcaagaccct	ctttgaggtg	ggcttcatcg	tgggccatta	cttcctgtat
541	ggtttccgca	tcctgcccct	ctatcgctgc	agccggtggc	cctgccccaa	tgtggtagac
601	tgctttgtat	cccggcctac	tgagaagacc	atcttcatcc	tcttcatgtt	atcagtcgct
661	tttgtgtcac	tcttcctcaa	catcatggag	atgagccacc	tgggcatgaa	aggaatccgg
721	tctgccttca	agaggcctgt	agagcaacca	ctgggggaga	ttgctgagaa	gtccctccac
781	tccattgcag	tttcctccat	ccagaaagcc	aagggctacc	agcttctaga	agaagagaag
841	atcgtatcac	actatttccc	tttgacagag	gttggaatgg	tggagaccag	ccctctttcg
901	gccaagcctt	ttagtcagtt	tgaggagaag	atcggcacag	gacccctggc	agatatgtca
961	cggagttacc	aagaaaccct	gccttcttat	gctcaggtgg	gggtccagga	agtggagcgg
1021	gaagagccgc	ctatagaaga	ggctgtggaa	ccggaagtgg	gagagaagaa	gcaagaagca
1081	gagaaggtgg	ccccagaagg	gcaggagaca	gttgcagtgc	cagacaggga	gagagtagag
1141	acccctggag	tggggaagga	ggatgagaaa	gaagagctgc	aagctgaaaa	ggtaaccaag
1201	caagggctgt	ctgctgagaa	ggcaccctca	<pre>ctctgtccgg</pre>	agctgacaac	cgatgacaat
1261	cggcccttga	gcaggctgag	taaagccagc	agcagggcca	ggtcagatga	tctcaccata
1321	tga					
В.						
1	atgggcgact	ggagtttcct	gggaaacatc	ttggaagagg	tgaatgagca	ctccactgtc
61	atcggcagag	tctggctcac	agtgctcttc	atcttccgca	tcctcatcct	cgggacagca
121	gcggagtttg	tgtggggcga	tgagcaatct	gattttgtat	gcaacaccca	gcagccaggc
181	tgtgagaatg	tctgctacga	tgaggccttt	cccatctcac	acatccgcct	ctgggtgctg
241	cagatcatct	tcgtctcca <mark>c</mark>	tccatcgctg	atgtacgtgg	ggcacgcggt	acaccacgtt
301	cgcatggagg	agaagc <mark>gaaa</mark>	ggaccgtgaa	gctgaggagc	tctgtcagca	gtcgcgcagc
361	aacgggggtg	agagggtacc	aatcgcccca	gaccaggcca	gcatccggaa	gagcagcagc
421	agtagcaaag	gcaccaagaa	gttccggctg	gagggcacac	tgctaaggac	ctatgtctgc
481	cacatcatct	tcaagaccct	ctttgaggtg	ggcttcatcg	tgggccatta	cttcctgtat
541	ggtttccgca	tcctgcccct	ctatcgctgc	agccggtggc	cctgccccaa	tgtggtagac
601	tgct <mark>ttgtat</mark>	cccggcctac	tgagaagacc	atcttca <mark>tcc</mark>	tcttcatgtt	atcagtcgct
661	tttgtgtcac	tcttcctcaa	catcatggag	atgagccacc	tgggcatgaa	aggaatccgg
721	tctgccttca	agaggcctgt	agagcaacca	ctgggggaga	ttgctgagaa	gtccctccac
781	tccattgcag	tttcctccat	ccagaaagcc	aagggctacc	agcttctaga	agaagagaag
841	atcgtatcac	actatttccc	tttgacagag	gttggaatgg	tggagaccag	ccctctttcg
901	gccaagcctt	ttagtcagtt	tgaggagaag	atcggcacag	gacccctggc	agatatgtca
961	cggagttacc	aagaaaccct	gccttcttat	gctcaggtgg	gggtccagga	agtggagcgg
1021	gaagagccgc	ctatagaaga	ggctgtggaa	ccggaagtgg	gagagaagaa	gcaagaagca
1081	gagaaggtgg	ccccagaagg	gcaggagaca	gttgcagtgc	cagacaggga	gagagtagag
1141	acccctggag	tggggaagga	ggatgagaaa	gaagagctgc	aagctgaaaa	ggtaaccaag
1201	caagggctgt	ctgctgagaa	ggcaccctca	ctctgtccgg	agctgacaac	cgatgacaat
1061						
1201	cggcccttga	gcaggctgag	taaagccagc	agcagggcca	ggtcagatga	tctcaccata

Abbildung 8-28. Lage der Connexin50-Primer in der Cx50-Sequenz GenBank Accession-Nummer NM 008123.2. A. Primer. Cx50Forw, Cx50Rev, Cx50nestF (rot); Amplikongröße: 503bp. B. Primer Cx50Okt09F, Cx50Okt09R, Cx50Okt09FN, Cx50Okt09RN; Amplikon 308bp. Das Gen besteht aus zwei Exonen. Die komplette codierende Sequenz befindet sich auf Exon 2.

1	atgggagatt	ggaatttact	gggtggcatc	ctagaggaag	tccactccca	ctccactata
61	gtggggaaga	tctggctgac	catcctcttc	atcttccgaa	tgctggtact	tggtgtcgct
121	gctgaggacg	tctgggatga	tgagcagtcc	gcctttgcct	gcaacaccca	gcagcccggt
181	tgcaacaata	tctgttacga	tgatgctttc	cccatctctt	tgatcagatt	ctgggttttg
241	cagatcatct	ttgtgtcttc	cccttctttg	gtgtatatgg	gccatgccct	ttatagactc
301	agggactttg	agaagcagag	gcagaagaag	aagttatacc	ttagagccca	gatggagaat
361	ccagagctcg	acctggagga	gcaacaaagg	gtagataaag	agctgaggag	actcgaggag
421	cagaagagga	ttcataaagt	ccctctgaaa	ggatgtctgc	tgcgcaccta	tgtcttacac
481	atcctgacca	gatcagtgct	agaagtaggg	ttcatgatag	gccaatatat	tctctatggg
541	tttcaaatgc	accccattta	caagtgcacc	caagccccct	gccccaattc	agtggactgc
601	tttgtttcca	ggcccacaga	gaagaccatt	ttcatgcttt	tcatgcacag	cattgcagcc
661	atctccttgt	<pre>tactcaatat</pre>	cctggaaata	tttcatctcg	<mark>gc</mark> atcaggaa	aatcatgagg
721	gcactcgatg	gcaaatccag	cagtgggaac	actgagaacg	aaacaggccc	tccattccat
781	tcaacaaact	actcagggac	ccagcagtgt	atgatctgtt	cttctttacc	tgaaagaatc
841	tcactacttc	aagccaacaa	taaacagcaa	gtcatccgag	tcaatatacc	acggtctaaa
901	agcatgtggc	aaattccaca	ccccaggcaa	cttgaggtag	atgtatcctg	tggcaaaaga
961	gactgggctg	agaaaattga	gagctgtgca	cagctccacg	tccacagccc	ctgcccacat
1021	gaccgcagtg	ccagaattca	gcaccctg <mark>ga</mark>	cagcaaccgt	gccattctgt	ctttggcccc
1081	aagaatgcaa	tgtctcagtc	ttggttcggt	acaatgacgg	<pre>cttctcaaca</pre>	ccgtccatca
1141	tctgcgttag	aaacctggga	gcgatcccag	ggcccagaag	cttcagggag	atctctcaca
1201	gatcgccaga	gtcacttcca	aggcagtgac	ggcagtgcaa	gagagagtgg	ggtttggaca
1261	gacagattag	gcccaggaag	tcgcaaggcc	agctttctat	cgaggctgat	gtcagaaaag
1321	ggacaacggc	atagtgactc	aggaagctca	cggtctctga	atagttcctg	cttggatttt
1381	tcacacggag	aaaatagccc	atcacctctg	ccgtctgcca	ctgggcacag	agcatcgatg
1441	aatatgette	tagaactttc	atctattato	aaaaaataa		

Abbildung 8-29. Lage der Connexin57-Primer in der Cx57-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 010289.2. Primer Cx57No3F, Cx57No3R, Cx57No3Fnest, Cx57PetR (rot); Amplikongröße: 451 bp. Laut Datenbank-Sequenz besteht Cx57 aus einem Exon. Retinale Form von Cx57 besitzt nach Hommbach *et al.*, 2004 ein anderes C-terminales Ende (blau).

1	cccgcgtagg	ttccggaaga	gctcggttct	gtagccgagc	gcgcagggcg	ggcgcgggca
61	gctgtagcga	agagctttgt	tcccggcacg	ttgttgcccc	tgcgcgctcg	gagtggccgg
121	agggagtcct	ggtgtcgcgc	gcgccgggcc	cgcggggggct	tagcacggga	gtgattgcta
181	ccgccggagc	tccggggctc	gtgcaccctg	cgttgcttgg	ggcggtccca	ggcagctgca
241	gctcccgtgc	ggtccctgcg	gggtaggtgc	agcgacagcc	aaggcggtac	aatgctgggc
301	ccgcccggga	gcccgggaag	ggaaagcgga	agccgcgcgc	ccggtcggtg	accgcgcgga
361	ttcggcgtct	cgccccggct	gccggcagca	ccggcgcctg	ccctcggctg	cccgtcccgc
421	ggcacccggt	gcgccttgac	c <b>atg</b> gccatc	gcccacttgg	ccacggagta	tgtgttctcg
481	gacttcttgc	tgaaggagcc	caccgagccc	aagttcaagg	ggctgcgact	ggagctggcg
541	gtggacaaga	tggtcacatg	tattgccgtg	ggtctacctc	tgctgctcat	ctcgctggcc
601	ttcgctcagg	agatctccat	<pre>cggtacccag</pre>	ataagctgct	tctccccgag	ttctttctcc
661	tggcgacagg	ctgcctttgt	ggattcatac	tgctgggctg	ctgtacagca	gaagagctcc
721	ctgcagagcg	agtctggaaa	cctcccactg	tggctgcaca	agttcttccc	ctacatccta
781	ctgctgtttg	ccatactcct	gtacctgccc	gcactcttct	ggcgcttctc	tgcagctcca
841	cacctctgct	cagacctgaa	gtttatcatg	gaggaacttg	acaaagtcta	caaccgcgcc
901	atcaaggctg	ccaagagtgc	tcgagatttg	gacctaagag	acggacctgg	acccccagga
961	gtgactgaga	atgtggggca	gagtctgtgg	gagatatctg	aaagccactt	caagtaccca
1021	atcgtggagc	agtacttgaa	gacaaaaaag	aactctagtc	atttaatcat	gaaatacatt
1081	agctgccggc	tggtgacatt	tgtggttata	ctgttggcat	gtatctactt	gagctattac
1141	ttcagcctct	cttcactctc	ggacgagttt	ctgtgcagca	tcaaatcagg	cgtcctgaaa
1201	aatgacagca	ccatccccga	tcgcttccag	tgcaagctca	tcgccgtggg	catcttccag
1261	ctgctcagcc	tcattaacct	cattgtgtat	gctctgctga	ttcccgtggt	cgtctacacg
1321	ttcttcatcc	cattccggca	gaaaacggac	attctcaaag	tgtatgaaat	cctgcccacc
1381	ttcgatgttc	tacatttcaa	gtctgaaggc	tacaatgact	tgagcctcta	caaccttttt
1441	ctggaagaga	acataagtga	gctcaaatcg	tacaagtgtc	tgaaggtgct	ggagaacatt
1501	aaaagcaatg	ggcagggcat	tgaccccatg	ctactcctga	caaacctggg	catgattaag
1561	atggacatca	ttgatggaaa	aattcccacg	tccctacaga	ccaagggaga	ggaccagggc
1621	agccagagag	tggagttcaa	agatttggac	ctgagcagcg	aggctgca <mark>gc</mark>	aaacaatggg
1681	gagaagaact	ctcgccagag	gcttctgaat	ccgtcctgct	aatggtttcc	ttcttgaatt
1741	tcaagcctgt	gacttctgtg	gctgacgcac	ccctgttgga	tctgtagtta	gtttgcagta
1801	gatgtttttg	gtattgatgt	agtgtgtgtc	ctaccaatct	ctaatagaca	taatggccaa
1861	cagcgtcata	gaagaataga	ttagaaacgt	cccacaagag	taagtgtgct	ttgtgtgaag
1921	tcctcattgc	agggctgtta	agagcacaga	gcctcagcca	cagaggagca	gcattctgga
1981	ctggcaggtg	ctagaggacc	tggggcttct	agagagcaag	cacatggaag	atgctttgtt
2041	ttgtgaggta	ataaacatgt	gaggatgaaa	cttaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa
2101	aaaaaaaaa	aa				

Abbildung 8-30. Lage der intron-überspannenden Pannexin1-Primer in der Pannexin1-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 019482. Panx1cdsnestF, Panx1cdsR, Panx1cdsnestR (rot); Amplikongröße: 463 bp auf cDNA, 1572 bp auf genomischer DNA. Die codierende Sequenz besteht aus fünf Exonen. Exon 1, 3 und 5 sind blau, Start und Stopp-Codon grün dargestellt.Das Intron zwischen Exon 4 und Exon 5 besteht aus 1143 bp.

1	cccgcgtagg	ttccggaaga	gctcggttct	gtagccgagc	gcgcagggcg	ggcgcgggca
61	gctgtagcga	agagctttgt	tcccggcacg	ttgttgcccc	tgcgcgctcg	gagtggccgg
121	agggagtcct	ggtgtcgcgc	gcgccgggcc	cgcgggggct	tagcacggga	gtgattgcta
181	ccgccggagc	tccggggctc	gtgcaccctg	cgttgcttgg	ggcggtccca	ggcagctgca
241	gctcccgtgc	ggtccctgcg	gggtaggtgc	agcgacagcc	aaggcggtac	aatgctgggc
301	ccgcccggga	gcccgggaag	ggaaagcgga	agccgcgcgc	ccggtcggtg	accgcgcgga
361	ttcggcgtct	cgccccggct	gccggcagca	ccggcgcctg	ccctcggctg	cccgtcccgc
421	ggcacccggt	gcgccttgac	c <b>atg</b> gccatc	gcccacttgg	ccacggagta	tgtgttctcg
481	gacttcttgc	tgaaggagcc	caccgagccc	aagttcaagg	ggctgcgact	ggagctggcg
541	gtggacaaga	tggtcacatg	tattgccgtg	ggtctacctc	tgctgctcat	ctcgctggcc
601	ttcgctcagg	agatctccat	cggtacccag	ataagctgct	tctccccgag	ttctttctcc
661	tggcgacagg	ctgcctttgt	ggattcatac	tgctgggctg	ctgtacagca	gaagagctcc
721	ctgcagagcg	agtctggaaa	cctcccactg	tggctgcaca	agttcttccc	ctacatccta
781	ctgctgtttg	ccatactcct	gtacctgccc	gcactcttct	ggcgcttctc	tgcagctcca
841	cacctctgct	cagacctgaa	gtttatcatg	gaggaacttg	acaaagtcta	caaccgcgcc
901	atcaaggctg	ccaagagtgc	tcgagatttg	gacctaagag	acggacctgg	acccccagga
961	gtgactgaga	atgtggggca	gagtctgtgg	gagatatctg	aaagccactt	caagtaccca
1021	atcgtggagc	agtacttgaa	gacaaaaaag	aactctagtc	atttaatcat	gaaatacatt
1081	agctgccggc	tggtgacatt	tgtggttata	ctgttggcat	gtatctactt	gagctattac
1141	ttcagcctct	cttcactctc	ggacgagttt	ctgtgcagca	tcaaatcagg	cgtcctgaaa
1201	aatgacagca	ccatccccga	tcgcttccag	tgcaagctca	tcgccgtggg	catcttccag
1261	ctgctcagcc	tcattaacct	cattgtgtat	gctctgctga	ttcccgtggt	cgtctacacg
1321	ttcttcatcc	cattccggca	gaaaacggac	attctcaaag	tgtatgaaat	cctgcccacc
1381	ttcgatgttc	tacatttcaa	gtctgaaggc	tacaatgact	tgagcctcta	caaccttttt
1441	ctggaagaga	acataagtga	gctcaaatcg	tacaagtgtc	tgaaggtgct	ggagaacatt
1501	aaaagcaatg	ggcagggcat	tgaccccatg	ctactcctga	caaacctggg	catgattaag
1561	atggacatca	ttgatggaaa	aattcccacg	tccctacaga	ccaagggaga	ggaccagggc
1621	agccagagag	tggagttcaa	agatttggac	ctgagcagcg	aggctgca <mark>gc</mark>	aaacaatggg
1681	gagaagaact	ctcgccagag	gcttctgaat	ccgtcctgc <b>t</b>	<b>aa</b> tggtttcc	ttcttgaatt
1741	tcaagcctgt	gacttctgtg	gctgacgcac	ccctgttgga	tctgtagtta	gtttgcagta
1801	gatgtttttg	gtattgatgt	agtgtgtgtc	ctaccaatct	ctaatagaca	taatggccaa
1861	cagcgtcata	gaagaataga	ttagaaacgt	cccacaagag	taagtgtgct	ttgtgtgaag
1921	tcctcattgc	agggctgtta	agagcacaga	gcctcagcca	cagaggagca	gcattctg <mark>ga</mark>
1981	ctggcaggtg	ctagaggacc	tggggcttct	agagagcaag	cacatggaag	atgctttgtt
2041	ttgtgaggta	ataaacatgt	gaggatgaaa	cttaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa
2101	aaaaaaaaaa	aa				

Abbildung 8-31. Lage der Pannexin1-Primer in der Pannexin1-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 019482. Panx1Exon5F, Panx1Exon5R, Panx1Exon5RNest (rot); Amplikongröße: 330 bp. Die codierende Sequenz besteht aus fünf Exonen. Exon 1, 3 und 5 sind blau, Start und Stopp-Codon grün dargestellt.

1 maiahlatey vfsdfllkep tepkfkglrl elavdkmvtc iavglpllli slafaqeisi 61 gtqiscfsps sfswrqaafv dsycwaavqq ksslqsesgn lplwlhkffp yillfaill 121 ylpalfwrfs aaphlcsdlk fimeeldkvy nraikaaksa rdldlrdgpg ppgvtenvgq 181 slweiseshf kypiveqylk tkknsshlim kyiscrlvtf vvillaciyl syyfslssls 241 deflcsiksg vlkndstipd rfqckliavg ifqllslihl ivyallipvv vytffipfrq 301 ktdilkvyei lptfdvlhfk segyndlsly nlfleenise lksykclkvl eniksngqgi 361 dpmllltnlg mikmdiidgk iptslqtkge dqgsqrvefk dldlsseaaa nngeknsrqr 421 llnpsc

Abbildung 8-32. Lage der Pannexin1-Primer in der Aminosäuresequenz von Panx1. Die amplifizierten Bereiche sind in der Aminosäuresequenz rot, die Transmembrandomänen grau unterlegt dargestellt.

"Isoform2"	1351 cccaagcccgtgcgcaggaagacagccacagacacacttattgccccgct	1400
"Isoform1"	1351 cccaagcccgtgcgcaggaagacagccacagacacacttattgccccgct	1400
"Isoform2"	1401 gctggacgctggtgcccgtgctgcccaccactacaagggcagtggaggtg	1450
"Isoform1"	1401 gctggacgctggtgcccgtgctgcccaccactacaagggcagtggaggtg	1450
"Isoform2"	1451 attcaggcccctcctctgccccgcctgctgcctctgagaaaaagcatacc	1500

"Isoform1"	1451	attcaggcccctcctctgccccgcctgctgctctgagaaaaagcatacc	1500
"Isoform2"	1501	cgccacttctccttggacgtgcatccctatatcctaggtaccaagaaggc	1550
"Isoform1"	1501	cgccacttctccttggacgtgcatccctatatcctaggtaccaagaaggc	1550
"Isoform2"	1551	caagactgaggcggtaccccctgccctaccagcctcccgcagccaagaag	1600
"Isoform1"	1551	caagactgaggcggtaccccctgccctaccagcctcccgcagccaagaag	1600
"Isoform2"	1601	gtggcttcctgtcccagacagaggaatgtgggctgggcctagctgcagca	1650
"Isoform1"	1601	gtggcttcctgtcccagacagaggaatgtgggctgggcctagctgcagca	1650
"Isoform2"	1651	cccaccaaagatgctccactccccgagaaggaaatcccgtaccccaca	1698
"isoform1"	1651	cccaccaaagagatgctccactccccgagaaggaaatcccgtaccccaca	1700
"isoform2"	1699	gagcctgccctgccagggctcccatctggggggatcattccatgtctgctc	1748
"isoform1"	1701	gagcctgccctgccagggctcccatctggggggatcattccatgtctgctc	1750
"isoform2"	1749	accccccgcagcccccgccgctgcttccctgtcaccaggcagtctgggca	1798
"isoform1"	1751	accccccgcagcccccgccgctgcttccctgtcaccaggcagtctgggca	1800
"Isoform2"	1799	aggctgaccctctcaccatcctgagccggaacgccactcaccccctgctc	1848
"Isoform1"	1801	aggetgaccetetcaccatectgageeggaacgecacteaccecetgete	1850
"Isoform2"	1849	cacatcagcacgctgtatgaggcccgggaagaggaggaagga	1898
"Isoform1"	1851	cacatcagcacgct	1864
"Isoform2"	1899	tgccccctcagacatgggcgacctcctcagcatacccccgccccagcaga	1948
"Isoform1"	1865	l a	1865
"Isoform2"	1949	tcctcatcgccaccttc <mark>gaggagccgagaacagtt</mark> gtgagtactgtggag	1998
"Isoform1"	1866	tcctcatcgccaccttcgaggagccgagaacagttgtgagtactgtggag	1915
"Isoform2"	1999	ttttgaggggcagggcctcccaggccaccaaaaactctctgcatgagcca	2048
Tsoform1"	1916		1922

Abbildung 8-33. Ausschnitt des Alignments der zu Beginn der Panx2-Studien verfügbaren Isoformen von Panx2. Die 2004 im Hirn entdeckte Panx2-Sequenz ("Isoform1") und die 2006 in der Linse entdeckte Form ("Isoform2") unterschieden sich im C-terminalen Bereich durch zwei zusätzliche Basen der "Isoform2". An Base 1659 und 1660 kommt es dadurch zu einer Leserasterverschiebung, die an Base 1821 durch ein Stopp-Codon zum Kettenabbruch führt. Außerdem unterschieden sich die Sequenzen an den Positionen 1863–1947 bp. Die *Primer*-Sequenzen "Panx2lens/brainF/R", die zur Differenzierung der beiden Formen eingesetzt wurden, sind in rot, die Stopp-Codons in grün dargestellt.

1	atgcaccacc	tcctggagca	gtcggcggac	atggcgaccg	cgctgctggc	gggcgagaag
61	ctgagggagc	tgatcctgcc	tggctcgcag	gacgacaagg	cgggcgcgct	ggccgcgctg
121	ctgctgcagc	tcaagctgga	actgccgttc	gaccgcgtgg	tcaccatcgg	caccgtgctg
181	gtacccatcc	tgctggtcac	cctggtcttc	accaagaact	tcgcagagga	accaatttac
241	tgttatactc	cgcacaactt	cacccgtgat	caggcgctgt	acgcccgcgg	ctactgctgg
301	acagagctgc	gggacgcgct	gcccggcgtg	gatgccagcc	tctggccatc	gttgtttgag
361	cacaagttcc	tgccctacgc	gctgctggcc	tttgccgcca	tcatgtatgt	gcccgcgctg
421	ggctgggagt	tcctcgcctc	cacgcgcctc	acctcggagc	tcaacttcct	tcttcaggag
481	atcgacaact	gctaccaccg	agcggccgaa	ggtcgcgcac	ccaagattga	gaagcagatc
541	cagtccaagg	ggcccggcat	cacggagcgc	gagaagcgag	agatcattga	gaacgccgag
601	aaggagaaga	gcccggagca	gaatctgttt	gagaagtacc	tggaacgccg	gggccgcagc
661	aacttcctgg	ccaagctgta	cttggcacgg	cacgtcctga	tcctgctgct	cagcgtggtg
721	cccatctcct	acctatgcac	atactacgcc	acccagaagc	agaacgagtt	cacctgtgcc
781	ctgggcgcct	cacctgacgg	gccggtgggt	agcgctgggc	ccacggtgcg	cgtcagctgt
841	aagctaccgt	ctgtgcagct	gcagcggatc	attgcaggtg	tggacatcgt	cttgctctgc
901	ttcatgaacc	tcatcatcct	agtcaacctc	atccacctct	tcatcttccg	caagagcaac
961	ttcatcttcg	acaaactaaa	caaggtgggt	atcaagacgc	gccggcagtg	gcgccgctcg
1021	cagttctgcg	acatcaacat	cctggccatg	ttctgtaacg	agaaccgc <mark>ga</mark>	ccacatcaag
1081	tcgctgaacc	ggctggactt	catcaccaac	gagagcgacc	tcatgtacga	caatgtggtg
1141	cggcagcttc	tggctgcctt	ggctcagtct	aaccacgaca	ccacgcccac	tgtgcgggac
1201	tctggcatcc	agaccgtgga	ccccagcatc	aaccctgcgg	agcctgatgg	ttctgctgag
1261	ccacccgtgg	tcaagcggcc		atgaagtgga	tccccaccag	caacccgctg

1321 ccacagccct tcaaggagca gctggccatt atgcgcgtgg aaaacagcaa gactgagaag 1381 cccaagcccg tgcgcaggaa gacagccaca gacacactta ttgccccgct gctggacgct 1441 ggtgcccgtg ctgccacca ctacaagggc agtggaggtg attcaggccc ctcctctgcc 1501 ccgcctgctg cctctgagaa aaagcatacc cgccacttct ccttggacgt gcatccctat 1561 atcctaggta ccaagaaggc caagactgag gcggtacccc ctgcctacc agcctcccgc 1621 agccaagaag gtggcttcct gtcccagaca gaggaagtg ggctgggcct agctgcagca 1681 cccaccaag atgctcact ccccgagaag gaaatccgt acccacaga gcctgccgt 1741 ccagggetc catctgggg atcattccat gtctgetcac ccccgcagc cccgcggct 1801 gcttccctgt caccagcag tctgggcaag gctgacctc tcaccatct gagccggaac 1861 gccactcac ccctgctca catcagcag ctgatggg cccggaaga ggaggaagga 1921 ggccctgt cccctaga catgggcgac ctcctcagca taccccccc cagcagatc 1981 ctcatcgcca ccttcgagga gccgagaaca gttgtgagta ctgtggagtt ttga

Abbildung 8-34. Lage der Pannexin2-Primer in der Pannexin2-Sequenz Genbank-Accession-Nummer NM 001002005.2. Die codierende Sequenz besteht aus drei Exonen. Exon 1 und 3 sind blau dargestellt, die Antikörpersequenz "Panx2S3" ist in grün dargestellt. Das Intron zwischen Exon 2 und Exon3 besteht aus 512 bp. Panx2Exon2F, Panx2Exon2R, Panx2Exon2RNest (rot); Amplikongröße: 318 bp; Panx2intronspF1, Panx2intronspF2, Panx2 intronspR1 (gelb). Amplikongröße 504 bp auf cDNA, 1016 bp auf genomischer DNA.

1 mhhlleqsad matallagek lrelilpgsq ddkagalaal llqlklelpf drvvtigtvl 61 vpillvtlvf tknfaeepiy cytphnftrd qalyargycw telrdalpgv daslwpslfe 121 hkflpyalla faaimyvpal gweflastrl tselnfllqe idncyhraae grapkiekqi 181 qskgpgiter ekreiienae kekspeqnlf ekylerrgrs nflaklylar hvlilllsvv 241 pisylctyya tqkqneftca lgaspdgpvg sagptvrvsc klpsvqlqri iagvdivllc 301 fmnliilvnl ihlfifrksn fifdklnkvg iktrrqwrrs qfcdinilam fcnenrdhik 361 slnrldfitn esdlmydnvv rqllaalaqs nhdttptvrd sgiqtvdpsi npaepdgsae 421 ppvvkrprkk mkwiptsnpl pqpfkeqlai mrvensktek pkpvrrktat dtliapllda 481 garaahhykg sgdsgpssa ppaasekkht rhfsldvhpy ilgtkkakte avppalpasr 541 sqegflsqt eecglglaaa ptkdaplpek eipyptepal pglpsggsfh vcsppaapaa 601 aslspgslgk adpltilsrn athpllhist lyeareeeeg gpcapsdmgd llsipppqi

**Abbildung 8-35 Lage des Panx2-Antikörpers im Panx2-Protein.** Der Antikörper bindet in der C-terminalen Domäne des Panx2-Proteins. Die Transmembrandomänen sind grau unterlegt dargestellt; der Antikörper ist rot dargestellt.

1	atgaacggca	cagagggccc	caatttttat	gtgcccttct	ccaacgtcac	aggcgtggtg
61	cggagcccct	tcgagcagcc	gcagtactac	ctggcggaac	catggcagtt	ctccatgctg
121	gcagcgtaca	tgttcctgct	catcgtgctg	ggcttcccca	tcaacttcct	cacgctctac
181	gtcaccgtac	agcacaagaa	gctgcgcaca	cccctcaact	acatcctgct	caacttggcc
241	gtggctgacc	tcttcatggt	cttcggagga	ttcaccacca	ccctctacac	atcactccat
301	ggctacttcg	tctttgggcc	cacaggctgt	aatctcgagg	gcttctttgc	cacacttgga
361	ggtgaaatcg	ccctgtggtc	cctggtggtc	ctggccattg	agcgctacgt	ggtggtctgc
421	aagccgatga	gcaacttccg	cttcggggag	aatcacgcta	tcatgggtgt	ggtcttcacc
481	tggatcatgg	cgttggcctg	tgctgctccc	ccactcgttg	gctggtccag	gtacatccct
541	gagggcatgc	aatgttcatg	cgggattgac	tactacacac	tcaagcctga	ggtcaacaac
601	gaatcctttg	tcatctacat	gttcgtggtc	cacttcacca	ttcctatgat	cgtcatcttc
661	ttctgctatg	ggcagctggt	cttcacagtc	aaggaggcgg	ctgcccagca	gcaggagtca
721	gccaccactc	agaaggcaga	gaaggaagtc	acccgcatgg	ttatcatcat	ggtcatcttc
781	ttcctgatct	gctggcttcc	ctacgccagt	gtggccttct	acatcttcac	ccaccagggc
841	tccaacttcg	gccccatctt	catgactctg	ccagctttct	ttgctaagag	ctcttccatc
901	tataacccgg	tcatctacat	catgttgaac	aagcagttcc	ggaactgtat	gctcaccacg
961	ctgtgctgcg	gcaagaatcc	actgggagat	gacgacgcct	ctgccaccgc	ttccaagacg
021	gagaccagec	agginger	agoctaa			

Abbildung 8-36. Sonde in der Rhodopsin-Gensequenz Genbank-Accession-Nummer Rhodopsin NM 145383. Rhodopsin-Sonde, hergestellt mit den *Primern* "Rhodopsin mm F1" und "Rhodopsin mmR1", 698bp. Sequenz wurde in 200 bp-Fragmente zerlegt. Exon1, 3, 5: grau unterlegt.

#### 8.5 Kollaborationen

Die *Western-Blot*-Analysen und immunhistochemischen Untersuchungen zum Nachweis der Spezifität des Panx2-Antikörpers wurden in Zusammenarbeit mit apl. Prof. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold und Katharina Schmidt durchgeführt (Bolte *et al.,* in Ausarbeitung).

Daten von Birthe Dorgau und Katharina Schmidt zeigten, dass die von mir beobachtete Panx1-Immunoreaktivität in der äußeren plexiformen Schicht ausschließlich den Horizontalzellen und Bipolarzellen zuzuordnen war (Schmidt *et al.*, in Ausarbeitung).

Die ultrastrukturellen Analysen von Panx2 und Cx36 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Konrad Schulz erstellt (Panx2: Bolte *et al.,* in Ausarbeitung; Cx36: bisher unveröffentlicht).

Prof. Dr. Andreas Feigenspan hat die elektrophysiologischen Daten an transfizierten Zellen erhoben (unveröffentlicht).

Katharina Schmidt bestätigte unter meiner Anleitung im Rahmen ihrer Diplomarbeit die *In-situ*-Hybridisierungen von Panx2 in der Maus-Retina mit Doppelfluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierungen (Schmidt, Katharina Diplomarbeit 2009: "Lokalisation von Pannexin2 in der Maus-Retina mittels *In-situ*-Hybridisierungs- und Immunofluoreszenzanalysen").

Regina Herrling bestätigte meine *RT-PCR*-Daten mit weiteren degenerierten Connexin-*Primern*.

Die Vektoren "Cx36m:pBEHpac18" und "pCx36EGFP-P" wurden von der Arbeitsgruppe Willeke, Institut für Genetik, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt (Horst *et al.*, 1991).

Der Expressionsvektor "Panx1-pcDNA3.1" wurde unter meiner Anleitung im Rahmen der Diplomarbeit von Katharina Stolz hergestellt (Stolz, Katharina Diplomarbeit 2010: "Analyse der Pannexin1-Expression in der Maus-Retina").

### 8.6 Lebenslauf

# Persönliche Daten:

Name	Petra Bolte, geboren Donker
Familienstand	verheiratet
Geburtsdatum	06.06.1974
Geburtsort	Leer-Ostfriesland
Wohnort	Am alten Handelshafen 7, 26789 Leer
Telefon	+49-(0)160-8279083
e-mail	petrabolte@web.de

# Ausbildung und Berufserfahrung:

Teletta Gross-Gymnasium Leer: Abitur
Rheinische Akademie Köln: Ausbildung zur BTA
Forschungstation Wattenmeer Wilhelmshafen: Praktikum
Rheinischen Akademie, Köln: Weiterbildung Gentechnik
Kinderonkologie, Universitätsklinik Köln: BTA, Krebsforschung
Universität Köln: Biologiestudium
Forschungszentrum Jülich: Praktikum Neurobiologie
Institut für Biochemie Universität Köln: Diplomarbeit
University of Queensland, Institute for Molecular Bioscience Brisbane,
Australien: Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Universität Oldenburg: Promotion, Fachgebiet Neurobiologie

#### Symposia:

01.1202.12.2006	3 <sup>rd</sup> Amsterdam Retinal Connexin Meeting, Amsterdam,
	Netherlands
04.1006.10.2007	1 <sup>st</sup> European Retina Meeting, Frankfurt am Main, Germany
20.0725.07.2008	FASEB Research Conference, Retinal Neurobiology and Visual
	Processing; Snowmass, Colorado, USA (Poster)
21.1122.11.2008	4 <sup>th</sup> Retinal Connexin Meeting, Amsterdam, Niederlande,
	(speaker)
25.0329.03.2009	8 <sup>th</sup> Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen
	(speaker)
02.0506.05.2010	ARVO Research Conference, Fort Lauderdale, USA (Poster)
23.0327.03.2011	9 <sup>th</sup> Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen
	(Poster)

#### Publikationen:

Lauw Klaassen, Ziyi Sun, Marvin N. Steijaert, Petra Bolte, Iris Fahrenfort, Trijntje Sjoerdsma, Jan Klooster, Yvonne Claassen, Colleen Shields, Huub M. M. Ten Eikelder, Ulrike Janssen-Bienhold, Georg Zoidl, Douglas McMahon, Maarten Kamermans. Synaptic Transmission from Horizontal Cells to Cones is Impaired by Loss of Connexin Hemichannels. PLOS Biol 9(7): e1001107.doi: 10.1371/journal.pbio.1001107 (published July, 2011).

Petra Bolte, Regina Herrling, Katharina Schmidt, Ulrike Janssen-Bienhold, Karin Dedek, Birthe Dorgau, Konrad Schultz and Reto Weiler. Expression of Pannexin2 in the Mouse Retina (in preparation).

Petra Bolte, Regina Herrling, Ulrike Janssen-Bienhold, Karin Dedek, Britta Frehse, Konrad Schultz and Reto Weiler. Expression of Connexin Genes in Mouse Photoreceptors (in preparation).

Katharina Schmidt, Birthe Dorgau, Regina Herrling, Petra Bolte, Ulrike Janssen-Bienhold, Karin Dedek, Konrad Schultz and Reto Weiler Panx1 is expressed in mouse bipolar cells (in preparation). Dateiname: DISS Bolte zur Veröffentlichung C:\Users\Petra Bolte\AG Reto Oldenburg\Dissertation\Zur Verzeichnis: Veröffentlichung Vorlage: C:\Users\Petra Bolte\AppData\Roaming\Microsoft\Templates\Normal.dotm Titel: Expressionsanalyse von Gap-Junction-Proteinen in Photorezeptoren Thema: Autor: Petra Bolte Stichwörter: Kommentar: Erstelldatum: 15.12.2011 12:11:00 Änderung Nummer: 10 Letztes Speicherdatum: 21.12.2011 11:47:00 Zuletzt gespeichert von: Petra Bolte Letztes Druckdatum: 07.02.2012 21:34:00 Nach letztem vollständigen Druck Anzahl Seiten: 188 Anzahl Wörter: 57.989 (ca.) Anzahl Zeichen: 430.286 (ca.)