

Aus dem Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

**Polymorphismen in den in genomweiten Assoziationsstudien mit
Hypertonie und linksventrikulärer Hypertrophie assoziierten
Connexin-Genen *GJA10* und *GJA5* und ihre Funktion**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Kjestine Schmidt

aus Bad Segeberg

Lübeck 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. de Wit

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. S. Anemüller

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07. Juli 2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Bedeutung von kardiovaskulären Erkrankungen.....	1
1.2.	Entschlüsselung des humanen Genoms	2
1.3.	Genomweite Assoziationsstudien.....	2
1.4.	Blutdruck	4
1.5.	Linksventrikuläre Hypertrophie (LVH)	4
1.6.	Interzelluläre Kommunikation über Gap junctions	6
1.7.	Ziel der Arbeit	14
2.	Material & Methoden.....	15
2.1.	Material.....	15
2.1.1.	Substanzen	15
2.1.2.	Enzyme	19
2.1.3.	Kommerziell verfügbare Kits	19
2.1.4.	Oligonukleotidsequenzen (Primer).....	20
2.1.5.	Molekulare DNA Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese	21
2.1.6.	Vektoren	22
2.1.7.	Bakterienstamm	23
2.1.8.	Zelllinien.....	23
2.1.9.	Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.10.	Geräte.....	25
2.1.11.	Software.....	28
2.1.12.	Lösungen für die β -Galaktosidasefärbung.....	29
2.1.12.1.	Fixierungslösung	29
2.1.12.2.	Waschpuffer.....	29
2.1.12.3.	1x Färbelösung	29
2.1.12.4.	X-Gal-Lösung.....	29
2.1.12.5.	X-Gal-Färbelösung	29
2.1.12.6.	Stopplösung	29
2.1.13.	Probenladepuffer für die Agarose-Gelelektrophorese	30
2.1.14.	TBE-Puffer für die Gelelektrophorese	30

2.1.15.	Luria-Bertani (LB) Broth Medium	30
2.1.16.	Puffer für Plasmidpräparationen (Mini)	31
2.1.17.	Mäuse	31
2.2.	Methoden	32
2.2.1.	Entparaffinierung von Schnitten.....	32
2.2.2.	Telemetrische Messung des arteriellen Blutdrucks	32
2.2.3.	β -Galaktosidasefärbung	34
2.2.4.	PCR an genomischer DNA.....	36
2.2.5.	Agarose-Gelelektrophorese	39
2.2.6.	Aufreinigung der PCR Produkte mittels ExoSAP-IT®.....	40
2.2.7.	Sequenzierung	40
2.2.7.1.	Sequenz-PCR.....	41
2.2.7.2.	Aufreinigung der Sequenz-PCR Produkte mit Sepadex & Sequenzierung.....	41
2.2.8.	Einbringen einer DNA-Sequenz in einen Vektor – Ligation	42
2.2.9.	Transformation eines Vektors in <i>E. coli</i> DH5 α	42
2.2.10.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> DH5 α nach der Methode der alkalischen Lyse (Mini)	43
2.2.11.	Isolierung von reiner Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> DH5 α für die Transfektion (Midi).....	44
2.2.12.	Restriktionsverdau	44
2.2.13.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	44
2.2.14.	Transfektion von HeLa und HMEC-1 Zellen & Reporter-gen-Assay	45
2.2.15.	Statistik	47
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Bedeutung von Cx57 für die Blutdruckregulation	48
3.1.1.	Telemetrische Blutdruckmessung bei Cx57-defizienten Tieren	48
3.1.2.	Expression von Cx57.....	52
3.2.	Untersuchungen zur Assoziation des Cx40-Gens mit linksventrikulärer Hypertrophie	56
3.2.1.	Sequenzierung der codierenden Region von <i>GJA5</i>	57
3.2.2.	Sequenzierung der Promotorregion von <i>GJA5</i>	57
3.2.3.	Funktionelle Analyse der Polymorphismen mittels Reporter-gen-Assay	63

4.	Diskussion.....	69
4.1.	Die Regulation des arteriellen Blutdrucks erfolgt unabhängig von Cx57...	69
4.2.	Assoziation von SNPs in der Promotorregion von <i>GJA5</i> mit Hypertonie und LVH	71
5.	Zusammenfassung	78
6.	Literaturverzeichnis	80
7.	Kongressbeiträge & Auszeichnungen.....	91
7.1.	Vorträge	91
7.2.	Poster	93
7.3.	Auszeichnungen	95
8.	Publikationen	96
8.1.	Beiträge zu wissenschaftlichen Journalen	96
8.2.	Abstract-Publikationen	97
9.	Anhang.....	100
9.1.	Gelelektrophorese-Bilder.....	100
9.2.	Abkürzungsverzeichnis	109
9.3.	Abbildungsverzeichnis	113
9.4.	Tabellenverzeichnis	115
10.	Danksagung.....	116

1. Einleitung

1.1. Bedeutung von kardiovaskulären Erkrankungen

Laut statistischem Bundesamt sind im Jahr 2011 in Deutschland 342 233 Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen (Herz-Kreislaferkrankungen) gestorben, 145 555 Männer und 196 678 Frauen. Unter den zehn häufigsten Todesursachen im Jahr 2011 finden sich vorrangig kardiovaskuläre Erkrankungen wie die chronische ischämische Herzkrankheit (Platz 1), der akute Myokardinfarkt (Platz 2), die Herzinsuffizienz (Platz 3), der Schlaganfall (Platz 6) und die hypertensive Herzkrankheit (Platz 7). Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems verursachen die höchsten Kosten in unserem Gesundheitssystem (ca. 37 Milliarden Euro im Jahr 2008) und nehmen im Alter drastisch zu (Statistisches Bundesamt www.destatis.de und Gesundheitsberichterstattung des Bundes www.gbe-bund.de). Aus der stetig zunehmenden durchschnittlichen Lebenserwartung ergibt sich in Zukunft eine weitere Zunahme der Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und ein Anstieg der damit verbundenen Gesundheitskosten. Zu den Ursachen von kardiovaskulären Erkrankungen gehören unter anderem Hypertonie, erhöhter Cholesterinspiegel (Hypercholesterinämie), Diabetes mellitus, Übergewicht und Rauchen. Neben diesen Ursachen sind auch genetische Faktoren beteiligt, die zum größten Teil noch unbekannt sind. Daher ist es von großem Interesse, beteiligte genetische Faktoren und Stoffwechselwege zu identifizieren, die zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen, um die Erkrankungen besser zu verstehen, den Pathomechanismus zu ergründen, und letztendlich besser behandeln oder gar verhindern zu können.

1.2. Entschlüsselung des humanen Genoms

Das menschliche Genom und die spezifische Basenabfolge wurden im Humangenomprojekt (www.ornl.gov) zwischen 1990 und 2003 entschlüsselt. Das Projekt identifizierte zwischen 20 000 und 25 000 Gene auf 3,2 Milliarden Basenpaaren eines menschlichen Chromosomensatzes. Über 99 % der Basenpaare des Genoms sind identisch zwischen den Menschen. Allerdings tritt ca. alle 300 bp eine Veränderung im Genom auf, so dass das menschliche Genom ungefähr 10 Millionen Veränderungen aufweist (<http://ghr.nlm.nih.gov>). Das internationale HapMap Projekt, welches im Jahr 2002 startete, hatte sich die Aufgabe gestellt, genetische Varianten im menschlichen Genom der europäischen, afrikanischen und asiatischen Bevölkerung zu identifizieren (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en>). Hierbei fokussiert sich das HapMap Projekt auf sogenannte Haplotypen, wobei die beteiligten Forscher die genetische Kopplung der Allele im Genom untersuchen. Bestimmte Regionen, die auf dem Chromosom nahe beieinander lokalisiert sind, werden gemeinsam vererbt, woraus sich die immer gleiche Abfolge der einzelnen Basenaustausche (engl. single nucleotide polymorphisms, SNP) ergibt, so dass von einem SNP auf einen benachbarten geschlossen werden kann. Diese Kopplung ist bedingt durch die Tatsache, dass die Loci so nah beieinander liegen, dass nahezu keine homologe Rekombination stattfindet. Hieraus ergibt sich, dass statt aller 10 Millionen SNPs eine deutlich geringere Zahl analysiert werden muss, um das Genom abzudecken.

1.3. Genomweite Assoziationsstudien

Für eine genaue Analyse genetischer Varianten und der Suche nach genetischen Ursachen bestimmter Erkrankungen bedient sich die medizinische Forschung sogenannter Microarrays in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS). Diese Biochips ermöglichen die automatisierte Untersuchung von bis zu 906 600 DNA Varianten (SNPs) in einem Array, so dass ein großer Bereich des Genoms abgedeckt werden kann (z.B. Genome-Wide Human SNP Array 6.0 von Affymetrix®). Auf den Biochips befinden sich kurze bekannte DNA-Fragmente, die je nach Hybridisierung mit der zu untersuchenden markierten replizierten Probanden-DNA unterschiedlich starke Fluoreszenzsignale aussenden.

Isolierte genomische DNA (500 ng) der Probanden wird mit Hilfe zweier Restriktionsendonucleasen (*NspI*, *StyI*) verdaut. An die entstandenen 4 bp langen Überhänge werden spezifische Adaptermoleküle mit Hilfe der T4 DNA Ligase gebunden. Nun erfolgt eine Amplifikation der verschieden langen Fragmente unter Verwendung von Primern, die die Adaptermoleküle erkennen. Die aufgereinigte amplifizierte DNA wird anschließend mit DNaseI fragmentiert, mit Biotin durch die terminale Desoxynucleotidyl-Transferase markiert und mit dem Chip hybridisiert. Nach einer Streptavidin-Phycoerythrin-Färbung zur Erkennung biotinylierter DNA werden die rot-orangen Phycoerythrin-Fluoreszenzsignale detektiert (Absorptionswellenlänge: 450-580 nm, Emissionswellenlänge: 570-590 nm).

Durch den Vergleich der genetischen Varianten einer Gruppe erkrankter Probanden mit einer Kontrollgruppe können bestimmte SNPs als mit einer Krankheit assoziiert identifiziert werden. Nach Replikation der Daten und biostatistischer Verifizierung der Assoziation eines SNPs mit einer Krankheit kann die funktionelle Analyse dieses SNPs erfolgen. Zunächst werden möglicherweise von der Veränderung betroffene Gene in der Umgebung des SNPs identifiziert, welche anschließend mit Hilfe molekularbiologischer und physiologischer Methoden funktionell analysiert werden (z.B. Untersuchung von genetisch veränderten Tiermodellen, Expressionanalysen im Zellkultursystem, Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen), um einerseits eine Kausalität zu belegen und andererseits die Pathophysiologie besser zu verstehen, so dass möglicherweise eine geeignetere Therapie oder sogar die Prävention polygenetischer Erkrankungen erreicht wird.

In genomweiten Assoziationsstudien wurden bis heute über 50 Gene mit Hypertonie (arterielle Hypertonie, systolisch ≥ 140 mmHg, diastolisch ≥ 90 mmHg) in Verbindung gebracht (Simino *et al.*, 2012; The International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies *et al.*, 2011; Newton-Cheh *et al.*, 2009). Jedoch ist es größtenteils unklar, inwieweit diese Gene zum Pathomechanismus der Erkrankung beitragen, da sie meist nicht an bekannten und offensichtlich beitragenden Stoffwechselwegen wie z.B. dem Lipidmetabolismus bei Herz-Kreislaufkrankungen beteiligt sind. Die außerordentlich schwierige Identifikation der Netzwerke, in denen die assoziierten Genprodukte miteinander wechselwirken, zeigt wie komplex polygenetische

Erkrankungen sind. Hypertonie stellt zudem einen Risikofaktor für verschiedene Herz-Kreislaufkrankungen wie die Herzinsuffizienz, den Myokardinfarkt, den Schlaganfall und die linksventrikuläre Hypertrophie (hypertensive Herzkrankheit) dar.

1.4. Blutdruck

Eine Klassifizierung der systolischen und diastolischen Blutdruckwerte in Bezug auf Normotonie (normaler Blutdruck) und Hypertonie (erhöhter Blutdruck) erfolgt unter anderem durch die Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL[®]. Sie ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Einteilung	systolischer Wert [mmHg]	diastolischer Wert [mmHg]
optimal	<120	<80
normal	120 bis 129	80 bis 84
hochnormal	130 bis 139	85 bis 89
leichte Hypertonie	140 bis 159	90 bis 99
mittelschwere Hypertonie	160 bis 179	100 bis 109
schwere Hypertonie	≥180	≥110
isolierte systolische Hypertonie	≥140	<90

Tabelle 1: Klassifizierung der Blutdruckdaten entsprechend der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL[®]

1.5. Linksventrikuläre Hypertrophie (LVH)

Bei anhaltender erhöhter Arbeitsbelastung des Herzens durch Sport oder systemische Hypertonie kommt es zur Zunahme der Wandspannung des Ventrikels (Kraft / Wandquerschnitt) und dies wiederum führt zu einer Volumenzunahme (Hypertrophie) der Herzmuskelzellen. Die Zunahme der Wanddicke bei gleichbleibendem Innenradius des Ventrikels (konzentrisches Remodelling) kompensiert die erhöhte Arbeitsbelastung und normalisiert die Wandspannung. Dieser Zusammenhang wird aus dem Laplace Gesetz deutlich.

$$K = \frac{P * r}{(2d)}$$

K = Wandspannung

P = transmuraler Druck (Differenz von Innen- und Außendruck)

r = Innenradius

d = Wanddicke

Bei einer weiteren Zunahme der Herzbelastung kommt es zur Dilatation des hypertrophierten Ventrikels. Daraus ergibt sich über die Druckbelastung und der verdickten Ventrikelwand hinaus ein vergrößerter Innenradius (exzentrisches Remodelling). Da die Wandspannung proportional mit dem Radius zunimmt, benötigt das Herz mehr Kraft, um ein normales Schlagvolumen zu fördern, so dass das Risiko des Herzversagens (Herzinsuffizienz) oder gar des plötzlichen Herztods steigt (Lorell & Carabello, 2000).

Verschiedene Studien zur Häufigkeit der LVH und dessen Risikofaktoren ergaben zwar unterschiedliche Prävalenzen bedingt durch unterschiedliche Untersuchungsmethoden und verwendete Kriterien in unterschiedlichen Populationen, aber es ist unbestritten, dass Bluthochdruck zu den wichtigsten Risikofaktoren der LVH zählt und die Kombination beider Erkrankungen das weitere Risiko kardiovaskulärer Ereignisse drastisch erhöht. So wurden beispielsweise im Rahmen der Framingham Studie 2230 Männer und 2747 Frauen mittels Echokardiografie untersucht. Die Daten zeigten eine steigende Prävalenz für die linksventrikuläre Hypertrophie mit dem Alter, bei Männern unter 30 von 8% auf 33% ab 70 Jahren und bei Frauen ein Anstieg von 5% auf 49%. In dieser Studie ergab sich für Männer zwischen 32 und 64 Jahren mit Hypertonie und LVH ein doppelt bis dreifach erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse wie Schlaganfall, koronare Herzkrankheit und periphere arterielle Verschlusskrankheit (Kannel, 1992). In einer Population bestehend aus 2794 norwegischen Probanden (Tromsø Studie) ergab die Echokardiografie eine allgemeine LVH-Prävalenz von 15% für Männer und von 9% für Frauen (Schirmer *et al.*, 1999). Bei Probanden mit milder essentieller Hypertonie lag die mittels Echokardiographie diagnostizierte LVH-Prävalenz bei ca. 20% (Hammond *et al.*, 1986), während die LVH Prävalenz in einer italienischen Population mit essentieller Hypertonie bestehend aus der PIUMA Kohorte (n=1686) und der Catanzaro Kohorte (n=239) je nach ausgewählten Kriterien zwischen 24% und 40% lag und somit die Häufigkeit in einer unselektierten

Population deutlich überstieg. Zudem wurde eine lineare Beziehung zwischen der durch Echokardiografie festgestellten linksventrikulären Masse und dem Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses wie Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod, Herzinsuffizienz und Schlaganfall aufgezeigt (Schillaci *et al.*, 2000; Verdecchia *et al.*, 1998). In der spanischen VITAE-Studie, bestehend aus 946 hypertensiven Probanden, lag die LVH-Prävalenz je nach angewendeten Kriterien zwischen 59% und 73%. 51-54% der Patienten wiesen eine exzentrische und 6-11% der Patienten eine konzentrische Hypertrophie auf. Somit zeigte diese Studie die Abhängigkeit der LVH-Prävalenz vor allem von dem systolischen Blutdruck, aber auch von Geschlecht, Alter, BMI sowie den zugrunde gelegten Auswertungskriterien der LVH (Coca *et al.*, 1999). Aus der spanischen Hermex Studie geht überdies hervor, dass ca. 80% der Patienten über 55 Jahren mit LVH eine Hypertonie aufweisen (Félix-Redondo *et al.*, 2012). Zusammenfassend zeigen diese Daten eine erhöhte Prävalenz der LVH bei Hypertonie und weiterhin eine ausnehmend hohe Prävalenz von Hypertonie bei Vorliegen einer LVH.

1.6. Interzelluläre Kommunikation über Gap junctions

Gap junctions (GJ) sind Ansammlungen interzellulärer Kanäle, die den Austausch von Ionen und kleinen Molekülen (IP_3 , cAMP, cGMP, AMP) bis zu einer Größe von 1 kDa (Flagg-Newton *et al.*, 1979; Loewenstein, 1981; Kumar & Gilula, 1996; Alexander & Goldberg, 2003) zwischen benachbarten Zellen ermöglichen. Hierdurch können Zellen somit direkt elektrochemisch miteinander kommunizieren.

Die Regionen zweier verbundener Plasmamembranen erregbarer Zellen (glatter Muskelzellen des Jejunums), die eine elektrotonische Kommunikation (Ionenströme) erlauben, wurden 1962 als Nexus beschrieben (Dewey & Barr, 1962). Die hexagonale Struktur von Gap junctions wurde erstmals an synaptischen Membrankomplexen von großen Neuronen des Goldfisches (Mauthner Zellen) gezeigt (Robertson, 1963). Aufgrund des kleinen Spalts (engl.: gap) von ca. 20 Ångström zwischen den gegenüberliegenden Zellmembranen wurde diese Art von Zellverbindungen Gap junctions genannt (Revel & Karnovsky, 1967; Goodenough & Revel, 1970). Goodenough isolierte 1974 unterschiedliche Proteine aus Gap junctions der Leber von Ratten, die er aufgrund des Namens dieser Zellverbindungen (Nexus) als Connexine bezeichnete (Goodenough, 1974).

und zwei Jahre später die hexagonalen Untereinheiten der Gap junctions als Connexon (Goodenough, 1976).

Connexine durchspannen die Plasmamembran viermal und besitzen zwei extrazelluläre Schleifen mit jeweils drei konservierten Cysteinresten, welche essentiell für die nicht-kovalente Bindung gegenüberliegender Connexone sind. Weiterhin weisen sie eine intrazelluläre Schleife zwischen der zweiten und dritten transmembranären Domäne und einen in das Zytoplasma ragenden N- und C-Terminus auf (Abb. 1). Die intrazelluläre Schleife und der C-Terminus variieren zwischen verschiedenen Mitgliedern der Connexinfamilie (Milks *et al.*, 1988; Yeager & Gilula, 1992; Kumar & Gilula, 1996; Dhein, 1998) und verleihen ihnen unterschiedliche Molekulargewichte.

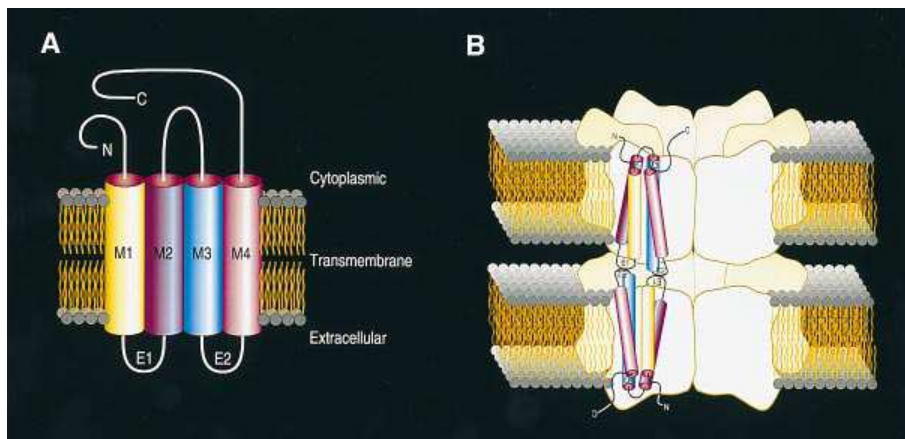


Abbildung 1: Topologie von Connexinen

(A) Ein Connexin besteht aus vier Transmembrandomänen (M1-4), zwei extrazellulären Schleifen, einer intrazellulären Schleife und jeweils einem in das Zytoplasma ragenden C- und N-Terminus. Sechs Connexine lagern sich zu einem Halbkanal (Connexon) in der Plasmamembran zusammen, und zwei benachbarte Connexone bilden einen funktionellen Kanal (B) (Abbildung aus Kumar & Gilula, 1996).

Bis heute wurden 21 Connexine (Cx) im Menschen und 20 Connexine in der Maus identifiziert, wobei es für 19 humane Connexine ein entsprechendes Ortholog in der Maus gibt (Sohl & Willecke, 2004). Connexine werden nach ihrem Molekulargewicht in kDa bezeichnet, so hat Connexin40 (Cx40) ein Molekulargewicht von ca. 40 kDa. Viele der 21 Isoformen können sich in unterschiedlichen Kombinationen zu einem funktionellen Kanal zusammenlagern (Abb. 2), woraus sich unterschiedliche Porengrößen, Permeabilitäten und Leitfähigkeiten der Kanäle ergeben (Kumar & Gilula, 1996; Bevans *et al.*, 1998). Die Leitfähigkeit einzelner Kanäle reicht von ca. 10 pS bis über 300 pS, und

auch die Selektivität variiert zwischen leicht Anionen-selektiven (Cx32) und stark Kationen-selektiven Kanälen (Cx40, Cx45) (Harris, 2007). Isoformen, die mit anderen Connexinen keine Kanäle bilden können, könnten an der Kompartimentierung während der Embryogenese beteiligt sein (Francis *et al.*, 1999). Viele Studien weisen auch auf eine Gap Junction unabhängige Funktion der Connexone als Kanäle in der Plasmamembran hin (Ebihara, 2003; Goodenough & Paul, 2003; Evans *et al.*, 2006). Durch sie erfolgt die Freisetzung von z.B. ATP (Stout *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2008), Glutamat (Orellana *et al.*, 2011), NAD^+ (Okuda *et al.*, 2013) oder Calcium in den Extrazellulärraum (De Bock *et al.*, 2012; Fiori *et al.*, 2012).

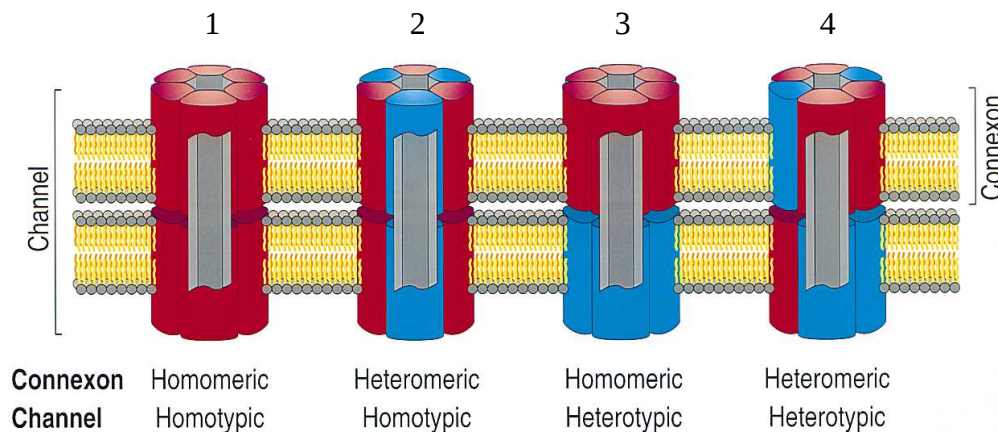


Abbildung 2: Möglicher Aufbau der interzellulären Kanäle

Connexone aus identischen Connexinen werden als homomere (1,3), solche aus unterschiedlichen Connexinen als heteromere Connexone (2,4) bezeichnet. Bilden zwei identische Connexone einen funktionellen Kanal, so ist es ein homotypischer Kanal (1,2), handelt es sich um unterschiedliche Connexone, bilden sie einen heterotypischen Kanal (3,4) (Abbildung aus Kumar & Gilula, 1996).

Connexine werden nahezu in Zellen aller Gewebe in unterschiedlicher Ausprägung und in spezifischen Isoformen exprimiert (Willecke *et al.*, 2002). Zellen, die keine Connexine exprimieren, sind beispielsweise ausdifferenzierte Skelettmuskelzellen, Erythrozyten, Thrombozyten und Samenzellen. Bereits im 2-Zell- bis 4-Zell-Stadium eines Mausembryos werden Connexine (Cx31, Cx43, Cx45) exprimiert (Lo & Gilula, 1979; Davies *et al.*, 1996). Einige spielen in der Embryogenese eine entscheidende Rolle, wie der globale Verlust verschiedener Cx gezeigt hat. Im kardiovaskulären System finden sich Cx37, Cx40, Cx43 und Cx45. Auch hier ist die Verteilung verschiedener Cx auf bestimmte Zelltypen sehr spezifisch (Abb. 3) (Kanter *et al.*, 1992; Dhein, 1998). In Gefäßen wird im

Endothel überwiegend Cx40 und Cx37 und im glatten Muskel dagegen vor allem Cx43 aber auch Cx45 exprimiert (de Wit, 2004). Die kardiovaskulären Connexine können mit Ausnahme von Cx40 und Cx43 heterotypische funktionelle Kanäle bilden. Dies zeigten verschiedene Studien, in denen die Cx entweder funktionell nach Mikroinjektion in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert (Bruzzone *et al.*, 1993) oder nach Transfektion in HeLa Zellen exprimiert wurden (Elfgang *et al.*, 1995; Rackauskas *et al.*, 2007).

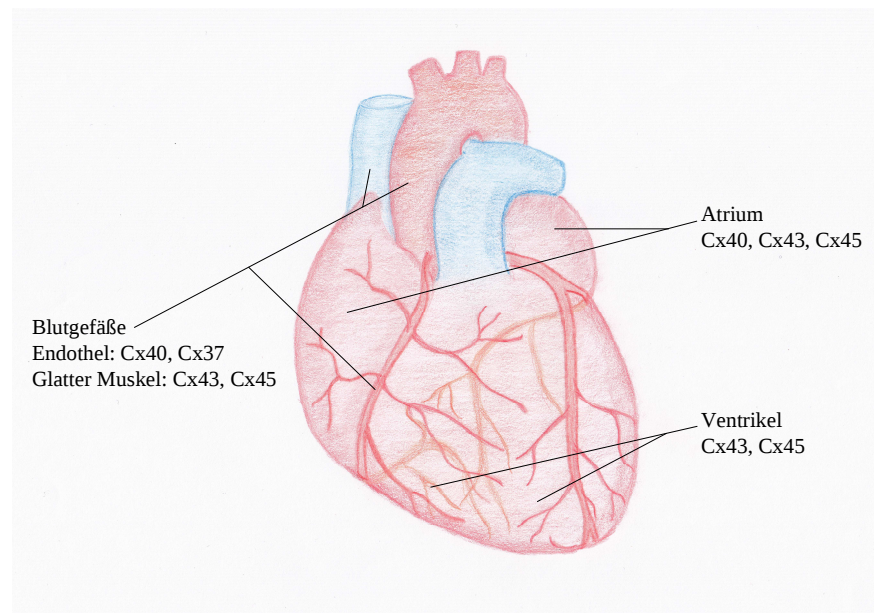


Abbildung 3: Verteilung der Connexin Isoformen innerhalb des Herzens

Connexine haben eine herausragende Bedeutung für verschiedenste Organfunktionen und spielen somit bei unterschiedlichsten Krankheiten in Mensch und Tier eine Rolle. Ein guten Überblick bieten die Übersichtsarbeiten von Willecke *et al.* (2002) und Pfenniger *et al.* (2011) und einige Beispiele für die Bedeutung einzelner Connexine werden im Folgenden ausgeführt.

Global Cx26-defiziente Mäuse sterben *in utero* aufgrund einer unzureichenden Versorgung des Embryos über die Plazenta mit Nährstoffen (Gabriel *et al.*, 1998). Cx26 ist auch an der Schallwahrnehmung beteiligt. Ein spezifischer Cx26-Knockout in Epithelzellen des Innenohres der Maus führt zu einer Beeinträchtigung des Hörvermögens (Cohen-Salmon *et al.*, 2002). Beim Menschen führen Mutationen im Cx26, Cx30 oder Cx31 zu Taubheit und Hauterkrankungen mit Verhornungsstörungen (Kelsell *et al.*, 1997; Petersen & Willems, 2006). Mutationen in Cx46 und Cx50 verursachen eine Linsentrübung (Katarakt). Das

Charcot-Marie-Tooth Syndrom ist eine schwere neurodegenerative Erkrankung mit Muskelatrophie, die auf Mutationen im Cx32 zurückzuführen ist. Eine Deletion von Cx37 führte in weiblichen Mäusen zur Infertilität (Simon *et al.*, 1997). Als weiterer Beleg für die Rolle von Connexinen in der Embryonalentwicklung ist Cx45 zu nennen. Cx45-defiziente Embryos sterben *in utero* aufgrund eines dilatierten Herzens und der Fehlentwicklung von Blutgefäßen (Kruger *et al.*, 2000). Zu einer Fehlentwicklung des Herzens führt ebenfalls der Verlust von Cx43, homozygot defiziente Mäuse sterben bei oder kurz nach der Geburt (Reaume *et al.*, 1995).

Im Folgenden wird die Bedeutung des Cx40 und Cx57 näher erläutert, da dieser Arbeit Untersuchungen zu diesen beiden Connexinen zugrunde liegen.

Cx40 wird im Endothel, in Kardiomyozyten des Atriums, im Erregungsleitungssystem des Herzens und in Renin-produzierenden Zellen der Niere exprimiert (Bruzzzone *et al.*, 1993; Dhein, 1998; Hwan Seul & Beyer, 2000; de Wit, 2004; Haefliger *et al.*, 2004). In der Maus entsteht ausgehend vom Cx40 Gen (*Gja5*) ein Transkript, dessen Leserahmen nicht durch ein Intron unterbrochen wird und dessen codierende Region im Exon2 gelegen ist (Hennemann *et al.*, 1992). Im Menschen werden dagegen zwei Transkripte exprimiert, wobei die beiden Transkripte (1A und 1B) dieselbe codierende Region in Exon 2 aufweisen und sich nur in Exon 1 unterscheiden. Transkript 1A wird in Endothelzellen exprimiert (Pfenniger *et al.*, 2012), das Transkript 1B in plazentaren Zytotrophoblasten. Beide Transkripte sind im Ventrikel und Atrium des Herzens nachweisbar, jedoch überwiegt in allen Bereichen das Transkript 1A (Dupays *et al.*, 2003). Die Deletion von Cx40 hat in der Maus schwerwiegende Phänotypen zur Folge. Es kommt durch den ubiquitären Verlust des Cx40 zu einer verzögerten Erregungsausbreitung im Herzen (Simon *et al.*, 1998), die mit einer erhöhten Anfälligkeit für Arrhythmien und Vorhofflimmern einhergeht (Kirchhoff *et al.*, 1998; Hagendorff *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurde ein gehäuftes Auftreten von Herzfehlbildungen in Cx40-defizienten Mäusen festgestellt (Gu *et al.*, 2003). In Gefäßen wird Cx40 im Endothel exprimiert und ist essentiell für die Kopplung der Endothelzellen und die Ausbreitung vasodilatatorischer Stimuli entlang dieser Zellschicht. So ist die Ausbreitung endothelabhängiger Dilatationen nach lokaler Stimulation in der Mikrozirkulation des Cremastermuskels in Cx40-defizienten Mäusen vermindert (de Wit *et al.*, 2000; Figueroa *et al.*, 2003; Jobs *et al.*,

2012). Weiterhin sind global Cx40-defiziente Mäuse hypertensiv, weisen aber eine normale Herzfrequenz auf (de Wit *et al.*, 2003). Die Hypertonie ist bedingt durch eine exzessive Freisetzung von Renin. Durch das Fehlen von Cx40 ist die Kommunikation innerhalb der Renin-produzierenden Zellen im juxtaglomerulären Apparat der Niere gestört, wodurch der Perfusionsdruck die Reninsekretion in der Niere nicht mehr inhibiert (Wagner *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2010). Auch bei vaskulären Entzündungsprozessen kommt Cx40 eine Bedeutung zu. In einem Atherosklerosemodell in der Maus führte die endothelspezifische Cx40-Defizienz zu einer verstärkten Produktion des Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) und zu einer verminderten Expression der antiinflammatorisch wirksamen Nukleotidase CD73. Beides führt zu einer verstärkten Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen und begünstigt so die Entstehung der Atherosklerose (Chadjichristos *et al.*, 2009).

Im Gegensatz zu anderen Cx, für die bereits seit längerer Zeit eine ganze Reihe von Mutationen im Menschen beschrieben wurde, wurden im Cx40 bisher nur einige wenige funktionell bedeutende Mutationen in einzelnen Individuen beschrieben. In einer kleinen Studie wurde der Hypothese nachgegangen, ob Mutationen im Cx40 codierenden Gen *GJA5* speziell im Herzgewebe zu Vorhofflimmern prädisponieren, da Cx40 in den Kardiomyozyten für die koordinierte elektrische Aktivierung des Vorhofs relevant ist. In Gewebeproben des Herzens von 15 Probanden mit Vorhofflimmern konnten vier heterozygote Missense-Mutationen jeweils in der transmembranären Domäne des Cx40 in drei Patienten identifiziert werden. Es handelte es sich um eine Keimbahnmutation, die zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Serin an Position 96 (A96S) führt, und drei somatische Mutationen (P88S, G38D, M163V) (Gollob *et al.*, 2006). GJ Plaques bestehend aus der A96S Variante wiesen zwar eine dem Wildtyp entsprechende zelluläre Lokalisation in Gewebeproben des Vorhofs auf, im Zellkulturmodell zeigte sich jedoch, dass diese Variante keine bzw. nur eine schwache elektrische Zellkopplung hervorbringt. Das Elektrokardiogramm des Patienten wies eine verlängerte P-Welle auf, was die verzögerte Ausbreitung der Erregung im Vorhof reflektiert. Das Einführen dieses Aminosäureaustausches A96S in das Cx40 der Maus führte zu einer Renin-abhängigen Hypertonie. Die Renin-produzierenden Zellen wiesen eine anomale Lokalisation außerhalb der Media der afferenten Arteriolen auf. Aufgrund dieser veränderten Lokalisation konnte die Renin-Sekretion durch den Perfusionsdruck in der Niere nicht mehr gesenkt werden

(Lübckemeier *et al.*, 2011). Mäuse, die ein nicht leitfähiges Cx40 mit der A96S Mutation exprimierten, zeigten zudem trotz intakter Cx37 Expression in Arteriolen des Cremastermuskles eine verminderte Ausbreitung endothelabhängiger Dilatationen nach lokaler Stimulation in der Mikrozirkulation (Jobs *et al.*, 2012). Desweiteren wird die funktionelle Bedeutung des Cx40 für die Erregungsfortleitung im Herzen durch die Entdeckung von zwei gekoppelten Polymorphismen in der Promotorregion des Transkripts 1A von Cx40 (-44 G>A, +71 A>G) unterstrichen. Das Auftreten dieser Polymorphismen in der Promotorregion von Cx40 gemeinsam mit einer Mutation im Natriumkanal des Herzens (SCN5A) ist assoziiert mit familiärem Vorhoffstillstand (Groenewegen *et al.*, 2003). Außerdem waren die zwei Polymorphismen, ähnlich wie der Verlust des Cx40 in der Maus, mit einer höheren Anfälligkeit für Vorhofflimmern assoziiert (Firouzi *et al.*, 2004). Interessanterweise sind diese Polymorphismen in Männern möglicherweise mit einem höheren Risiko an Hypertonie zu erkranken assoziiert (Firouzi *et al.*, 2006). Diesen Ergebnissen widerspricht aber eine kürzlich veröffentlichte Studie an einer größeren Kohorte, in der keine Assoziation dieser Polymorphismen mit Hypertonie oder koronarer Herzkrankheit gefunden werden konnte (Pfenniger *et al.*, 2012). Ein weiterer Polymorphismus in der Promotorregion des anderen Transkripts (1B) reduziert signifikant die Expression von Cx40 und ist direkt mit Vorhofflimmern assoziiert (Wirka *et al.*, 2011), obwohl das Transkript 1A quantitativ vermehrt im Herzen zu finden ist. Trotz der teils kontroversen Ergebnisse zur funktionellen Bedeutung von Cx40 bei Herz-Kreislaufenerkrankungen wird deutlich, dass Cx40 für die funktionelle Kopplung von Zellen in der Niere, in Gefäßen der Mikrozirkulation und im Herzen unerlässlich ist.

Cx57 kommt unter anderem in der Maus vor und wird von *Gja10* codiert. Als humanes Ortholog gilt Cx62, welches in der Retina, den Eierstöcken und im Herzen exprimiert wird (Willecke *et al.*, 2002; Söhl *et al.*, 2003; Söhl *et al.*, 2010). Cx57 mRNA wurde in sehr geringem Ausmaß im Herzen, der Haut, Niere, Lunge, den Eierstöcken und Hoden von Mäusen detektiert. Cx57 bildet nach Transfektion in HeLa Zellen mit Cx30.3, Cx37 und Cx43 funktionelle heterotypische Kanäle (Manthey *et al.*, 1999). Nachdem durch die Insertion eines *lacZ* Reportergens in den Leserahmen des Cx57 eine Cx57-defiziente Maus generiert wurde, konnte als Hauptexpressionsort des Cx57 die Horizontalzellen in der Netzhaut des Auges (Retina) bestimmt werden (Hombach *et al.*, 2004). Eine schwache Expression wurde im Thymus gezeigt, jedoch wurde die Expression des Cx57 auf mRNA

Ebene in anderen Organen wie von Manthey *et al.* beschrieben nicht bestätigt. Die Expression von Cx57 in den Horizontalzellen wurde ebenfalls immunhistochemisch mit Cx57-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Janssen-Bienhold *et al.*, 2009). Horizontalzellen sind Neurone, die Informationen der Photorezeptoren (Stäbchen, Zapfen) an Bipolarzellen weiterleiten. Sie tragen durch die horizontale Verschaltung zur Lichtadaptation und Kontrastwahrnehmung bei. Cx57-defiziente Mäuse weisen reduzierte rezeptive Felder der Retina auf (Shelley *et al.*, 2006). Ein rezeptives Feld ist ein Bereich der Retina mit einer bestimmten Anzahl von Photorezeptoren, deren Information letztlich auf eine einzelne Ganglienzelle konvergiert. Die Reizung des Zentrums eines rezeptiven Feldes führt zur Hemmung seiner Peripherie. Diese Hemmung wird durch Horizontalzellen zwischen den Photorezeptoren des Zentrums und der Peripherie vermittelt (laterale Inhibition). Eine Vergrößerung der rezeptiven Felder führt zu einer höheren Lichtempfindlichkeit und einer geringeren Sehschärfe (Dunkeladaptation). Die Annahme, dass durch die Cx57-abhängige Kopplung der Horizontalzellen die Peripherie der rezeptiven Felder verändert wird, lässt sich aber in Untersuchungen zur Lichtadaptation in Cx57-defizienten Mäusen nicht verifizieren. Cx57-defiziente Mäuse zeigten das gleiche Verhalten wie Wildtypiere bezüglich Ortsfrequenzen (Anzahl der Hell-Dunkel-Perioden eines betrachteten Musters bezogen auf den Sehwinkel) unter verschiedenen Helligkeitsbedingungen (Dedek *et al.*, 2008), so dass die Cx57-abhängige Kopplung von Horizontalzellen keine entscheidende Rolle in der Dunkeladaptation zu spielen scheint. Jedoch konnte quantitativ mittels real-time PCR und immunhistochemisch gezeigt werden, dass eine Dunkeladaptation die Cx57-Expression in Mäusen reduziert (Kihara *et al.*, 2006; Janssen-Bienhold *et al.*, 2009). Die Bedeutung des Cx57 in den Horizontalzellen der Retina bleibt somit letztlich unklar. Weitere Northern-Blot Analysen an Wildtyp Kontrolltieren ergaben die Expression von Cx57 in Teilen des Gehirns (Zappalà *et al.*, 2010).

1.7. Ziel der Arbeit

In der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Standort Lübeck wurden mittels genomweiter Assoziationsstudien zwei für Connexine codierende Gene mit einer Herz-Kreislaferkrankung assoziiert gefunden. Zum einen war das humane Cx62 Gen (*GJA10*) mit Hypertonie assoziiert, zum anderen wurde eine Assoziation eines SNPs im Intron des für Cx40 codierenden Gens (*GJA5*) mit linksventrikulärer Hypertrophie identifiziert. Dies war der Anlass, um im Rahmen der vorliegenden Arbeit Untersuchungen des Herz-Kreislauf-Systems im genetisch veränderten Mausmodell (Cx57^{lacZ/lacZ}) und Untersuchungen der genomischen *GJA5* Sequenz von Probanden der GWAS und der davon ausgehenden Cx40 Expression durchzuführen.

Die Dissertation ist in zwei Abschnitte gegliedert. Im ersten Teil wurden die Cx57 Expression in der Maus und seine Rolle bei der Regulation des arteriellen Blutdruckes in Cx57-defizienten Mäusen und Wildtyp Kontrolltieren mittels telemetrischer Blutdruckmessung untersucht. Im zweiten Teil erfolgte die Suche nach funktionellen Polymorphismen im codierenden Bereich oder im Promotorbereich von *GJA5* durch die Sequenzierung von Patienten-DNA und die funktionelle Analyse der gefundenen Polymorphismen in Expressionsstudien mit einem Reportergen in der Zellkultur.

2. Material & Methoden

2.1. Material

2.1.1. Substanzen

Substanz	Hersteller
A	
Agarose (StarPure Agarose-Low EEO Standard)	STARLAB GmbH, Hamburg
Ampicillin Natriumsalz (>99%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Aquatex [®] (wässriges Eindeckmittel)	Merck KGaA, Darmstadt
B	
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid (X-Gal)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt / Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
C	
D	
DMEM Medium	GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
E	
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt

Epidermal Growth Factor	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Ethanol (>99,8%, p.a.)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
F	
FCS	GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fentanyl [®] -Janssen 0,5mg	JANSSEN Pharmaceutica N.V., Beerse, Belgien
Formaldehyd (37%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FugeneHD Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
G	
Glycerol (87%)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
H	
HI-DI [™] Formamid	Applied Biosystems, Darmstadt
Histosec [®] Paraffin-Pastillen	Merck KGaA, Darmstadt
HPLC H ₂ O (LiChrosolv [®])	Merck KGaA, Darmstadt
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen
I	
Isofluran Baxter	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
J	
K	
Kaliumacetat (CH ₃ COOK)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt

Kaliumhexacyanoferrat II ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat III ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	Merck KGaA, Darmstadt
L	
Laufpuffer für Sequenzer (10x Buffer + EDTA)	Applied Biosystems, Darmstadt
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
M	
MCDB 131	GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
N	
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Neo-Clear [®] (Xylolersatz)	Merck KGaA, Darmstadt
O	
Oligonukleotide	biomers.net GmbH, Ulm
	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
OptiMEM	GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
P	
1x PBS Puffer (Dulbecco's PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
POP-7 TM Polymer	Applied Biosystems, Darmstadt
Q	
R	

S

SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sephadex™ (illustra™ Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

T

Terminatormix 3.1	Applied Biosystems
TRIS Base	BIOMOL GmbH, Hamburg
TRIS-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
0,4 % Trypan Blau Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypton Pepton	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA

U

V

W

X

X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta- D-galactopyranosid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
--	---

Y

Yeast Extract, Bacto™	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
-----------------------	-----------------------------------

Z

2.1.2. Enzyme

Enzym	Hersteller
RNase A	Qiagen GmbH, Hilden
ExoSAP-IT [®]	GE Healthcare, München
T4 DNA Ligase	Promega GmbH, Mannheim
LigaFast [™] Rapid DNA Ligation System	Promega GmbH, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Trypsin-EDTA (1x)	PAA, Pasching, Österreich

2.1.3. Kommerziell verfügbare Kits

Kit	Hersteller
Taq Core Kit (dNTP-Mix, Puffer, MgCl ₂ , Taq-Polymerase)	MP Biomedicals, Illkirch Cedex, Frankreich
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen GmbH, Hilden
BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Pure Yield [™] Plasmid Midiprep System	Promega GmbH, Mannheim
Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System	Promega GmbH, Mannheim

2.1.4. Oligonukleotidsequenzen (Primer)

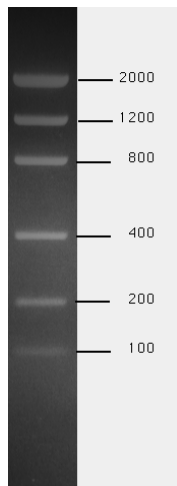
Primer	Sequenz 5'- 3'	Produktgröße
codierende Region von <i>GJA5</i>		
<i>GJA5</i> for1	TCC AGA CCT TCA CAG AAC ATC C	658 bp
<i>GJA5</i> rev1	GGA CTC CTG CGG CAG ACA TGC	
<i>GJA5</i> for2	CAT CCT GAT CCG CAC CAC CAT G	689 bp
<i>GJA5</i> rev2	ATC AGT TCA GAA GGG ACA CGT C	
Exon 1A umgebende Region		
<i>GJA5</i> ex1-f1	TTG GTG TGG GCA TAG TGG AAA TC	683 bp
<i>GJA5</i> ex1-r1	CCT TCC TCT GGC TAC TTC ATA TC	
<i>GJA5</i> ex1-f2	TCC TGC TGA TGC TCC AGG AAA GC	664 bp
<i>GJA5</i> ex1-r2	ACC TCA CTA TCA CAG GAA ATA GC	
für die Klonierung in pGEM [®] -T Easy bzw. pGL4.10		
<i>GJA5-XhoI</i> -for	<u>CTC GAG</u> TTG GTG TGG GCA TAG TGG AAA TC	695 bp
<i>GJA5-HindIII</i> -rev	<u>AAG CTT</u> CCT TCC TCT GGC TAC TTC ATA TC	
Sequenzierung des Inserts pGEM [®] -T Easy		
Sp6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	
T7	AAT ACG ACT CAC TAT AG	
Verkürzung der Exon 1A umgebenden Region		
<i>GJA5-XhoI</i> -for	<u>CTC GAG</u> TTG GTG TGG GCA TAG TGG AAA TC	Nr. 1: 695 bp
<i>GJA5-HindIII</i> -rev	<u>AAG CTT</u> CCT TCC TCT GGC TAC TTC ATA TC	
<i>GJA5-XhoI</i> -for	<u>CTC GAG</u> TTG GTG TGG GCA TAG TGG AAA TC	Nr. 2: 502 bp
<i>GJA5-HindIII</i> -rev2-wt	<u>AAG CTT</u> CGT ATC TGT CGC CTT CCC TCC TC	
<i>GJA5-HindIII</i> -rev2-ko	<u>AAG CTT</u> CGT ATC TGT CGC TTT CCC TCC TC	
<i>GJA5-XhoI</i> -for	<u>CTC GAG</u> TTG GTG TGG GCA TAG TGG AAA TC	Nr. 3: 486 bp
<i>GJA5-HindIII</i> -rev3	<u>AAG CTT</u> CCT CCT CCC ACT TCT TCC TAC TC	

<i>GJA5-XhoI</i> -for4	<u>CTC GAG</u> ATG TGG AGG ACT GCT GTG AGG AC	
<i>GJA5-HindIII</i> -rev2-wt	<u>AAG CTT</u> CGT ATC TGT CGC CTT CCC TCC TC	
<i>GJA5-HindIII</i> -rev2-ko	<u>AAG CTT</u> CGT ATC TGT CGC TTT CCC TCC TC	Nr. 4: 275 bp
<i>GJA5-XhoI</i> -for5	<u>CTC GAG</u> GTG GAG AGA GAA AGA GTA GGA AG	
<i>GJA5-HindIII</i> -rev5	<u>AAG CTT</u> CTG CTT CTT TTC CTC CTC CCT GG	Nr. 5: 193 bp
<i>GJA5-XhoI</i> -for6	<u>CTC GAG</u> GAC AGA TAC GAT TAA AAA GAC GG	
<i>GJA5-HindIII</i> -rev5	<u>AAG CTT</u> CTG CTT CTT TTC CTC CTC CCT GG	Nr. 6: 151 bp

Die Unterstreichung verdeutlicht jeweils die Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym.

2.1.5. Molekulare DNA Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese

Low DNA Mass Ladder

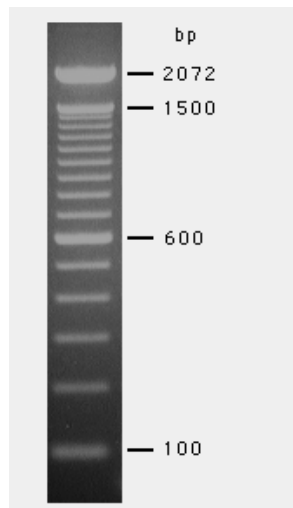


2.0% agarose gel
4 µl per lane

www.invitrogen.com

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

100 bp DNA Ladder

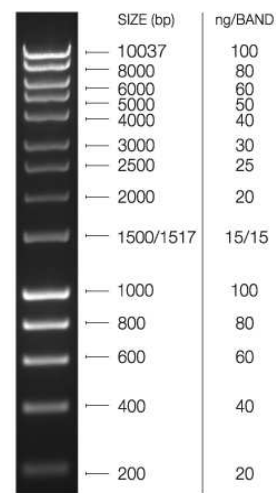


2% agarose gel
0.5 µg/lane

www.invitrogen.com

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

HyperLadder™ I



1% agarose gel
5 µl per lane

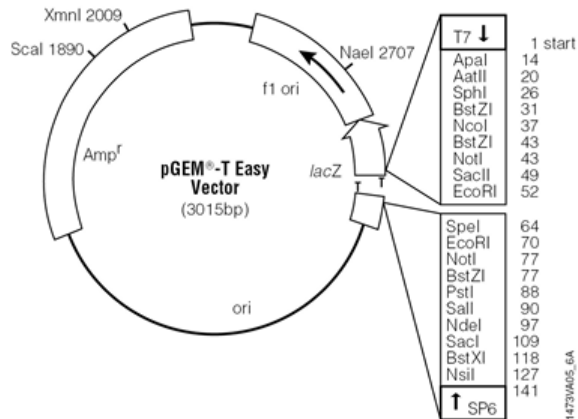
www.bioline.com

Bioline GmbH,
Luckenwalde

2.1.6. Vektoren

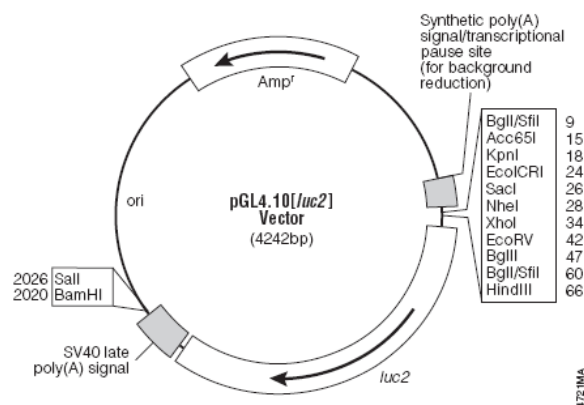
pGEM[®] – T Easy Vektor System

Promega GmbH, Mannheim



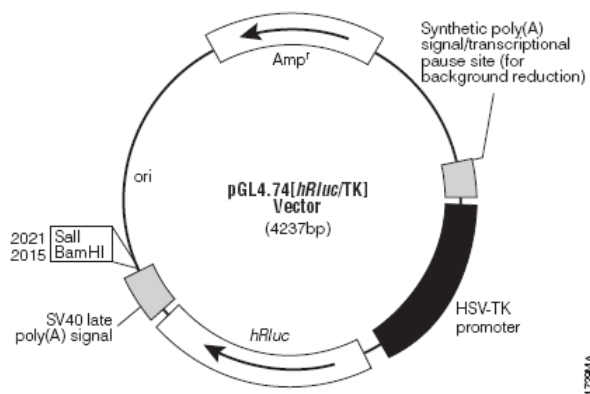
pGL4.10[*luc2*] Vektor

Promega GmbH, Mannheim



pGL4.74[*hRluc*/TK] Vektor

Promega GmbH, Mannheim



www.promega.com

2.1.7. Bakterienstamm

Escherichia coli DH5 α

Genetische Marker: F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG
 Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ -

2.1.8. Zelllinien

HeLa Zellen	ATCC LGC Standards GmbH, Wesel
Humane epitheliale Zervixkarzinomzelllinie	

HMEC-1 Zellen	Centers for Disease Control and
Humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie	Prevention (CDC), Atlanta, GA, USA

2.1.9. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial

Hersteller

4-Well Platten	Nunc A/S, Roskilde, Denmark
1 ml Einwegspritze (Plastipak TM)	BD Becton Dickinson, Madrid, Spain
Einmal-Injektions-Kanülen Sterican [®] Ø 0,40 x 20 mm (Gr.20)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Aspirationskanülen 2,0 x 30 mm Plus 15 my Filter	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Prolene [®] Faden USP 6-0	Ethicon GmbH, Norderstedt
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

15 ml konische Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
50 ml konische Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
24-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
75 cm ² Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Well Platten (PCR) + 8er Deckelketten	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
MultiScreen-HV 96-Well Platten (0.45 µm Hydrophilic, Low Protein Binding Durapore [®] Membrane) für Sephadex TM + Versiegelungsfolien für 96-Well Platten	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, Co. Cork, Irland Sarstedt Inc., Newton, NC, USA
optische 96-Well Platten mit Barcode (MikroAmp [®]) + Septen (Plate Septa 96 Well)	Applied Biosystems, Darmstadt
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
sterile Zahnstocher zum Picken der Transformanten	
sterile Glasreagenzgläser mit Alukappe	schuett-biotec GmbH, Göttingen
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
14 ml sterile Polypropylen Röhrchen mit Zwei-Positionen Belüftungsstopfen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.10. Geräte

Gerät	Hersteller
Wärmeschrank (kelvitron®t)	Heraeus Instruments, Hanau
Mikroskop Axioplan2 imaging Kamera AxioCam color Quecksilberlampe HBO 100	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrotom MIKROM HM440E	MICROM GmbH, Walldorf
Paraffin-Streckbad TFB 45	Medite GmbH, Burgdorf
Kühlplatte Leica EG1130	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
PhysioTel®PA-C10 (Transmitter) RPC-1 Receiver APR-1 (Ambient Pressure Reference) Data Exchange Matrix	Data Sciences International (DSI), Roermond, Netherlands
Thermocycler:MyCycler Biometra TGradient Veriti 96 Well Thermal Cycler Thermal Cycler 2720	BIO-RAD Laboratories GmbH, München Biometra GmbH, Göttingen Applied Biosystems, Darmstadt Applied Biosystems, Darmstadt
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlzentrifuge Microfuge® 22R	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Stand-Kühlzentrifuge Avanti® J-30I Zentrifuge für 96-Well Platten 5804	Beckman Coulter GmbH, Krefeld Eppendorf AG, Hamburg

Brutschrank Heraeus-Typ B5028	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank 2735	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Inkubator/Schüttler innova™ 4300	New Brunswick/Eppendorf AG, Hamburg
Wasserbad GFL® Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
3130 xl Genetic Analyzer (Sequencer)	Applied Biosystems, Darmstadt
Agarose-Gelelektrophoresesystem: HE 99X Submarine Electrophoretic Unit	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Electrophoresis Power Supply LKB GFP200/400	Biostad, Sainte-Julie, Québec, Kanada
UV-Kontaktlampe Chroma 43	Laborgeräte Vetter GmbH, Wiesloch
CCD Black and White Video Camera Module XC-ST70	SONY, Los Angeles, CA, USA
Digital Graphic Printer UP-D895	SONY, Los Angeles, CA, USA
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Cellometer™ Auto T4 von Nexcelom Bioscience	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Schüttler für Zellkulturplatten (EASIA Shaker)	MEDGENIX Diagnostics GmbH, Ratingen
Mithras LB 940 Mikroplattenleser	Berthold Technologies GmbH & Co. KG Bad Wildbad

NanoDrop 1000 Spektralphotometer
von Thermo Scientific

Peqlab Biotechnologie GmbH,
Erlangen

Flockeneisbereiter AF100

FRIMONT S.P.A. - SCOTSMAN ICE
SYSTEMS, Pogliano Milanese,
Mailand, Italien

SG Reinstwassersystem

Hassa Laborbedarf, Lübeck

Autoklav-CS/VFKT

Webeco Hygiene in Medizin und Labor
GmbH & Co. KG, Selmdorf

Magnetrührer MR3002

Heidolph Instruments GmbH & Co.
KG, Schwabach

2.1.11. Software**Software**

Microsoft Word 2002

Hersteller

Microsoft Corporation

Intercooled Stata 8

StataCorp LP, College Station, TX,
USA

Bibus Version 1.1.0 (Freeware)

DSI Dataquest A.R.T.TM Version 4.2Data Sciences International (DSI),
Roermond, Netherlands

SigmaPlot 2001

Systat Software GmbH, Erkrath

SeqScape 2.5

Applied Biosystems, Darmstadt

Sequence Analysis

Applied Biosystems, Darmstadt

MikroWin 4.41

Mikrotek Laborsysteme GmbH,
Overath

2.1.12. Lösungen für die β -Galaktosidasefärbung

2.1.12.1. Fixierungslösung

4% Formaldehyd in 1x PBS

2.1.12.2. Waschpuffer

1x PBS verdünnt aus 5x PBS

1x PBS: 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
 2 mM KH_2PO_4
 137 mM NaCl
 3 mM KCl
 pH 7,3

2.1.12.3. 1x Färbelösung

5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$

5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

20 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

0,1 % SDS (Stock:20%)

0,1% TWEEN[®]20

2.1.12.4. X-Gal-Lösung

Stock: 100 mg/ml DMSO

2.1.12.5. X-Gal-Färbelösung

Die X-Gal-Färbelösung wird vor Gebrauch immer frisch angesetzt.

Zu 49,5 ml der 1x Färbelösung werden 500 μl der X-Gal-Stocklösung gegeben, so dass eine X-Gal Endkonzentration von 1 mg/ml erreicht wird. Diese Lösung ist dunkel gelagert ca. 1 Woche haltbar.

2.1.12.6. Stopplösung

1% (w/v) EDTA

in 50 ml Fixierungslösung (4% Formaldehyd in 1x PBS)

2.1.13. Probenladepuffer für die Agarose-Gelelektrophorese

Glycerol 30%
 Bromphenolblau 0,1%
 in 1x TBE Puffer

2.1.14. TBE-Puffer für die Gelelektrophorese

1x TBE 18,8 g Tris Base (89 mM)
 5,5 g Borsäure (89 mM)
 4 ml 0,5 M EDTA (2 mM)
 ad 1 l A. dest
 pH 7,5 – 7,8

2.1.15. Luria-Bertani (LB) Broth Medium

10 g Yeast Extract
 20 g Trypton Pepton
 20 g NaCl
 ad 1 l A. dest.
 autoklavieren

LB-Medium wurde für die selektive Anzucht von *E. coli* DH5 α mit verschiedenen Konstrukten nach dem Autoklavieren mit 1 ml/l Ampicillin angereichert (Stock: 100 mg/ml, EK 0,1 mg/ml).

Für selektive LB-Platten wurden vor dem Autoklavieren 16 g Agarose je Liter LB-Medium und nach dem Autoklavieren 1 ml Ampicillin (Stock: 100 mg/ml, EK: 0,1 mg/ml) und 1 ml X-Gal (Stock 40 mg/ml in DMSO, EK: 0,04 mg/ml) hinzugeben.

2.1.16. Puffer für Plasmidpräparationen (Mini)

P1: TRIS-HCl 50 mM
 EDTA 10 mM
 RNase 100 µg/ml

P2: NaOH 0,2 M
 SDS 1%

P3: K-Acetat 3 M
 pH 5,5

2.1.17. Mäuse

Herr Prof. Dr. rer. nat. Klaus Willecke generierte am Institut für Genetik der Universität Bonn Connexin57 defiziente Mäuse und stellte sie uns freundlicherweise für unsere Versuche zur Verfügung (Hombach *et al.*, 2004). Anstelle des Cx57 wird in diesen Mäusen die β -Galaktosidase unter dem endogenen Cx57-Promotor exprimiert. Cx57^{lacZ/lacZ}-Mäuse und ihre Wildtypwurfgeschwister wurden für die Blutdruckmessungen und β -Galaktosidasefärbungen verschiedener Organe verwendet. Die Tiere waren zwischen drei und 15 Monaten alt, und waren männlichen und weiblichen Geschlechts. Die Blutdruckmessungen am wachen Tier erfolgten nach Genehmigung des Tierversuchsantrages (V312-72241.122-2) unter Berücksichtigung des deutschen Tierschutzgesetzes.

2.2. Methoden

2.2.1. Entparaffinierung von Schnitten

15 min bei 62°C in den Wärmeschränk

2 x 5 min Neo-Clear® (Xylolersatz)

2 x 2 min 100% EtOH

2 min 96% EtOH

2 min 80% EtOH

2 min 70% EtOH

Eindecken mit Aquatex® (wässriges Eindeckmittel)

2.2.2. Telemetrische Messung des arteriellen Blutdrucks

Der arterielle Blutdruck wurde mittels eines kleinen Druckabnehmers mit radiotelemetrischem Transmitter (DSI PhysioTel®PA-C10) in der *Arteria carotis communis* am Übergang zum Aortenbogen gemessen (Abb. 4). Die Maus wurde mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (Baxter) narkotisiert. Die Einleitung der Narkose erfolgte mit 10% Isofluran in O₂ und die Erhaltung der Narkose mit 1-2% Isofluran in O₂. Die Maus wurde zunächst in Bauchlage gelagert. Nach Erreichen eines tiefen Narkosestadiums erfolgte ein kleiner Hautschnitt links neben der Wirbelsäule. Durch vorsichtige Spreizbewegungen einer in den Hautschnitt eingeführten Schere wurde am Rücken eine subkutane Tasche für den Transmitter geformt. Das Einfüllen von steriler NaCl-Lösung (0,9% w/v) erleichterte das Einführen des Transmitters in die Tasche. Nach Umlagerung der Maus in Rückenlage wurde der Hals durch einen ca. 1,5 cm langen Hautschnitt entlang der Trachea eröffnet. Der Katheter des Transmitters wurde mit Hilfe einer Aspirationskanüle unter der Haut vom Rücken zur Halsöffnung hindurchgeführt. Die Speicheldrüse (*Glandula submandibulares*) wurde auf der linken Seite von der Trachea gelöst und etwas nach außen verlagert. Neben der Trachea, etwas tiefer gelegen, ist die pulsierende *Arteria carotis communis* lokalisiert. Sie wurde proximal der Bifurkation von umliegendem Gewebe befreit. Anschließend wurden drei dünne Baumwollfäden unter ihr hindurchgeführt. Mit dem ersten, cranialen Faden wurde der Blutfluss in der *Arteria*

carotis communis vollständig durch einen Knoten unterbunden und das Gefäß über den Faden fixiert. Der caudale Faden diene zu einem reversiblen Unterbinden des Blutstroms, indem mit einer Arterienklemme die Schlaufe um das Gefäß leicht unter Zugspannung gesetzt wurde und hierbei auch das Gefäß etwas auf Spannung gebracht wurde. Mit einer umgebogenen feinen Injektionskanüle wurde die *Arteria carotis communis* nahe des cranialen Knotens eingestochen. Die umgebogene Kanüle diene ebenfalls zum Aufhalten des Lochs, um den Katheter des Transmitters in das Gefäß einzuführen. Der Katheter wurde dann zunächst mit dem mittleren Faden und einem einfachen Knoten vorsichtig fixiert. Durch das Lösen der caudalen Schlaufe konnte der Katheter in dem Gefäß vorgeschoben werden. Um eine gute Positionierung des Katheters zu erreichen, sollte er ca. 1 cm weit eingeführt werden. Anschließend wurden die Baumwollfäden um den Katheter und das Gefäß verknotet, die Speicheldrüse zurückverlagert und die Schnitte an Hals und Rücken mit einem Prolene[®] USP 6-0 Faden vernäht. Zur Schmerzlinderung, wurde Fentanyl (0,05 mg/kg KG) intraperitoneal verabreicht. Nach der Wundversorgung wurde die Inhalationsnarkose beendet. Die Maus erlangte bereits nach wenigen Minuten wieder das Bewusstsein.

Der Blutdruck der Mäuse wurde drei- bis viermal täglich über 13 Tage für jeweils fünf Minuten gemessen. Die pulsierenden Druckschwankungen werden vom Gel innerhalb des Katheters auf den Druckwandler übertragen und die Werte radiotelemetrisch an eine Empfängerplattform (RPC-1) übertragen, auf der der Mausekäfig steht. Die dazugehörige Software ermittelt neben dem systolischen, mittleren und diastolischen Blutdruck auch die Herzfrequenz der Tiere.

Am Ende der Messungen wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Gabe von Pentobarbital (Narcoren[®], 0,8 g/kg KG) getötet.

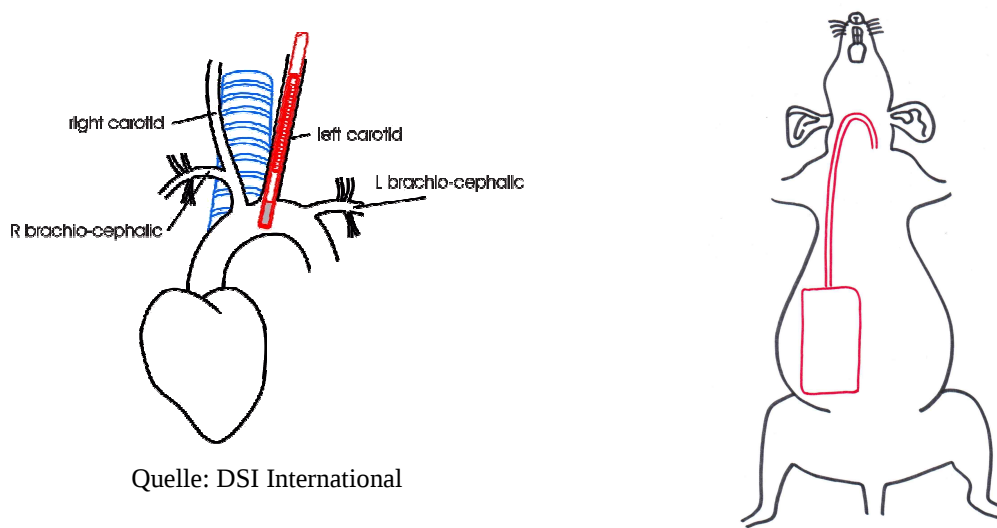


Abbildung 4: Lage des Katheters in der *Arteria carotis communis* (li) und des Druckabnehmers (re) in der Maus.

2.2.3. β -Galaktosidasefärbung

Nach erfolgter Blutdruckmessung über 13 Tage wurden die Mäuse durch die intraperitoneale Gabe von Narcoren[®] (0,8 g/kg KG) getötet. Da in diesen Mäusen die β -Galaktosidase anstelle des Cx57 unter dem endogenen Cx57-Promotor exprimiert wird (Cx57^{lacZ/lacZ}-Mäuse), konnte mittels β -Galaktosidasefärbungen verschiedener Organe auf die Expression von Cx57 geschlossen werden. Es erfolgte die Entnahme von Herz, Lunge, Niere, Milz, Leber, Aorta, Cremastermuskel, Augen, Oesophagus und Lymphknoten unterschiedlicher Lokalisation (mesenterial, inguinal, cervical, popliteal, axillär). Die Organe wurden von Fett befreit und in 1x PBS gespült, um sie von Blut zu säubern. Die Cremastermuskel sowie die Aorta und der Oesophagus wurden mit Hilfe von Insektennadeln in einer mit einem Silikonelastomer ausgegossenen 4-Well Platte ausgebreitet und fixiert, während die Organe in einzelne Wells gelegt wurden. Die Gewebe wurden in 4% FA in 1x PBS über einen Zeitraum von 30 min bis zwei h je nach Dicke des Gewebes fixiert. Nach der Fixierung wurden die Organe 3 x 5 min in 1x PBS gewaschen. Die Augen wurden nach dem Waschen mit einer feinen Gefäßschere an der Hornhaut entlang vorsichtig kreisförmig eingeschnitten. Danach konnte die Linse und der Glaskörper entfernt werden. Anschließend wurde die Retina vorsichtig von der Aderhaut und

Lederhaut getrennt. Die Netzhäute wurden ebenfalls mit Nadeln in einem mit Silikonelastomer ausgegossenen Well ausgebreitet. Die Organe wurden für 30 min dunkel bei RT in einer X-Gal-Färbelösung (X-Gal EK: 1 mg/ml) inkubiert, danach erfolgte die Inkubation ÜN und dunkel bei 4°C (18-24 h). X-Gal ist das Substrat der β -Galaktosidase, sodass in den Zellen, in denen dieses Enzym exprimiert wird, X-Gal zunächst gespalten wird. Das Spaltprodukt oxidiert anschließend an der Luft und dimerisiert zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo (Abb. 5). Die Farbreaktion wurde am nächsten Tag mit 1% EDTA und 4% FA in 1x PBS gestoppt. Dünne Gewebe (Oesophagus, Aorta, Cremastermuskel, Retina) wurden sofort mit einem wässrigen Eindeckmittel (Aquatex[®]) eingedeckt, und konnten nach dem Trocknen mikroskopiert werden. Ganze Organe wurden in Paraffin eingebettet, um am Mikrotom Schnitte zwischen 2 und 10 μ m Dicke anzufertigen. Die Schnitte wurden anschließend durch eine Alkoholreihe entparaffiniert, eingedeckt und mikroskopiert.

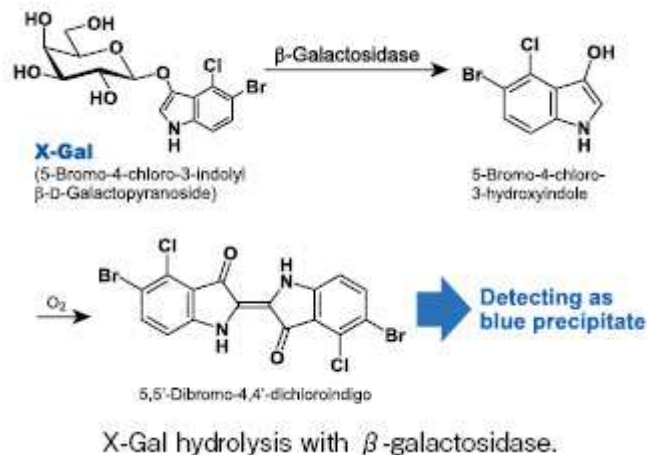


Abbildung 5: Hydrolyse von X-Gal durch die β -Galaktosidase. Durch Oxidation und Dimerisierung entsteht der blaue Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo (www.tcichemicals.com).

2.2.4. PCR an genomischer DNA

Mittels der Polymerasekettenreaktion wurden an isolierter DNA von Patienten spezifische Sequenzen des Cx40 codierenden Gens *GJA5* amplifiziert. Die codierende Region und die Exon 1 umgebende Region von *GJA5* wurden jeweils in zwei Teilen amplifiziert (siehe nachfolgende Sequenz). Für die gewünschten DNA Abschnitte wurden sequenzspezifische Primer eingesetzt (siehe S. 20 und S. 21). Die Polymerasekettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung von DNA Abschnitten durch ein thermostabiles Enzym, der sog. *Taq*-Polymerase. Die *Taq*-Polymerase ist eine DNA-Polymerase aus dem gram-negativen Bakterium *Thermus aquaticus*. Ihre maximale Enzymaktivität liegt bei 72°C. Die Synthese eines DNA Stranges entlang einer Matrize ist abhängig von einer freien Hydroxylgruppe am 3'-Ende der DNA. Daher ist ein spezifisches Oligonukleotid (Primer) notwendig, das sich durch Komplementarität an die einzelsträngige DNA (ssDNA) nach der Denaturierung anlagert und so einen kurzen doppelsträngigen DNA (dsDNA) Abschnitt mit freier 3'-OH-Gruppe für die *Taq*-Polymerase zur Verfügung stellt. Das Enzym benötigt Mg^{2+} als Cofaktor für die Synthese der dsDNA aus Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) unter der Abspaltung zweier Phosphatgruppen. Die Syntheserate liegt je nach Bedingungen zwischen ca. 35 und 150 Nukleotiden in der Sekunde. Die *Taq*-Polymerase besitzt zudem 5'-3' Exonukleaseaktivität, die es ermöglicht dsDNA, die die Synthese entlang der Matrize stören könnte, zu spalten. Sie verfügt hingegen über keine 3'-5' Exonukleaseaktivität und ist daher nicht in der Lage falsch eingebaute Basen zu erkennen und zu entfernen (proof-reading Funktion).

Sequenz des Transkripts *GJA5-201* der Ensembl Datenbank mit Exon 1A und Exon 2:

grün: 5' stromaufwärts von *GJA5* gelegene Sequenz
lila: untranslatierter Bereich (UTR)
blau: Intron
schwarz: codierender Bereich mit nummerierten Basen

```

.....gcttagttcattgggtgtggg for1
catagtggaaatcccaaaaaaggcttggtatgtgagtgaacaccctctttttctgatga
tgggaaaaggatgggaagaggatctcttgggcagtccaattttcctgctgatgctcca for2
ggaaagccatggcctgggaagtctgagggcagcagcagaggggtgggcaggaagagact
tagggaggtggtgcaccagcggccgggggagaggcaatgtggaggactgctgtgaggac
aaggacaacaggcagacagacagggggagggtgcagggaggagggggctctgcctcctt
gggggccagggaaggggagcacagtgcagctgaggctacgaggaggtggaggaagaagac
tttagagcaaagactctaagagcacaagagagagaggggaggaggaggttcagaggg
gaaaaggggtggagagagaaaagtaggaagaagtgggaggagggaaggcgacagatacg

ATTA AAAAGACGGTGG AAGAGGAACA ACTGACAGGCTCAAGAGCAAAAAGCGTGGGCAGT
TGGAGAAGAAGCAGCCAGAGTGTGAAGAAGCCACGGAAGGAAAGTCCAGGGAGGAGGAA
AGAAGCAG

Gtaagagtagacttgaatttgaacagctaaaactacaagtggatatgaagtagccagagg rev1
aagggagcttggattctaggtggataaaaacaagctctttctttctacctgtgagttt
attccttaccctcccgcatttccctgtgatagtgaggtatggatatattaaaaaggaag rev2
gtttagcgaagcagcagata.....acttgaatcttctcttctt
ttttatttttgcctgggaaggagagcgaacttttctgtgtgtgctttgacttctaagttg
cattttcttaagaaccattggatggatcagtggaatcccagaacatgatagaca
tccagaccttcacagaacatcccttcttcttttctctcttctcttcccatttgcag for1

1 AAGTTTTGGCATCTGTTCCCTGGCTGTGCCAAGATGGGCGATTGGAGCTTCCTGGGAAAT
28 TTCCTGGAGGAAGTACACAAGCACTCGACCGTGGTAGGCAAGGTCTGGCTCACTGTCCTC
88 TTCATATTCCGTATGCTCGTGCTGGGCACAGCTGCTGAGTCTTCCTGGGGGGATGAGCAG
148 GCTGATTTCCGGTGTGATACGATTACAGCCTGGCTGCCAGAATGTCTGCTACGACCAGGCT
208 TTCCCATCTCCACATTTCGCTACTGGGTGCTGCAGATCATCTTCGTCTCCACGCCCTCT
268 CTGGTGATACATGGGCCACGCCATGCACACTGTGCGCATGCAGGAGAAGCGCAAGCTACGG
328 GAGGCCGAGAGGGCCAAAGAGGTCCGGGGCTCTGGCTCTTACGAGTACCCGGTGGCAGAG
388 AAGGCAGAACTGTCTGTGCTGGGAGGAAGGGAATGGAAGGATTGCCCTCCAGGGCACTCTG
448 CTCAACACCTATGTGTGCAGCATCCTGATCCGCACCACCATGGAGGTGGGCTTCATTGTG for2
508 GGCCAGTACTTCATCTACGGAATCTTCCTGACCACCTGCACTGCTGCCGAGGAGTCCC rev1
568 TGTCCCCACCCGGTCAACTGTTACGTATCCCGGCCACAGAGAAGAATGTCTTCATTGTC
628 TTTATGCTGGCTGTGGCTGCACTGTCCCTCCTTAGCCTGGCTGAACCTACACCTAG
688 GGCTGGAAGAAGATCAGACAGCGATTTGTCAAACCGCGGCAGCACATGGCTAAGTGCCAG
748 CTTTCTGGCCCCCTCTGTGGGCATAGTCCAGAGCTGCACACCACCCCGACTTTAATCAG
808 TGCCTGGAGAATGGCCCTGGGGGAAAATTCTTCAATCCCTTCAGCAATAATATGGCCTCC
868 CAACAAAACACAGACAACCTGGTCACCGAGCAAGTACGAGGTCAGGAGCAGACTCCTGGG
928 GAAGGTTTCATCCAGGTTTCGTTATGGCCAGAAGCCTGAGGTGCCCAATGGAGTCTACCA
988 GGTCACCGCCTTCCCATGGCTATCATAGTGACAAGCGACGTCTTAGTAAGGCCAGCAGC
1048 AAGGCAAGGTCAGATGACCTATCAGTGTGACCTCCTTTATGGGAGGATCAGGACCAGGT
GGGAACAAAGGAGGCTCAGAGAAGAAAAGACGTGTCCCTTCTGAAGTATGCTTTCTCACT rev2
GTCATCACTGCTTGGCTCCTTTGAGCCCCGGGTCTCAATGACGTTGCTCATTAAATTCTAG
AAACTATAACCAGGGCTCTGGGATAGTAAGAGAGGTGACAACCCACCCAGACTGCAGTTC
CCTCCCCACCTCTACCCAGTATACGAAGCCTTTCAGATTACTCATGAAACAGGGTAGAG
GGAAAGAAGGGAAGCATGGCAAAAGCTGGCCTGGAAGGGATAGCCAGAGGGATAGAATGA
CTCTCTCTACATACCAGCAGCATACCAATGCGTTCTCTAAGTTCTTACCTCCTTGAC
CTGATCACCTCCCTCCTCCAAGGAAGAGCTCAAAGTTCCAGCCAATAGACAGCATGAA
TCAAGGAACCTGCATTATATGTGCTCTTGAATCTGTTGTCTCCATGGACCATTCTCGGA

```

GTAGTGGTGAGATGGCCTTGGGTTGCCCTTGGCTTCTCCTCCCTCTACTCAGCCTTAAAA
 AGGGCTTCTTGGAACCTTACCAGCAGCCTCAGCTTTACAAATGCCTTGGTATGTACCTCT
 GGCAAATGCCCCACCTTGGTGATGTTGCAACCTTTCCTTCTGCTAGGGTGTACACCTAGC
 CTGTGCAGGTGTCAGCCCTGCTAGGGAGTCACTGTACACACAACTCTACTGGAATTCCT
 GCCAACATCTGTCACCCCTGCAGCTCCTTTACAGTTCAATCCAATGATAGAAACCATCCCT
 TCCCTTTCTCCCTTGGCTGTTCACCCAGCCATTCCCTGAAGGCCTTACCAACAGGAATAT
 CCAAGAAGCTGTTGTCCCTCTCGAACCTGACCAGATCATCAGCCACTGAGGCCAGTGG
 AATTTCCCAGGCCTTGTTAAAAACAAAGAAAGCATTGTACCTCTCAGATTCCTTGTGG
 AAAAAAAAAATTCTGCTGTGAAGATGAAAAATAAAATGGAGAGAAAACACTGGAAAATCTAT
 TTTCCCTCCTATTTACTTCCTTTGCTGACTGCCAAGTGTAGTCCAAGAGGAGGTGTGAT
 GACAGCTATGGAGGCCCCAGATCTCTCTCCTGGAGGCTTTAGCAGGGCAAGGAAAT
 AGTAGGGGAATCTCCAGCTCTCTTGGCAGGGCCTTTATTTAAAGAGCGCAGAGATTCCTA
 TGTCTCCCTAGTGCCCCCTAATGAGACTGCCAAGTGGGGGCTGTAGAAAAGCCTTGCCTTC
 CCCAGGGATTGGCCTGGTCTCTGTATTCACTGGATCCATAATGGGTTGCTGTTGTTTTGG
 ATGAAGGTAAACGATGCTTGGAATTGGAACTGAGACTTATAGAGGGATTATTACATTAT
 TAAATGCACGTGTGTGTGTGTGGGTGCTGATGGGATGGGTAAAGGCTTGGGGAGTCC
 TGAAATAAGGAAAGGAAACCACAGAGAACTTGTGTCTTCTGCTCTCCTCTCCGGCTGC
 CTGGCAGTTATTAACCTAAACAGATAGCCACAAGAGGTTGGGACAGAGGAGGGTAAAGGC
 TCAGAAGGAGGTTCAACCTCTGACTCACCTGCCATCTCTGGGCCCTCTGCTGACACTTG
 GATGCTATTGTTGGGTGGAAAGATAAATGAGAGTGGAGAGGTGGAGGAAAGTGAAGTGA
 TGCCATTTAGGAAGGAATGTCTGATCATCCCGGTCCCTGGAGGGGACACCTTTTAAATCT
 ATTGCCTAGCATTAAATTTTCTCTCCTTCTATCTCTGAAATGTTTTATGAAATGAGTGT
 TCTTGAATTAGAAATTCTGTGGGATCAATCTTTGATGGTGAGGGTTTTAGAAAGGAAAAA
 TATAGTAAATGTGTAATTTGTCTTAATAAAATCTATCTCTACATCTA

tctctcttttgttgtccacttcatactgtgactacaagagaaggatggcagacttggtgg
 ggaggggagcgcttggactatacccatcagtaagccagtaatgcaaagagctttgaagtc
 aggcattgcaatggttaaaattccagttgttaacttacatctggactccagcaagacaatc
 tctgagccttggtttcttcatctgtaaactgggccccattaatatctacctcatggggct
 gtaactgagctgttaagtacatcattagggctgttaactgagttgactgtaaagagttta
 gcagagtgccttgggaaataacagtcattacatggtaattgttgttattatctgattattt
 ttgttattgttttgaatacacagttattgaaaatgggatgttgaggatgattccagaac
 ttccctttatcaagcccacaatctgcctaattgtgatcagagtaactcacattattctatt
 ctaacaattagaacagaatt.....

einfacher Reaktionsansatz:	Menge:	Endkonzentration:
DNA	ca. 50 ng	
10x Puffer mit MgCl ₂	2,5 µl	1x Puffer 1,5 mM MgCl ₂
dNTP Mix (je 10 mM)	0,5 µl	0,2 mM je dNTP
Primer forward (10 µM)	1,0 µl	0,4 µM
Primer reverse (10 µM)	1,0 µl	0,4 µM
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	1 U
HPLC H ₂ O	ad 25 µl	

PCR-Protokoll:

1. initiale Denaturierung	95°C	5 min		
2. Denaturierung	95°C	45 s		30/35 Zyklen
3. Annealing	63/57/65°C	45 s		
4. Elongation	72°C	45 s		
5. finaler Syntheseschritt	72°C	5 min		
6. Abkühlen / Pause	4°C			

PCR Produkte wurden anschließend mit HPLC H₂O auf eine Endkonzentration von ca. 20 ng DNA/μl verdünnt (für ExoSAP Ansatz).

2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Überprüfung von PCR Produkten, Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten hinsichtlich ihrer Größe und Menge erfolgte durch eine horizontale elektrophoretische Auftrennung in einem 1%-igen Agarosegel. Hierzu wurde die Agarose durch Aufkochen in der Mikrowelle in 1-fachem TAE-Puffer oder TBE-Puffer gelöst und anschließend mit 2,5 μl/100 ml Ethidiumbromid (EtBr Stock 10 mg/ml) versetzt. Mit Hilfe eines Gelschlittens und eines Kammes wurde ein Agarosegel gegossen. Das Gel wurde in eine mit 1-fachem TAE-Puffer oder TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Den DNA-Proben wurden jeweils 2-5 μl Probenpuffer aus Bromphenolblau zur Sichtbarmachung des Laufs und Glycerol zum Beschweren der DNA beigefügt, bevor sie in die Geltaschen pipettiert wurden. Bromphenolblau wandert in 1%igen Agarosegelen linear mit 300 bp großen dsDNA Molekülen. Für eine Größenbestimmung der aufgetrennten DNA wurde ein Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte ca. 30 - 60 min bei einer konstanten Spannung von 120 Volt. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen wandert die DNA zur Anode. Durch die Zugabe von EtBr zum Gel konnte die DNA unter ultraviolettem Licht (UV-Licht) anschließend sichtbar gemacht und fotografiert werden. EtBr interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA und dadurch nimmt die Fluoreszenz bei Anregung durch UV-Licht zu. Bilder der gelelektrophoretischen Auftrennung der verschiedenen PCR-Produkte befinden sich im Anhang ab Seite 100.

2.2.6. Aufreinigung der PCR Produkte mittels ExoSAP-IT®

Verbleibende Primer und dNTPs in PCR Produkten können für darauf folgende Anwendungen wie die Sequenzierung einen Störfaktor darstellen. Daher werden diese mit Hilfe von ExoSAP-IT® hydrolysiert. ExoSAP-IT® enthält die Exonuclease I und die Shrimp alkalische Phosphatase. Die Exonuclease I baut einzelsträngige DNA und die Shrimp alkalische Phosphatase verbleibende dNTPs zu Nucleosiden und anorganischem Phosphat ab. Für die Aufreinigung von 5 µl verdünntem PCR Produkt wurden jeweils 2 µl ExoSAP-IT® verwendet. Es folgte eine Inkubation von 15 min bei 37°C im Thermocycler, gefolgt von einer Enzyminaktivierung für 15 min bei 80°C. Die aufgereinigten PCR Produkte wurden nun direkt in die jeweilige Sequenz-PCR eingesetzt.

2.2.7. Sequenzierung

Die Sequenzierung beruht auf der Didesoxy- oder auch Kettenabbruchmethode nach Sanger. Zugrunde liegender Mechanismus ist die Polymerasekettenreaktion. Bei der Sequenz-PCR wird die DNA ebenfalls ausgehend von einer spezifischen Primersequenz amplifiziert, wobei allerdings nur ein einzelner Primer eingesetzt wird und damit nur ein DNA-Strang exponentiell vervielfältigt wird. Neben den herkömmlichen dNTPs werden bei dieser Methode auch Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) verwendet. Die ddNTPs sind je nach Base unterschiedlich fluoreszenzmarkiert. Sobald es zum Einbau eines ddNTPs kommt, findet ein Abbruch der weiteren Synthese statt, da der DNA Polymerase keine freie 3'-OH-Gruppe zur Verfügung steht. Theoretisch kommt es an jeder Basenposition einmal zum Einbau eines ddNTPs und damit zum Kettenabbruch. So entstehen viele unterschiedlich große einzelsträngige DNA Fragmente. Diese Fragmente werden anschließend mittels Sephadex aufgereinigt, mit Hi-Di™ Formamid versetzt, und in einem 16-Kapillar-Sequenzierer in einem Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt. Anhand der dann durch einen Laser bestimmten Abfolge der Fluoreszenzsignale der Fragmentenden, kann am Ende auf die Basenabfolge in der DNA-Sequenz geschlossen werden.

2.2.7.1. Sequenz-PCR

einfacher Reaktionsansatz:	Menge:	Endkonzentration:
DNA (aus ExoSAP®-IT Ansatz)	ca. 20 ng	
5x Sequenz Puffer	1,5 µl	0,75x Puffer
Primer (10 µM)	0,5 µl	0,5 µM
Big Dye Terminator v3.1	1,0 µl	
Ready Reaction Mix		
HPLC H ₂ O	ad 10 µl	

PCR-Protokoll:

1. initiale Denaturierung	96°C	2 min		
2. Denaturierung	96°C	15 s		25 Zyklen
3. Annealing	63/57/48°C	5 s		
4. Elongation	60°C	1 min		
5. Abkühlen / Pause	4°C			

2.2.7.2. Aufreinigung der Sequenz-PCR Produkte mit Sephadex & Sequenzierung

Sephadex ist ein Dextran, welches nach Quellung eine Säule zur Gelfiltrations-Chromatographie darstellt. Die Vorbereitung der Sephadex-Platte erfolgte nach Herstellerangaben. Die PCR Produkte wurden mit jeweils 10 ml HPLC H₂O verdünnt, bevor sie auf die Sephadex Säulen pipettiert wurden. Zu 10 µl des aufgereinigten Sequenz-PCR Produkts wurden anschließend 10 µl Hi-Di™ Formamid gegeben, bevor die elektrophoretische Auftrennung und Fluoreszenzdetektion im 16-Kapillar Sequenzer gestartet wurde. Die Zugabe von Formamid dient der Stabilisierung der ssDNA und der Vermeidung von Sekundärstrukturbildung. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte über 24 s. Eine erste Überprüfung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe des Programms Sequencing Analysis. Die genaue Auswertung in Bezug auf Veränderungen der Basenabfolge den sog. SNPs (single nucleotide polymorphisms) erfolgte mit Hilfe des Programms SeqScape.

2.2.8. Einbringen einer DNA-Sequenz in einen Vektor – Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte durch den Einsatz der T4 DNA Ligase und dem entsprechenden Puffer der Firma Promega. Das Ansatzvolumen variierte zwischen 10 und 25 µl. Es wurde für einen Ansatz stets 1 µl unverdünnte T4 DNA Ligase verwendet. Das isolierte DNA-Fragment wurde im Verhältnis von 3:1 zum linearisierten Vektor eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 17°C über Nacht bzw. 1 h bei RT, wenn die FastLigase von Promega verwendet wurde.

2.2.9. Transformation eines Vektors in *E. coli* DH5α

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen *E. coli* DH5α zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Zu 50 µl kompetenten Zellen wurden 3/5 µl des Ligationsansatzes in vorgekühlte 14 ml Röhrchen mit Zwei-Positionen Belüftungsstopfen gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Um die Fluidität der Membran so zu beeinflussen, dass die DNA aufgenommen wird, erfolgte eine Inkubation für 2 min bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen kurz auf Eis abgekühlt, bevor sie mit 450 µl flüssigem LB-Medium versetzt wurden. Zur Regeneration der Zellen wurden sie für 45 min bei 37°C und 250 Upm im Brutschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf entsprechendes Selektivmedium (LB Amp X-Gal) ausplattiert (1 x 150 µl, 1 x 350 µl) und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.10. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5α nach der Methode der alkalischen Lyse (Mini)

Die Plasmidisolation erfolgte aus Flüssigkulturen. Für die Flüssigkulturen (3 ml LB + 3 µl Amp) wurden am Abend zuvor Einzelkolonien der Transformation von den selektiven Agarplatten mit einem sterilen Zahnstocher gepickt. Der Zahnstocher mit der Einzelkolonie wurde in das sterile Röhrchen überführt und verblieb dort. Nach ÜN Kultur bei 37°C im Brutschüttler (250 Upm) wurden 1,5 ml der Kulturen in sterile Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 5000 Upm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Das Pellet wurde in 300 µl kaltem Lysis-Puffer (P1) durch Vortexen resuspendiert. Danach wurden 300 µl NaOH/SDS-Lösung (P2) zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Es folgte eine Inkubationszeit von 3 min bei RT zur vollständigen Lyse der Bakterien. Zu den lysierten Zellen wurden nun 300 µl einer eiskalten Kalium-Acetat-Lösung (P3) gegeben. Es wurde erneut gut gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Das Protein fällt durch die Zugabe der Salzlösung aus, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 10000 Upm. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl eiskaltem 100%-igen EtOH durch Schwenken vermischt. Es schloss sich ein erneuter Zentrifugationsschritt von 20 min bei 4 °C und 13000 Upm an. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 300 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei RT und 13000 Upm wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet getrocknet. Das Pellet wurde nach der Trocknung in 15 µl sterilem A. dest. aufgenommen. Eine Analyse der isolierten Plasmide erfolgte anschließend nach einem Restriktionsverdau mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.11. Isolierung von reiner Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5 α für die Transfektion (Midi)

Zur Transfektion von Zellen wird besonders reine Plasmid-DNA benötigt. Diese wurde mit Hilfe des PureYield™ Plasmid Midiprep Systems der Firma Promega aus 100 ml transformierter *E. coli* DH5 α ÜN-Flüssigkultur nach Herstellerangaben isoliert. Zur Transformation wurden jeweils 0,5 μ l isolierte Plasmid-DNA und 50 μ l kompetente Zellen *E. coli* DH5 α eingesetzt, die anschließend in 450 μ l flüssigem LB-Medium aufgenommen wurden. Der Transformationsansatz wurde nach einer Inkubationszeit von 45 min bei 37°C und 250 Upm im Brutschüttler in 100 ml LB Amp für die ÜN-Kultur überführt. Mit Hilfe des Nanodrops wurde anschließend die Konzentration der Plasmide bestimmt.

2.2.12. Restriktionsverdau

Der Verdau von DNA mit spezifisch schneidenden Restriktionsendonukleasen erfolgte in Ansätzen von 15-50 μ l unter dem Einsatz von 10-40 Units (NEB) bzw. 0,5 – 2 FDU (Fermentas Fast Digest) des Enzyms und dem entsprechenden Puffer. Wenn es für das Enzym nötig war, wurde dem Ansatz BSA zugesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Durch eine Hitzebehandlung von 20 min bei 65 °C wurde das Enzym inaktiviert. Die gespaltene DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Bilder der gelelektrophoretischen Auftrennung der verschiedenen Spaltprodukte nach Restriktionsverdau befinden sich im Anhang ab Seite 100.

2.2.13. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach dem Verdau der DNA mit spezifischen Restriktionsendonukleasen und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung wurde das gewünschte Fragment zunächst unter kurzer Beleuchtung mit UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung des DNA-Fragments aus der Agarose erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben.

2.2.14. Transfektion von HeLa und HMEC-1 Zellen & Reporter-gen-Assay

Zur Analyse der Expressionsaktivität der Cx40-Sequenzen durch die Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden die konstruierten Plasmide mit dem Transfektionsreagenz FuGENE® HD in die humane Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms (HeLa) und in humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) eingebracht. Die Zelllinien wurden für die Transfektion in 24-Well Platten mit 30.000 (HeLa) bzw. 40.000 (HMEC-1) Zellen pro Well ausgesät und für 24 h kultiviert. Die Kultivierung von HeLa Zellen erfolgte in DMEM mit 10% FCS und 1% Pen/Strep, die von HMEC-1 Zellen in MCDB 131 Medium mit 10% FCS, 1% Pen/Strep, 10 mM/l L-Glutamin, 10 ng/ml epidermalem Wachstumsfaktor und 1 µg/ml Hydrocortison bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO₂. Die Zellzahl in den Kulturen wurde mit dem Nexcelom Bioscience Cellometer™ bestimmt. Hierzu wurden 20 µl 0,2%ige Trypan-Blue-Lösung mit 40 µl Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. Die Zellen wurden am darauf folgenden Tag mit 600 ng Plasmid-DNA je Well transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde das Renilla-TK-Plasmid kotransfiziert (25 ng/Well). Zunächst erfolgte der Austausch des Mediums gegen jeweils 400 µl Medium ohne Antibiotika. Dann wurden 100 µl/Well eines vorbereiteten Transfektionsmixes langsam zu den Zellen getropft.

Der Transfektionsmix setzte sich aus dem zu transfizierenden konstruierten Plasmid (600 ng/Well), dem Renilla-TK-Plasmid (25 ng/well), einem Transfektionsmedium (OptimMEM 100 µl/Well) und dem Transfektionsreagenz (FuGENE® HD 1 µl/Well für HeLa und 1,5 µl/Well für HMEC-1 Zellen) zusammen. Der Mix wurde anschließend für 20 min bei RT inkubiert, um die Bildung von Liposomen zu ermöglichen, die endozytotisch aufgenommen werden, so dass transient veränderte Zellen vorlagen. Die 24-Well Platten wurden erneut für 24 h im CO₂-Brutschrank inkubiert. Am dritten Tag erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems von Promega. Bei vorhandener Promotoraktivität erfolgte ausgehend von der in pGL4.10 eingebrachten Cx40-Sequenz die Expression des Firefly-Luciferase-Gens (*luc2*). Ausgehend vom *hRLuc*-Gen des Vektors pGL4.74 unter der Kontrolle eines HSV-TK-Promotors wird die Renilla-Luciferase exprimiert. Das Dual-Luciferase Reporter Assay Kit enthält einen Lysispuffer, eine Substratlösung für die Firefly-Luciferase, sowie eine Lösung, welche die Firefly-Luciferaseaktivität stoppt und zusätzlich die Substratlösung für die Renilla-Luciferase enthält, so dass die Messung der Biolumineszenz durch aufeinander

folgende Zugabe der Lösungen nacheinander erfolgen kann (Abb. 6). Nachdem das Medium entfernt wurde und die Zellen zweimalig mit jeweils 500 µl 1x PBS gewaschen wurden, erfolgte eine 20 minütige Inkubation der Zellen mit 100 µl Lysispuffer. Die Biolumineszenz von 20 µl des Lysats wurden im Berthold Mithras LB 940 Mikroplattenleser gemessen. Zunächst erfolgte die automatisierte Zugabe von 50 µl der Firefly-Substratlösung. Nach einer Inkubationszeit von 2 s wurde die Lumineszenz für die Dauer von 10 s gemessen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl der Stop&Glow-Lösung, die zum einen die Firefly-Luciferase Reaktion stoppte und zum anderen das Substrat für die Renilla Luciferase bereitstellte. Nach erneuter Inkubationszeit von 2 s wurde die Renilla-Aktivität anhand der Lumineszenz für 10 s gemessen. Die Firefly-Luciferase Aktivitäten wurden anschließend auf die Renilla-Luciferase Aktivitäten normalisiert, um Unterschiede der Transfektionseffizienz in den verschiedenen Experimenten zu berücksichtigen.

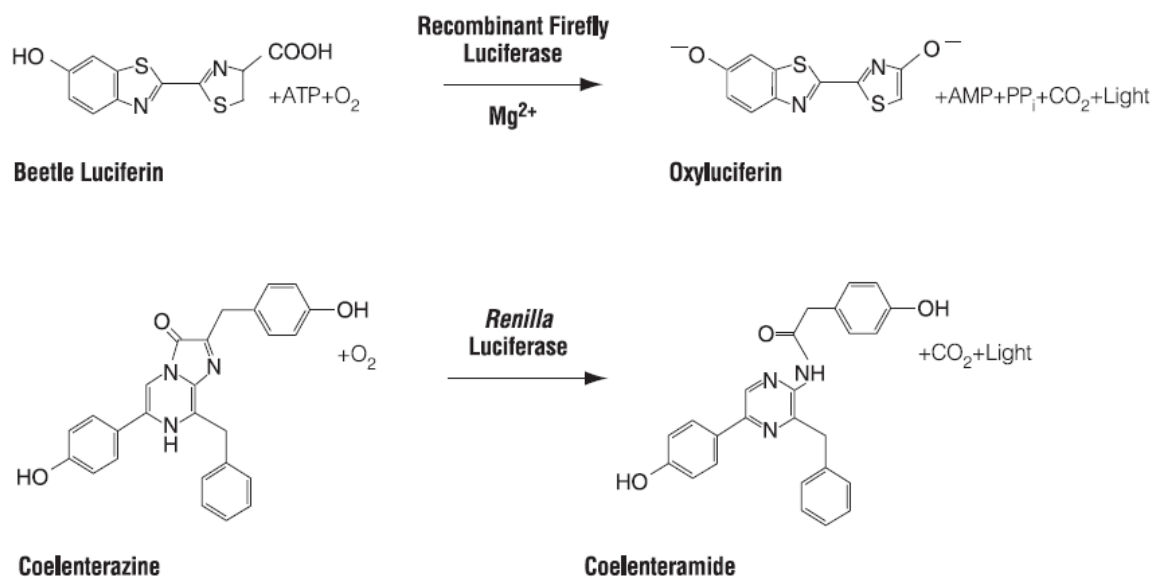


Abbildung 6: Biolumineszente Reaktionen katalysiert von der Firefly (oben) und Renilla Luciferase (aus: Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System Technical Manual, Promega)

2.2.15. Statistik

Die statistische Auswertung der durchgeführten Untersuchungen erfolgte mit Hilfe der Software Intercooled Stata 8. Angegeben sind jeweils der Mittelwert plus/minus Standardfehler. Als statistisch signifikant galt ein Ergebnis bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5%.

Bei der Auswertung der Herzfrequenz, des systolischen, mittleren und diastolischen arteriellen Druckes wurden die Daten mittels ANOVA und anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen auf signifikante Unterschiede geprüft.

Die Verteilung der Genotypfrequenzen bezüglich der SNPs in der Promotorregion von *GJA5* wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat Tests auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht geprüft. Die Assoziation der SNPs mit Hypertonie und LVH wurde mit Hilfe des Cochran Armitage Trend Tests in der Annahme eines additiven Modells (hetero- und homozygot veränderte Variante erhöhen das Erkrankungsrisiko; Allel beeinflusst dosisabhängig die Erkrankung) und des Fisher's Exact Tests in der Annahme eines rezessiven Modells (nur die homozygot veränderte Variante trägt zum Erkrankungsrisiko bei) bestimmt.

Promotoraktivitäten in Reportergen-Assays in HeLa und HMEC-1 Zellen wurden mit Hilfe des ungepaarten t-Tests oder einer ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur für multiples Testen auf signifikante Unterschiede geprüft.

3. Ergebnisse

3.1. Bedeutung von Cx57 für die Blutdruckregulation

Diesen Untersuchungen lag die Assoziation eines single nucleotide polymorphisms (SNPs) im Gen *GJA10*, welches im Menschen das Cx62 und in der Maus das Cx57 kodiert, mit Hypertonie zugrunde. Um die Bedeutung des Cx57 in Bezug auf die Blutdruckregulation aufzuzeigen und einen möglichen Pathomechanismus zu identifizieren, erfolgte die telemetrische Blutdruckmessung in Cx57-defizienten Tieren und entsprechenden Kontrollen. Die Expression von Cx57 wurde in genetisch veränderten Tieren mittels β -Galaktosidasefärbung entnommener Organe untersucht. Anstelle des Cx57 wird in diesen Mäusen die β -Galaktosidase unter dem endogenen Cx57-Promotor exprimiert.

3.1.1. Telemetrische Blutdruckmessung bei Cx57-defizienten Tieren

Der arterielle Blutdruck wurde drei- bis viermal täglich über 13 Tage für jeweils fünf Minuten telemetrisch im wachen Tier gemessen (Abb. 7 A, B, C) und anschließend über den Tag gemittelt. Untersucht wurden Wildtyp Mäuse (Cx57 $+/+$), heterozygote Cx57 Mäuse (Cx57 $+/-$) und homozygot Cx57-defiziente Mäuse (Cx57 $-/-$). Aus dem Drucksignal war es mit Hilfe der dem System zugehörigen Software möglich, die Herzfrequenz zu berechnen. Dies erfolgte ebenfalls für jeden einzelnen Messtag (Abb. 7 D).

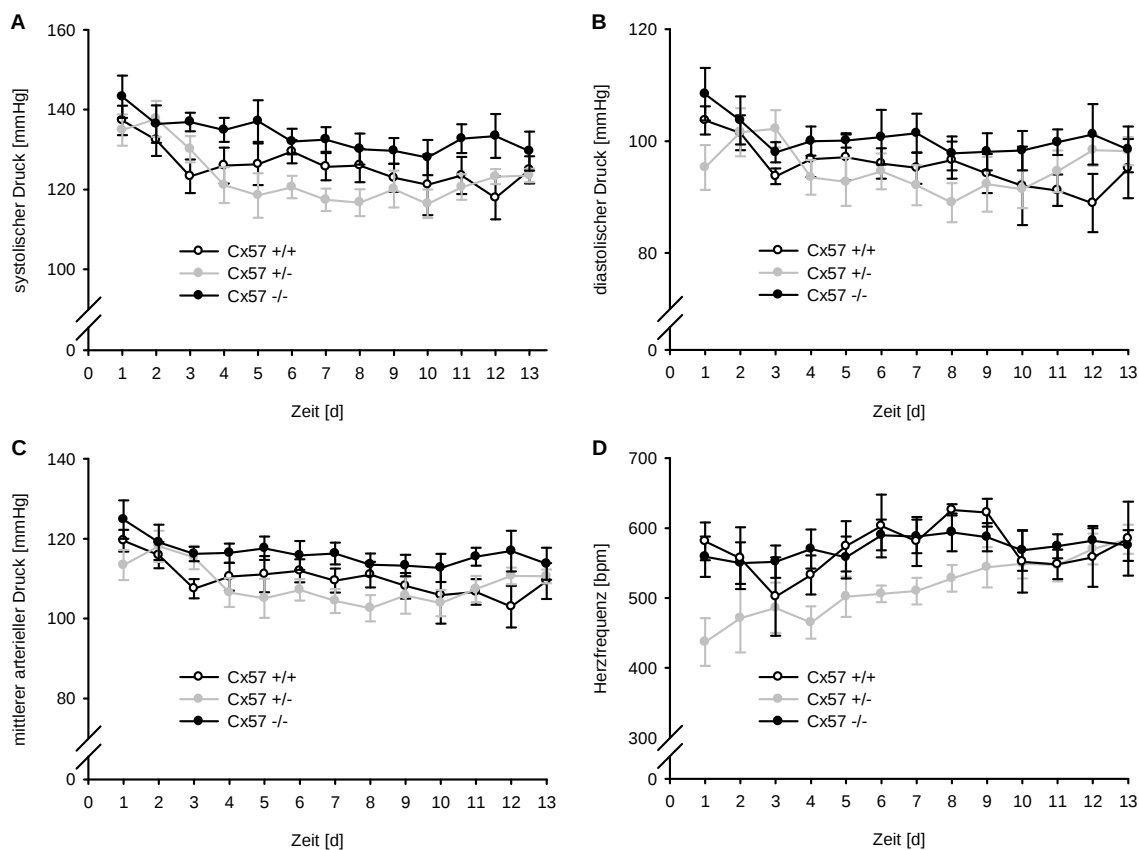


Abbildung 7: Telemetrische Messung des arteriellen Blutdruckes (A-C) und der Herzfrequenz (D) über 13 Tage nach Implantation des Druckabnehmers am Tag 0. Mittelwerte des systolischen (A), diastolischen (B), mittleren arteriellen Druckes in mmHg (C) und der Herzfrequenz in Schlägen/Minute (D) in Wildtyp-Mäusen (Cx57 +/+ n=7), heterozygoten Cx57 Mäusen (Cx57 +/- n=9) und homozygot Cx57-defizienten Mäusen (Cx57 -/- n= 8) $\pm$ SEM.

Am Tag 1 der Messung sind die arteriellen Drücke in den verschiedenen Genotypen jeweils höher als im weiteren Verlauf der Messung. Dies ist wahrscheinlich bedingt durch die Implantation des Druckabnehmers. Daher wurden für den Vergleich der Genotypen die Mittelwerte der arteriellen Drücke und der Herzfrequenz von Tag 2-7 und Tag 8-13 ermittelt und statistisch ausgewertet (Abb. 8).

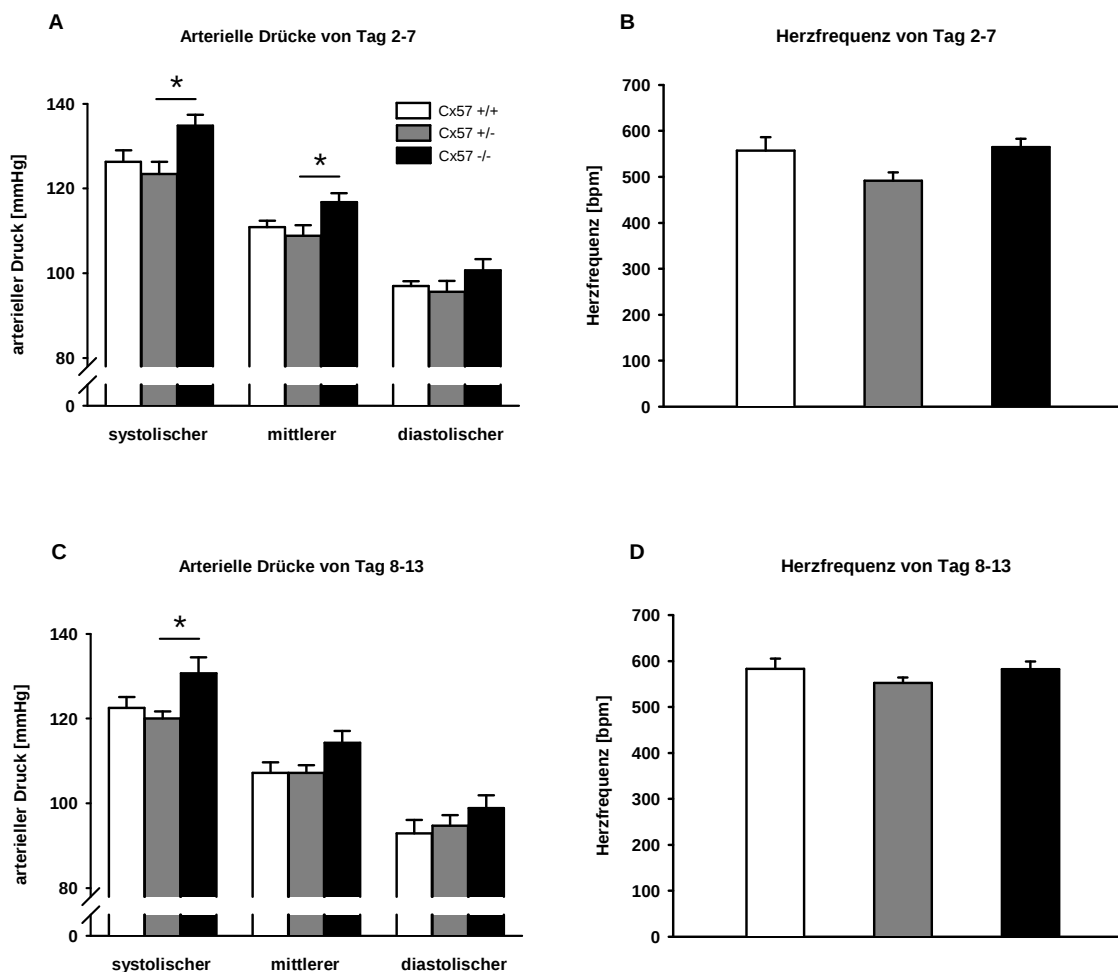


Abbildung 8: Mittelwerte des systolischen, mittleren und diastolischen arteriellen Druckes und der Herzfrequenz von Tag 2-7 (A, B) und Tag 8-13 (C, D) $\pm$ SEM. Gemessen wurden Wildtyp-Mäuse (Cx57 +/+, weiß), heterozygote Cx57 Mäuse (Cx57 +/-, grau) und homozygot Cx57-defiziente Mäuse (Cx57 -/-, schwarz). * $P < 0,05$ (ANOVA nach Bonferroni korrigiert).

Der Mittelwert des mittleren arteriellen Druckes in der ersten Messwoche (Tag 2-7) lag in Cx57 +/+ Tieren bei 111 ± 2 mmHg, in Cx57 +/- Tieren bei 109 ± 3 mmHg und bei 117 ± 2 mmHg in Cx57 -/- Tieren. Ein signifikanter Unterschied im mittleren arteriellen Druck zeigte sich lediglich zwischen den heterozygoten und den Cx57-defizienten Tieren ($P = 0,04$). In der zweiten Messwoche (Tag 8-13) wiesen die drei Gruppen einen ähnlichen mittleren arteriellen Druck auf. Der systolische arterielle Druck war sowohl in der ersten Messwoche als auch in der zweiten Messwoche unterschiedlich zwischen den heterozygoten und den Cx57-defizienten Tieren (Tag 2-7: $P = 0,02$; Tag 8-13: $P = 0,03$). Der Mittelwert des diastolischen arteriellen Druckes unterschied sich weder in der ersten noch in der zweiten Messwoche zwischen den drei Genotypen. Auch die Herzfrequenz war nicht

verschieden zwischen den Genotypen innerhalb der jeweiligen Messwoche. Ein Unterschied zwischen den Blutdruckmessungen und der Herzfrequenz innerhalb eines Genotyps zwischen der ersten und der zweiten Woche zeigte sich lediglich in der Herzfrequenz in heterozygoten Cx57 Tieren, welche in der zweiten Woche höher war ($P=0,003$).

3.1.2. Expression von Cx57

Die Cx57-Defizienz in der Maus wurde erreicht, indem die codierende Region des Cx57 durch die codierende Region des *lacZ* Gens ersetzt wurde, sodass die defiziente Maus das Enzym β -Galaktosidase unter der Kontrolle des endogenen Cx57 Promotors exprimierte. Anhand einer β -Galaktosidasefärbung entnommener Organe bzw. angefertigter Paraffinschnitte konnte die Aktivität des Cx57 Promotors bestimmt werden, was Rückschlüsse auf die zelluläre Lokalisation von Cx57 erlaubt. Die β -Galaktosidasefärbung erfolgte in Retina, Aorta, Lunge, Leber, Milz, Niere, Lymphknoten (mesenterial, axillär, inguinal, zervikal, popliteal), Musculus cremaster, Oesophagus sowie dem Herzen von Cx57 $+/+$, Cx57 $+/-$ und Cx57 $-/-$ Mäusen. Eine charakteristische Blaufärbung, als Ausdruck der β -Galaktosidase Aktivität, in Zellen heterozygoter und homozygot Cx57-defizienter Tiere zeigte sich lediglich in der Retina (Abb. 9).

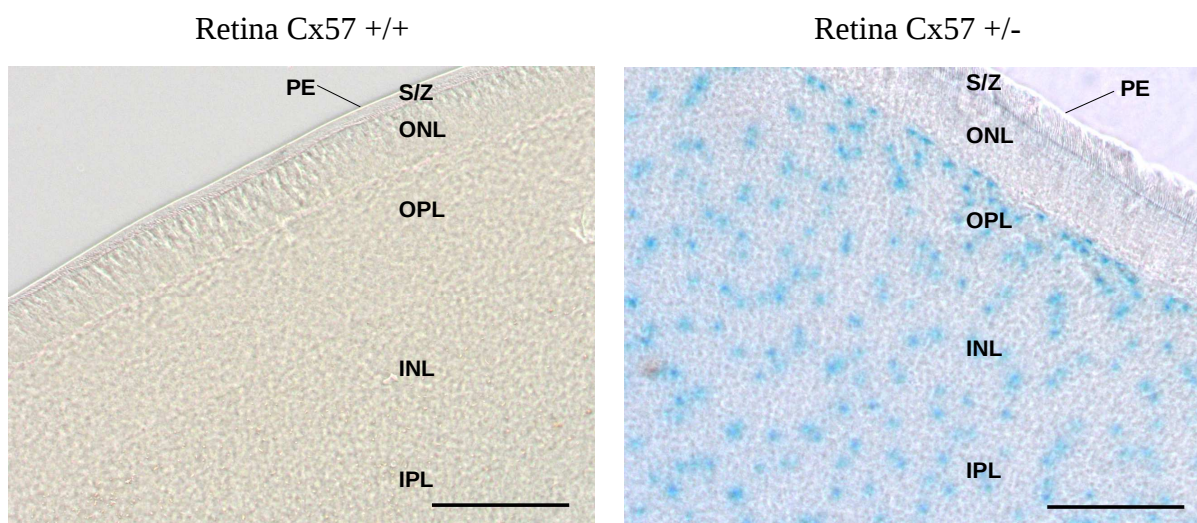


Abbildung 9: β -Galaktosidasefärbung der Retina einer Cx57 $+/+$ Maus (links) und Cx57 $+/-$ Maus (rechts). Es zeigte sich eine deutliche β -Galaktosidase Aktivität in der Retina der Cx57 $+/-$ Maus. (PE= Pigmentepithel, S/Z= Stäbchen und Zapfen im Außen- und Innensegment, ONL= äußere Körnerschicht, OPL= äußere plexiforme Schicht, INL= innere Körnerschicht, IPL= innere plexiforme Schicht). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

Da die weiteren entnommenen Organe keine Blaufärbung aufwiesen und sich somit das gleiche Bild im Wildtyp wie in den heterozygoten und homozygot Cx57-defizienten Tieren zeigte, werden im Folgenden nur exemplarisch Bilder der Organe aus Cx57 +/- oder Cx57 -/- Tieren gezeigt (Abb. 10, 11, 12). Dies zeigt, dass sich β -Galaktosidase Aktivität weder in der glatten Muskulatur noch in Endothelzellen der Gefäße (Aorta, Arteriole des Musculus cremaster), und auch in anderen Organen als der Retina, nicht nachweisen ließ. Der Promotor des Cx57 scheint somit nur in der Retina aktiv zu sein.

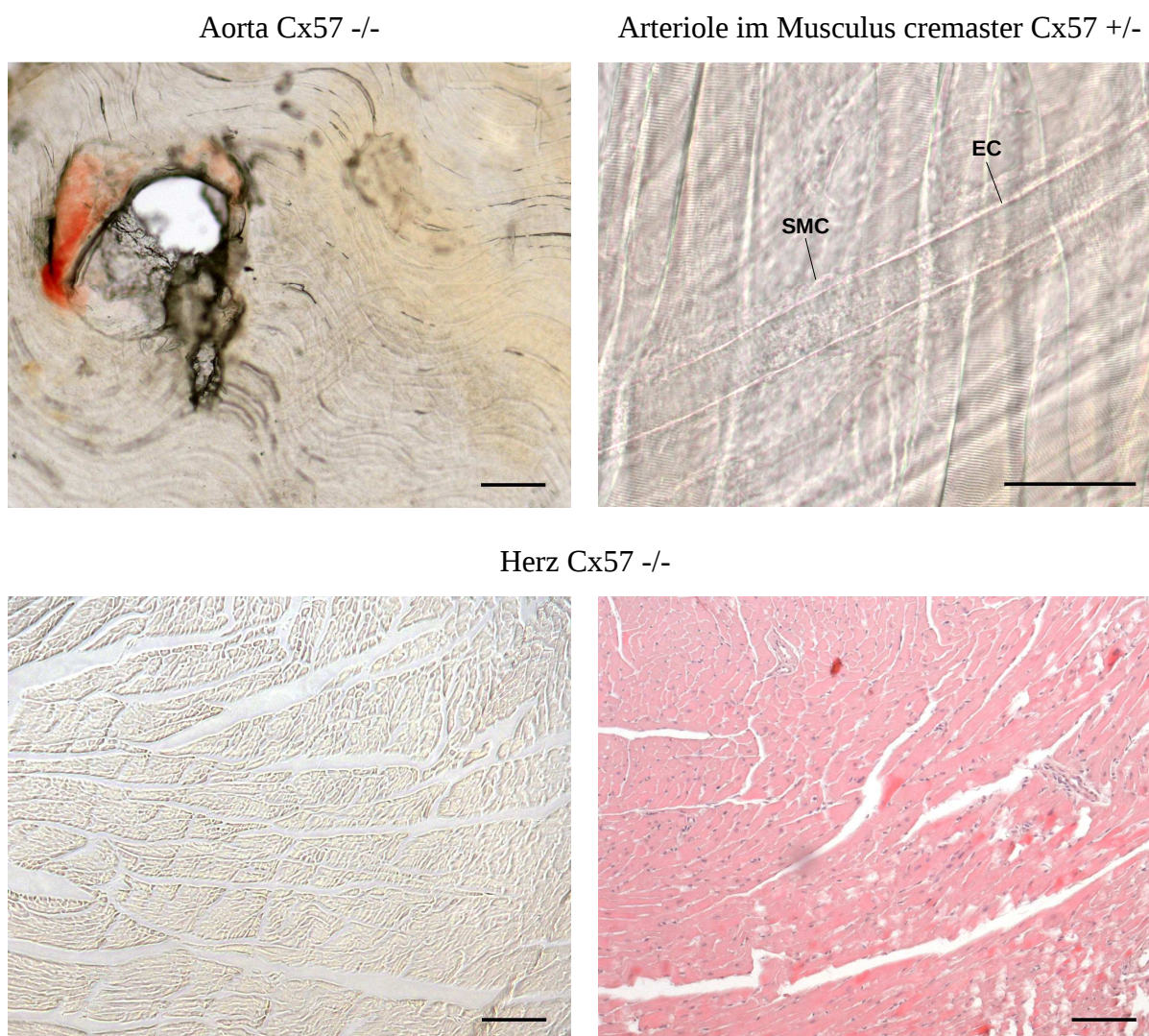
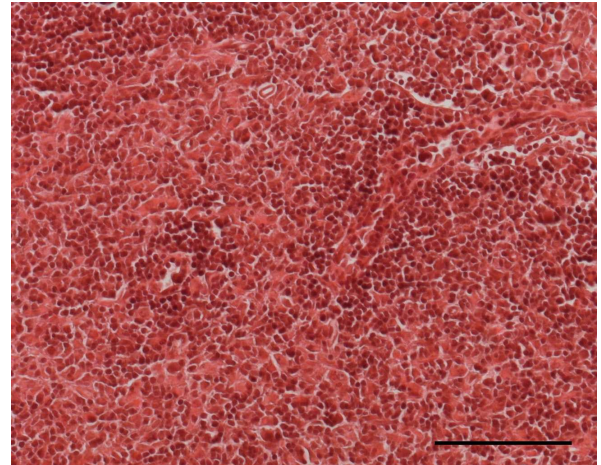
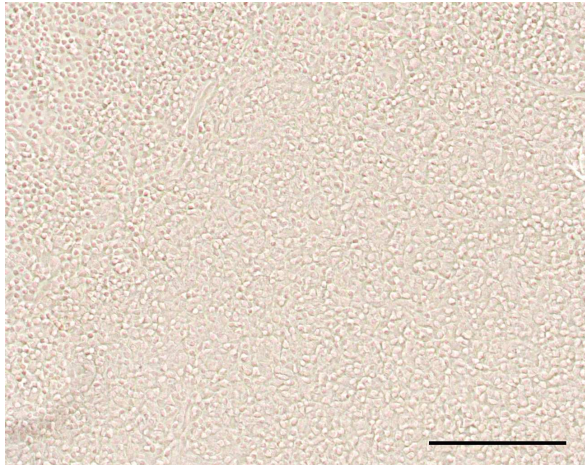
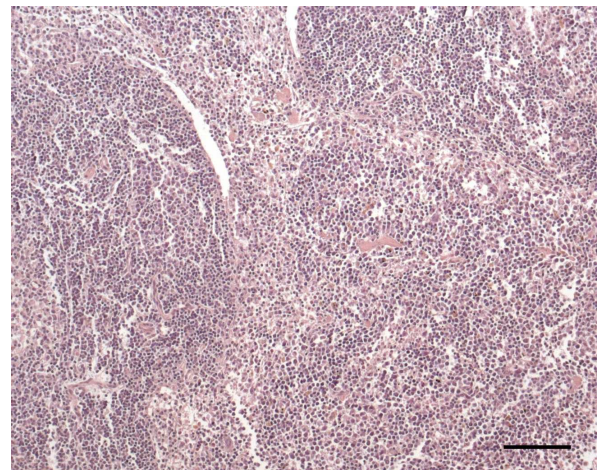
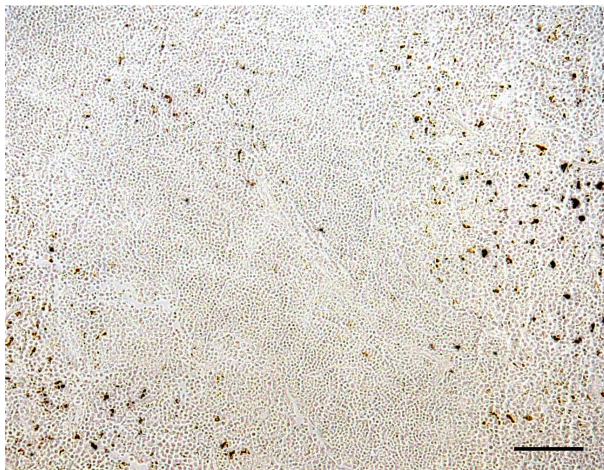


Abbildung 10: β -Galaktosidasefärbung der Aorta und des Musculus cremasters mit einer Arteriole (SMC=glatte Muskelzelle; EC=Endothelzelle) einer Cx57 +/- bzw. Cx57 -/- Maus (obere Reihe). β -Galaktosidasefärbung (unten links) und HE-Färbung (unten rechts) des Herzens Cx57 -/- Maus. Es zeigte sich keine β -Galaktosidase Aktivität. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

Lymphknoten (mesenterial) Cx57 +/-



Milz Cx57 -/-



Leber Cx57 -/-

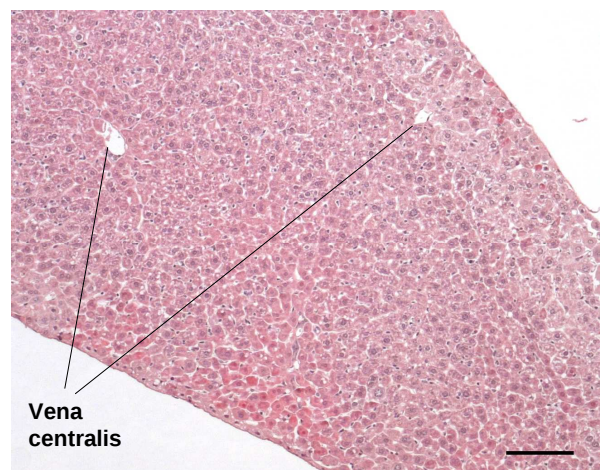
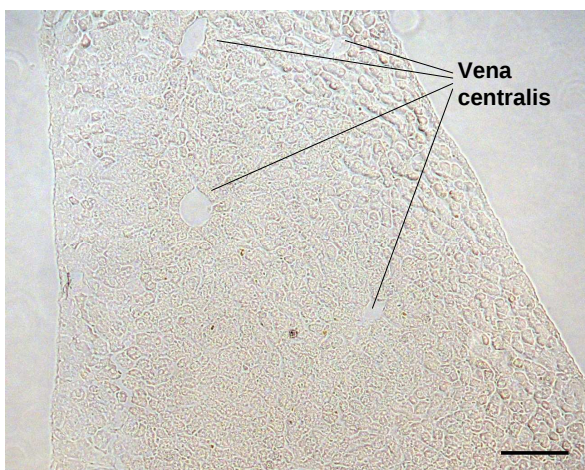
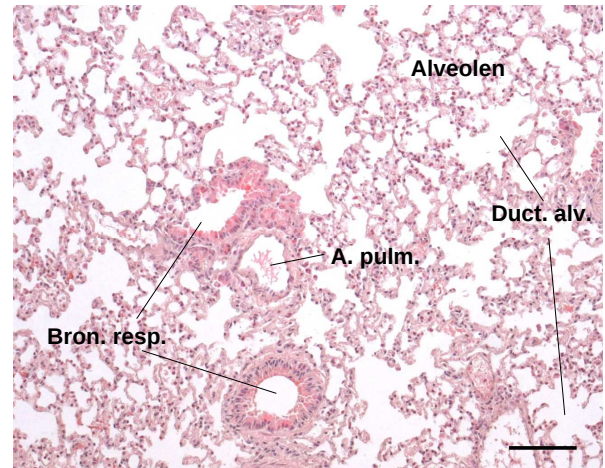
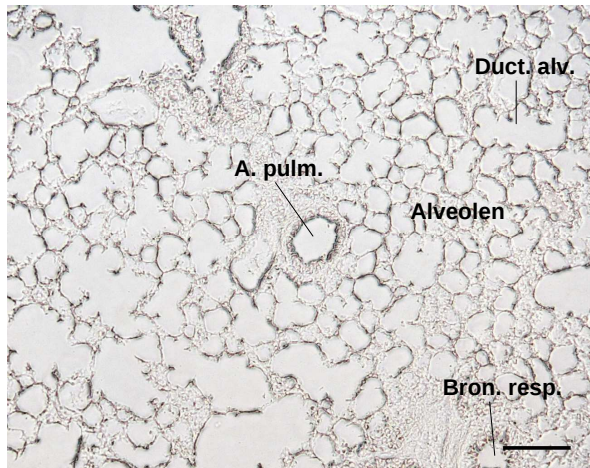
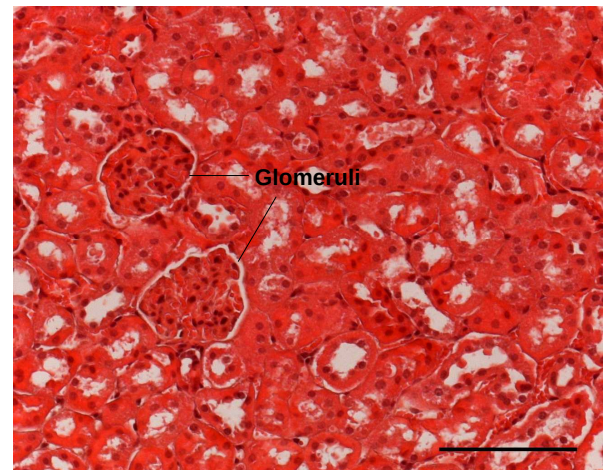
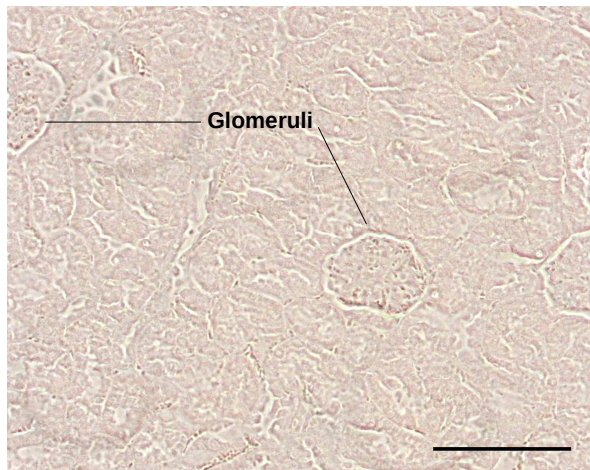


Abbildung 11: β -Galaktosidasefärbung (links) und HE-Färbung (rechts) eines mesenterialen Lymphknotens (oben), der Milz (Mitte) und der Leber mit Venae centrales (unten) einer Cx57 +/- bzw. Cx57 -/- Maus. Es zeigte sich keine β -Galaktosidase Aktivität. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

Lunge Cx57 -/-



Niere Cx57 -/-



Oesophagus Cx57 -/-

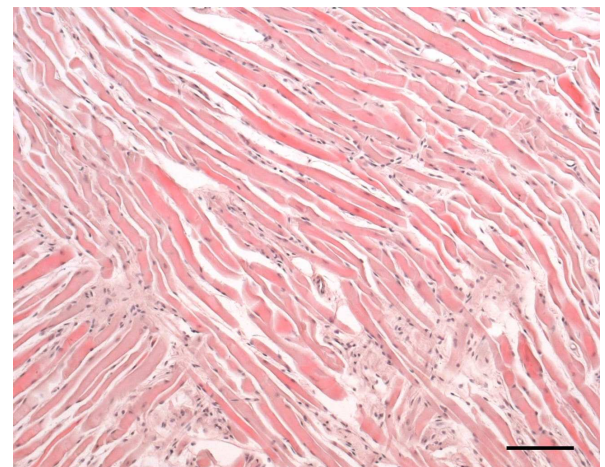
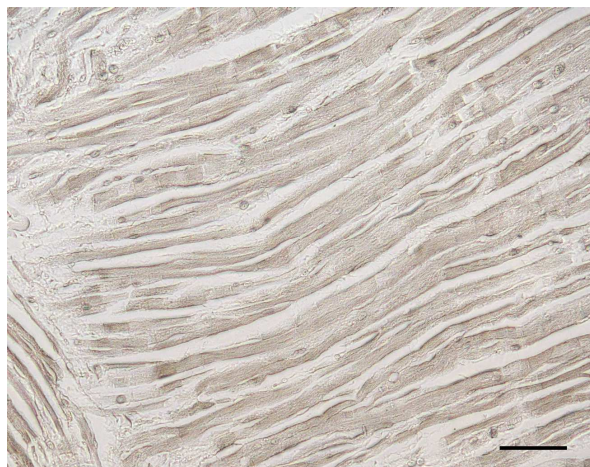


Abbildung 12: β -Gal- (li) und HE-Färbung (re) der Lunge mit Ductus alveolaris, Arteria pulmonalis, Alveolen und Bronchiolus respiratorius (oben), der Niere mit Glomeruli (Mitte) und des Oesophagus (unten) einer Cx57 -/- Maus. Es zeigte sich keine β -Galaktosidase Aktivität. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

3.2. Untersuchungen zur Assoziation des Cx40-Gens mit linksventrikulärer Hypertrophie

Im zweiten Teil erfolgte die Suche nach funktionellen Polymorphismen im codierenden Bereich und im Promotorbereich des für Cx40 codierenden Gens *GJA5* durch die Sequenzierung von Patienten-DNA. Nachfolgend wurde eine funktionelle Analyse der Polymorphismen mittels Reporter-gen-Assays durchgeführt. Es standen 178 DNA-Proben von Probanden der genomweiten Assoziationsstudie zur Verfügung, die homozygot einen mit LVH assoziierten SNP im Intron des *GJA5* aufwiesen (A>G, rs791295). Die Häufigkeit des selteneren Allels an dieser Position (minor allele frequency =MAF) beträgt laut des internationalen 1000 Genomes Projekt in der Datenbank dbSNP des National Center for Biotechnology Information (NCBI) 0,333. Daraus ergibt sich eine Genotypfrequenz für die homozygot seltene Variante von 11%. Im Menschen werden zwei Transkripte ausgehend von *GJA5* zellspezifisch exprimiert. Die Transkripte 1A und 1B, jeweils ausgehend von Exon 1A bzw. Exon 1B, haben dieselbe codierende Region in Exon 2 (Abb. 13). Transkript 1A wird in Endothelzellen exprimiert, das Transkript 1B in plazentaren Zytotrophoblasten. Beide Transkripte sind im Ventrikel und Atrium des Herzens nachweisbar, jedoch überwiegt in allen Bereichen des Herzens das Transkript 1A (Dupays *et al.*, 2003). Aufgrund dieses Expressionsmusters und vor dem Hintergrund der Assoziation mit linksventrikulärer Hypertrophie wurde bei der Sequenzierung der Fokus auf das Transkript 1A gelegt.

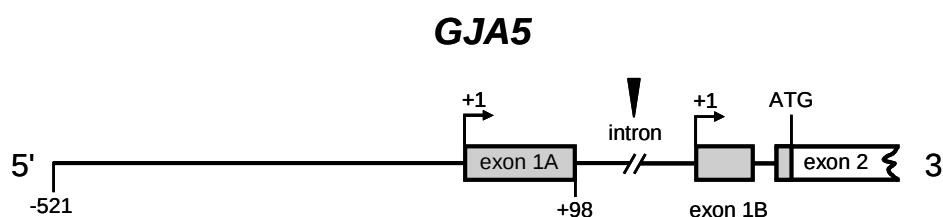


Abbildung 13: Genomische Anordnung des humanen Cx40-codierenden Gens *GJA5*. Der Pfeil markiert den mit LVH assoziierten SNP im Intron des *GJA5* Gens (rs791295). Ausgehend von diesem Gen werden zellspezifisch die Transkripte 1A und 1B exprimiert. Beide haben dieselbe codierende Region in Exon 2.

3.2.1. Sequenzierung der codierenden Region von *GJA5*

Nachdem die codierende Region von *GJA5* in Exon 2 von 178 Probanden der GWAS mittels PCR amplifiziert wurde, erfolgte eine Aufreinigung der Produkte, bevor sich die Sequenz-PCR anschloss. Unter den 178 Probanden der GWAS waren 26, bei denen eine linksventrikuläre Hypertrophie diagnostiziert wurde. Bei den verbleibenden 152 Probanden war der Status des linken Ventrikels unbekannt. Die Sequenzierung der codierenden Region des Cx40 Gens (1077 bp) zeigte keine Änderungen der Basenabfolge in den 178 untersuchten Probanden.

3.2.2. Sequenzierung der Promotorregion von *GJA5*

Da die codierende Region der 178 Probanden keine Basenveränderungen aufwies, erfolgte die Sequenzierung einer Region bestehend aus einem Teil der 5' stromaufwärts von *GJA5* gelegenen Region und der 5'-UTR mit Exon 1A (778 bp). Die Sequenzierung deckte zwei Polymorphismen an Position -44 bp in der 5' stromaufwärts gelegenen Region von *GJA5* (G>A, rs35594137) und +71 bp in Exon 1A (A>G, rs11552588) auf, welche von Groenewegen *et al.* bereits beschrieben wurden (Groenewegen *et al.*, 2003) (Abb. 14 und 15). Die beiden Genloci liegen innerhalb eines LD Blocks (LD = linkage disequilibrium), zwischen ihnen besteht ein Kopplungsungleichgewicht. Als Messzahl für das LD ergab die Online Software SNAP DPrime (D') = 1.000 (<http://www.broadinstitute.org/mpg/snap/ldsearchpw.php>). Aufgrund der Tatsache, dass die beiden Genloci so nah auf dem Chromosom beieinander liegen, dass keine Rekombination zwischen ihnen stattfindet, werden sie gemeinsam vererbt. Wenn somit an Position -44 bp das seltene Allel vorliegt, ist dies auch an Position +71 der Fall. Daher beziehen sich die Ergebnisse in der folgenden Ausführung nur auf Position -44 bp. Von den 178 Probanden wiesen 30 (17%) den homozygot häufigen Genotyp (-44GG), 72 (40%) den homozygot seltenen Genotyp (-44AA) und 76 (43%) den heterozygoten Genotyp (-44GA) auf. Die Genotypen der untersuchten 178 Probanden lagen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($P=0,45$). Auffällig war jedoch die Häufigkeit des homozygot seltenen Genotyps (-44AA) in der untersuchten, mittels Intron SNP vorselektierten Kohorte. In der Literatur wurde das Auftreten des homozygot seltenen Genotyps zwischen 5 bis 7% in Kontrollgruppen (Groenewegen *et al.*, 2003), (Pfenniger *et al.*, 2012) beschrieben.

Laut Datenbank dbSNP liegt die minor allele frequency (MAF) für die beiden Polymorphismen (-44 bp, rs35594137; +71 bp, rs11552588) im internationalen 1000 Genomes Projekt bei 0,222. Daraus ergibt sich eine Genotypfrequenz für die homozygot seltene Variante von 5%. Ein Vergleich der vorselektierten Kohorte mit der Kontrollgruppe der Arbeitsgruppe um Pfenniger et al. zeigte einen hochsignifikanten Unterschied der Genotypfrequenzen ($P < 0,0001$).

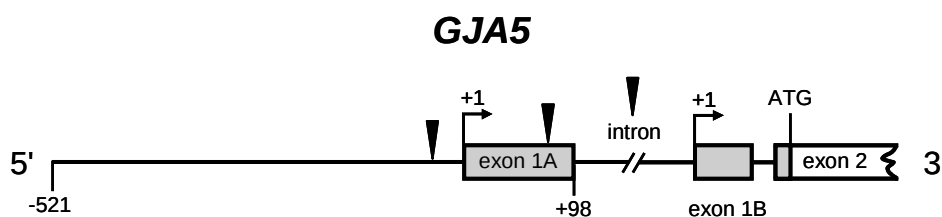
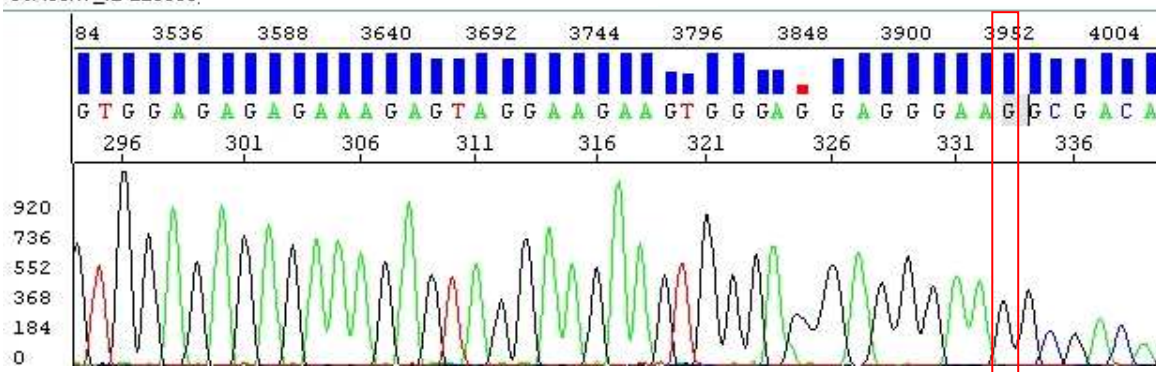


Abbildung 14: Genomische Anordnung des humanen Cx40-codierenden Gens *GJA5*. Der Pfeil im Intron markiert den mit LVH assoziierten SNP (rs791295). Die Pfeile an Position -44 bp in der 5' stromaufwärts gelegenen Region (rs35594137) und +71 bp in Exon 1A (rs11552588) markieren die identifizierten Polymorphismen, die mit einer verstärkten Häufigkeit ($P < 0,0001$) in der untersuchten, vorselektierten Kohorte auftraten.

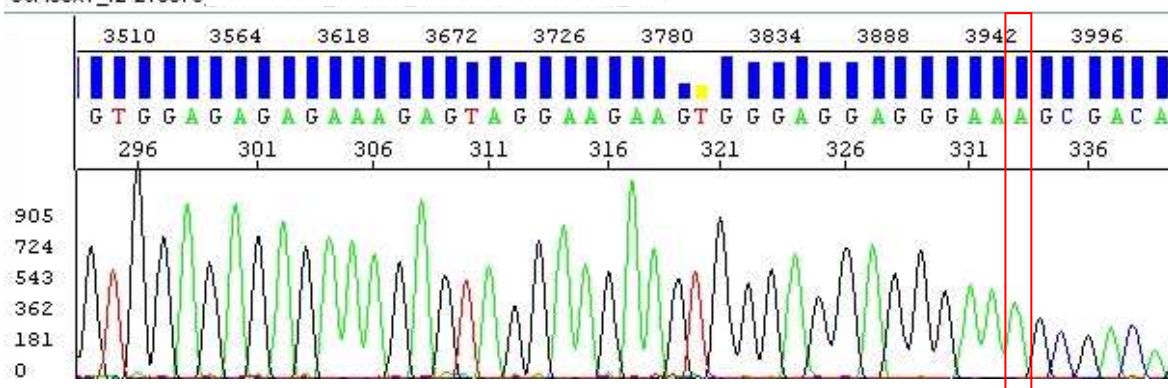
Abbildung 15: (nächste Seite) Einzelsequenzen zweier Probanden um die Region -44 bp (A) und +71 bp (B) des Gens *GJA5*. Die Region um Position +71 bp ist revers sequenziert. Die obere Sequenz zeigt jeweils das häufige Allel der beiden Positionen (-44G und +71A in 5'-3' Richtung) und die untere Sequenz weist jeweils das seltene Allel auf (-44A und +71G in 5'-3' Richtung).

A

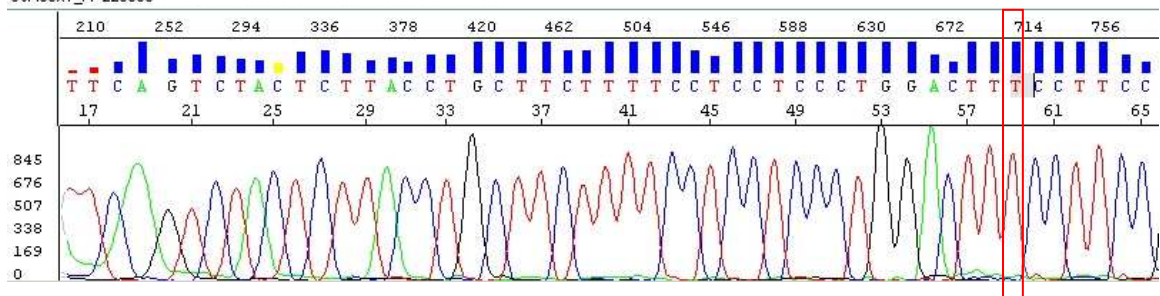
GJA5ex1_f2-225869



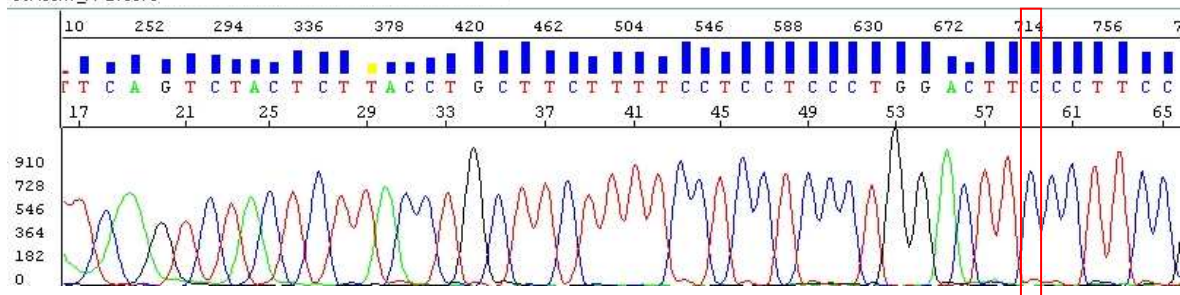
GJA5ex1_f2-215978

**B**

GJA5ex1_r1-225869



GJA5ex1_r1-215978



Um eine genauere Aussage über das Auftreten der beiden Polymorphismen in Probanden mit kardiovaskulären Vorerkrankungen treffen zu können, wurde die Kohorte in eine normotensive ($n=29$), eine hypertensive ($n=112$) und eine Gruppe mit bekannter LVH ($n=26$) aufgeteilt (Tab. 2). Da von 11 der 178 Probanden keine klinischen Daten zur Verfügung standen, verkleinerte sich die Kohorte für die folgenden Betrachtungen auf 167 Probanden. Die Probanden wurden als hypertensiv erachtet, wenn entsprechend den Leitlinien der Deutschen Hochdruckliga der systolische arterielle Druck 140 mmHg oder der diastolische Druck 90 mmHg überschritt, bzw. wenn die Probanden blutdrucksenkende Medikamente einnahmen. Die Genotypfrequenzen der drei Gruppen lagen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (normotensiv: $P=0,76$; hypertensiv: $P=0,62$; LVH: $P=0,68$). In der Annahme eines additiven genetischen Modells, in welchem die exprimierten Allele den Phänotyp so beeinflussen, dass die Anzahl eines veränderten Allels die Effektgröße der Erkrankung bestimmt, zeigte sich ein Trend zur Assoziation des SNP Locus mit Hypertonie ($P=0,076$) und LVH ($P=0,088$). In der Annahme eines rezessiven Modells, in dem nur das homozygote Vorliegen des veränderten Allels zur Entstehung einer kardiovaskulären Erkrankung beiträgt, konnte eine deutliche Assoziation des homozygot seltenen Genotyps (-44AA) mit Hypertonie ($P=0,033$) und LVH ($P=0,027$) gezeigt werden. Da sich in der Literatur ein Hinweis auf die geschlechtsspezifische Assoziation der homozygot seltenen Variante mit Hypertonie findet (Firouzi *et al.*, 2006), erfolgte eine weitere Aufteilung der Gruppen nach dem Geschlecht der Probanden (112 Männer, 55 Frauen) (Tab. 2). Erstaunlicherweise zeigte sich nach der geschlechtsspezifischen Aufteilung sowohl in der Annahme des additiven als auch in der Annahme des rezessiven Modells ein Trend zur Assoziation des homozygot seltenen Genotyps mit Hypertonie (additiv: $P=0,088$; rezessiv: $P=0,058$) lediglich in der männlichen Gruppe. Es zeigte sich in der männlichen Gruppe keine deutliche Assoziation des homozygot seltenen Genotyps mit LVH (additiv: $P=0,152$; rezessiv: $P=0,102$).

Die Blutdruckdaten der Probanden mit LVH waren leider unbekannt. Jedoch haben ca. 80% der Patienten über 55 Jahren mit LVH eine Hypertonie (Félix-Redondo *et al.*, 2012). Daher wurden diese beiden Gruppen zusammengefasst und gegen die normotensive Gruppe in Bezug auf das Auftreten der homozygot seltenen Variante getestet. In der nicht nach Geschlecht gruppierten Gesamtkohorte ($n=167$) zeigte sich eine Assoziation des homozygot seltenen Genotyps im additiven ($P=0,061$) und im rezessiven ($P=0,022$)

Modell mit der kardiovaskulären Erkrankung. Nach der geschlechtsspezifischen Aufteilung bestätigte sich die bereits angedeutete Tendenz zur Assoziation des homozygot seltenen Genotyps mit der Erkrankung (additiv: $P=0,061$; rezessiv: $P=0,058$) in der männlichen Gruppe, während in der weiblichen Gruppe keine Assoziation zu belegen war (additiv: $P=0,512$; rezessiv: $P=0,324$).

Durch die Sequenzierung wurden in einem einzelnen Probanden mit Cx40 Intron SNP und LVH vier weitere Polymorphismen aufgedeckt (-451C>T, rs791284; -202A>G, rs791285; -21G>C, rs791286; +130G>A, rs1692137). Der einzelne Proband trug an den vier Genloci jeweils die heterozygote Variante. Laut NCBI Datenbank dbSNP liegt die minor allele frequenzen (MAF) für die Positionen -451 bp / -21 bp / +130 bp bei jeweils 0,018 und für die Position -202 bp bei 0,045. Die Frequenzen stammen erneut aus dem 1000 Genomes Projekt. Aus den Frequenzen ergeben sich die heterozygoten Genotypfrequenzen von 4% bzw. 9%.

	homozygot häufig (-44GG)	heterozygot (-44GA)	homozygot selten (-44AA)	P-Wert (additiv)	OR 1 (additiv)	OR 2 (additiv)	P-Wert (rezessiv)	OR (rezessiv)
<i>beide Geschlechter (n=167)</i>								
Normotonie (n=29)	21% (6)	58% (17)	21% (6)					
Hypertonie (n=112)	15% (17)	42% (47)	43% (48)	0,076	1,7	3,0	0,033	2,9
LVH (n=26)	15% (4)	35% (9)	50% (13)	0,088	2,0	4,0	0,027	3,7
<i>männlich (n=112)</i>								
Normotonie (n=17)	23% (4)	59% (10)	18% (3)					
Hypertonie (n=85)	14% (12)	42% (36)	44% (37)	0,088	2,0	4,1	0,058	3,6
LVH (n=10)	10% (1)	40% (4)	50% (5)	0,152	2,8	8,0	0,102	4,4
<i>weiblich (n=55)</i>								
Normotonie (n=12)	17% (2)	58% (7)	25% (3)					
Hypertonie (n=27)	18% (5)	41% (11)	41% (11)	0,636	1,3	1,7	0,477	2,0
LVH (n=16)	19% (3)	31% (5)	50% (8)	0,450	1,5	2,3	0,253	2,9

Tabelle 2: Häufigkeiten der Cx40 Genotypen in der Gesamtheit der untersuchten Probanden und in den geschlechterspezifischen Gruppen. Die Genotypfrequenz ist in Prozent (Anzahl) der Probanden angegeben. P-Werte und dazugehörige Odds Ratios (OR) wurden unter der Annahme eines additiven genetischen Modells für Vergleiche der hypertensiven bzw. LVH-Gruppe mit der normotensiven Gruppe mit Hilfe des Cochran Armitage Trend Tests ermittelt und für den Vergleich der Gruppen unter der Annahme eines rezessiven genetischen Modells mit Hilfe des Fisher's Exact Tests. Im additiven Modell vergleicht OR 1 den heterozygoten mit dem homozygot häufigen Genotyp und OR 2 den homozygot seltenen mit dem homozygot häufigen Genotyp.

3.2.3. Funktionelle Analyse der Polymorphismen mittels Reportergen-Assay

Inwieweit die durch die Sequenzierung aufgedeckten Polymorphismen in der 5' stromaufwärts gelegenen Region und im Exon 1A des für Cx40 codierenden Gens *GJA5* die Genexpression verändern, wurde mit Hilfe eines Dual-Luciferase Reportergen-Assays untersucht. Hierzu wurde durch den Einsatz sequenzspezifischer Oligonukleotide eine 683 bp umfassende DNA-Sequenz (von -521 bp bis +162 bp) amplifiziert, die entweder das häufige Allel an Position -44 bp und +71 bp in der Basensequenz, die zwei SNPs (bzw. das seltene Allel) oder die vier veränderten Positionen des einzelnen Probanden enthielt, und in den Vektor pGEM®-T Easy Vektor inseriert. Die anschließende Sequenzierung des Inserts stellte sicher, dass keine zusätzlichen Mutationen in der Sequenz entstanden und vorhanden waren. Nach einem Restriktionsverdau wurde das Cx40-Fragment in einen Vektor mit einem promotorlosen Firefly-Luciferasegen kloniert (pGL4.10[*luc2*] Vektor). Anschließend erfolgte eine Transfektion von humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa) und humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) mit den verschiedenen Konstrukten und dem alleinigen Vektor als Kontrolle. Eine Kotransfektion des Vektors pGL4.74[*hRluc*/TK], welcher für die Renilla-Luciferase kodiert, diente der anschließenden Normalisierung der Firefly-Luciferase Aktivitäten, um Schwankungen in der Transfektionseffizienz zu berücksichtigen.

Die inserierte Sequenz, bestehend aus einem Teil der 5' stromaufwärts gelegenen Region und der 5'-UTR mit Exon 1A des Cx40 Gens mit dem jeweils häufigen Allel (-44G, +71G), zeigte eine signifikante Promotoraktivität im Vergleich zum leeren Kontrollvektor pGL4.10[*luc2*] (Ratio Firefly/Renilla: -44G 1,67 vs. Kontrolle 0,15, $P=0,003$) in HeLa-Zellen. Es kann somit angenommen werden, dass die Core-Promotorelemente für die RNA-Polymerase II (TATA-Box, Initiatorelement) in der klonierten Sequenz von -521 bp bis +162 bp enthalten waren. Die Sequenz mit der seltenen Variante der zwei Polymorphismen zeigte im Vergleich zur Sequenz mit häufigem Allel eine unveränderte Promotoraktivität (Ratio Firefly/Renilla: -44A 1,87). Die Sequenz mit den vier in einem einzelnen Probanden identifizierten Polymorphismen reduzierten die Promotoraktivität (Ratio Firefly/Renilla: 4 SNPs 1,01) im Vergleich zur Aktivität der unveränderten Sequenz in HeLa Zellen. Es verblieb jedoch eine deutliche Expression ausgehend von der inserierten Sequenz mit vier Basenaustauschen im Vergleich zum Kontrollvektor.

Im Menschen und der Maus wird Cx40 unter anderem in Endothelzellen exprimiert. Dort trägt es maßgeblich zur Gefäßregulation bei, indem es benachbarte Zellen koppelt und so den elektrochemischen Informationsfluss entlang der Gefäße ermöglicht. Daher erfolgte ebenfalls eine Transfektion der verschiedenen Konstrukte in humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1). Die 683 bp umfassende Region von *GJA5* mit dem häufigen Allel der Polymorphismen zeigte in HMEC-1 Zellen ebenfalls Promotoraktivität im Vergleich zum Kontrollvektor (Ratio Firefly/Renilla: -44G 4,5 vs. Kontrolle 0,6). Diese wurde wie in den HeLa Zellen nicht von den zwei Polymorphismen beeinflusst (Ratio Firefly/Renilla: -44A 4,7). Im Gegensatz zu den HeLa Zellen blieb die Promotoraktivität ausgehend von der Sequenz mit den seltenen Allelen der vier Polymorphismen ebenfalls unverändert (Ratio Firefly/Renilla: 4 SNPs 4,3). Abbildung 14 fasst die Ergebnisse der Reportergen-Assays in HeLa (Abb. 16 A) und HMEC-1 Zellen (Abb. 16 B) zusammen. Die Werte wurden für die Darstellung auf das Wildtypkonstrukt normalisiert. Hierfür wurde die Luciferase Aktivität des Konstrukts mit dem häufigen Allel in jedem einzelnen Experiment gleich 100% gesetzt und alle weiteren Aktivitäten zu dieser ins Verhältnis gesetzt.

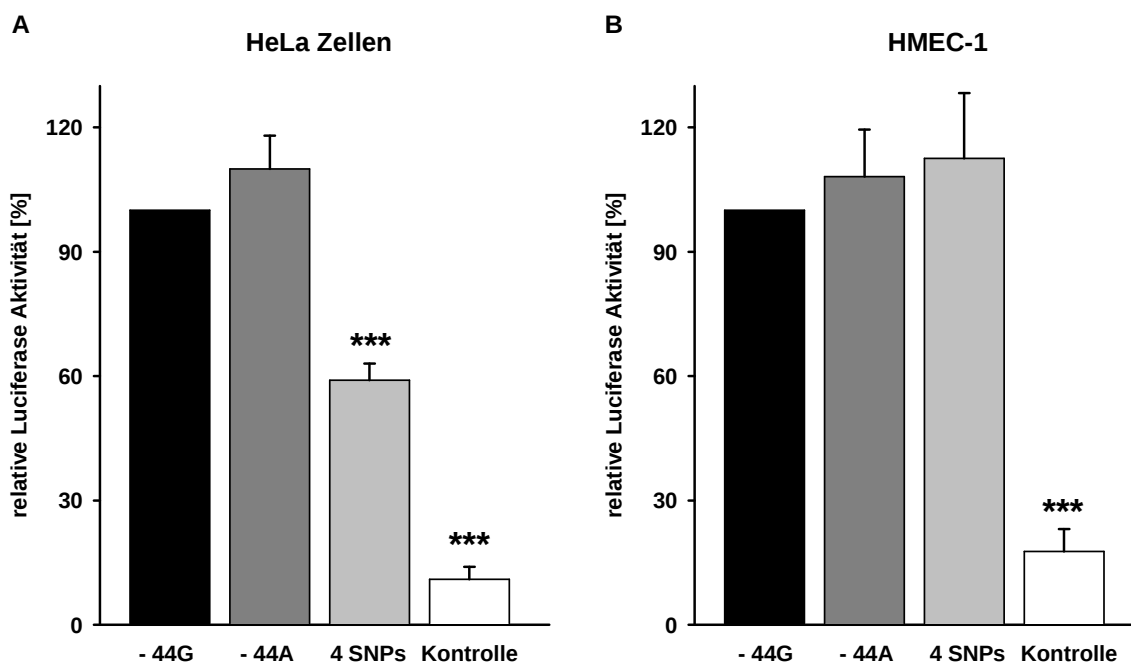


Abbildung 16: Mit Hilfe von Reporter-Gen-Assays ermittelte relative Promotoraktivität einer 683 bp umfassenden Sequenz bestehend aus einem Teil der 5' stromaufwärts gelegenen Region und der 5'-UTR mit Exon 1A des für Cx40 kodierenden Gens *GJA5* mit dem häufigen Allel (-44G), mit dem seltenen Allel (-44A) und den vier Polymorphismen (4 SNPs) in HeLa (A) und HMEC-1 Zellen (B). Die Sequenz mit dem häufigen Allel (-44G) zeigte deutliche Promotoraktivität in beiden Zelllinien und wurde auf 100% skaliert, worauf die weiteren Aktivitäten normalisiert wurden. Die zwei in der untersuchten Kohorte häufig aufgetretenen Polymorphismen (-44A) beeinflussten die Promotoraktivität weder in HeLa noch in HMEC-1 Zellen. Die vier in einem einzelnen Probanden identifizierten Polymorphismen reduzierten die Promotoraktivität in HeLa, jedoch nicht in HMEC-1 Zellen. n=4 Messungen je Zelllinie als 4-fach Bestimmung, *** $P \leq 0,001$ vs. weitere Konstrukte (ANOVA nach Bonferroni korrigiert).

Um die Cx40-Promotorregion näher einzugrenzen und den Einfluss der zwei Polymorphismen (-44A, +71G) auf die Expression genauer zu untersuchen, erfolgte die Klonierung verschieden langer Segmente der zuvor untersuchten 683 bp langen *GJA5*-Sequenz mit dem häufigen und seltenen Allel an Position -44 bp und +71 bp in einen Vektor mit einem promotorlosen Firefly-Luciferasegen (pGL4.10[luc2]). Die 683 bp Sequenz wurde sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Ende verkürzt (Abb. 17). Der Reporter-Gen-Assay erfolgte in HeLa-Zellen. Die Verkürzung der Sequenz mit dem häufigen Allel um das Exon 1A auf 490 bp (2. Konstrukt von -521 bp bis -31 bp) beeinflusste die Promotoraktivität der Sequenz in HeLa-Zellen im Vergleich zur 683 bp Sequenz nicht (Ratio Firefly/Renilla: 2. Konstrukt 10,2 vs. 1. Konstrukt 10,6). Eine weitere Verkürzung des 3'-Endes (3. Konstrukt von -521 bp bis -47 bp) und im darauffolgenden Schritt auch

eine zusätzliche Verkürzung des 5'-Endes (4. Konstrukt von -294 bp bis -31 bp) führte ebenfalls zu keiner Änderung der Promotoraktivität ausgehend von der inserierten Sequenz (Ratio Firefly/Renilla: 3. Konstrukt 9,4 und 4. Konstrukt 8,8). Erst eine weitere Verkürzung des 5' Endes (5. Konstrukt von -83 bp bis +98 bp) führte zu einer verminderten Promotoraktivität, welche sich jedoch weiterhin vom leeren Kontrollvektor (pGL4.10[luc2]) unterschied (Ratio Firefly/Renilla: 5. Konstrukt 4,5 und Kontrollvektor 1,7). Eine Verkürzung der 5' stromaufwärts von *GJA5* gelegenen Region auf bis zu -41 bp (6. Konstrukt von -41 bp bis +98 bp) führte zum Verlust der Promotoraktivität der inserierten Sequenz in HeLa-Zellen (Ratio Firefly/Renilla: 6. Konstrukt 2,0). Diese Ergebnisse der Reportergen-Assays mit der Cx40 Sequenz mit dem häufigen Allel sind in der Abbildung 18 A in Form der relativen Luciferase Aktivität dargestellt. Die einzelnen Aktivitäten wurden prozentual zum Konstrukt mit der längsten Cx40 Sequenz und dem häufigen Allel ins Verhältnis gesetzt. Es erfolgte ebenfalls die Klonierung der unterschiedlich langen Cx40-Sequenzen mit den seltenen Allelen an den Positionen -44 bp und +71 bp (-44A, +71G), falls in der Sequenz enthalten, vor das promotorlose Firefly-Luciferasegen in den Vektor pGL4.10[luc2]. Die Transfektion der Konstrukte mit dem seltenen Allel in HeLa Zellen ergab keine Unterschiede in den Promotoraktivitäten im Vergleich zu den Aktivitäten ausgehend von den inserierten Cx40 Sequenzen mit dem häufigen Allel (relative Luciferase Aktivität in Abb. 18 B; Ratio Firefly/Renilla: 1. Konstrukt 7,1; 2. Konstrukt 10,1; 4. Konstrukt 8,2; 5. Konstrukt 3,7; 6. Konstrukt 2,1). Das 3. Konstrukt enthielt nur eine Sequenz stromaufwärts der Polymorphismen, daher gibt es kein zweites Konstrukt mit einem seltenen Allel.

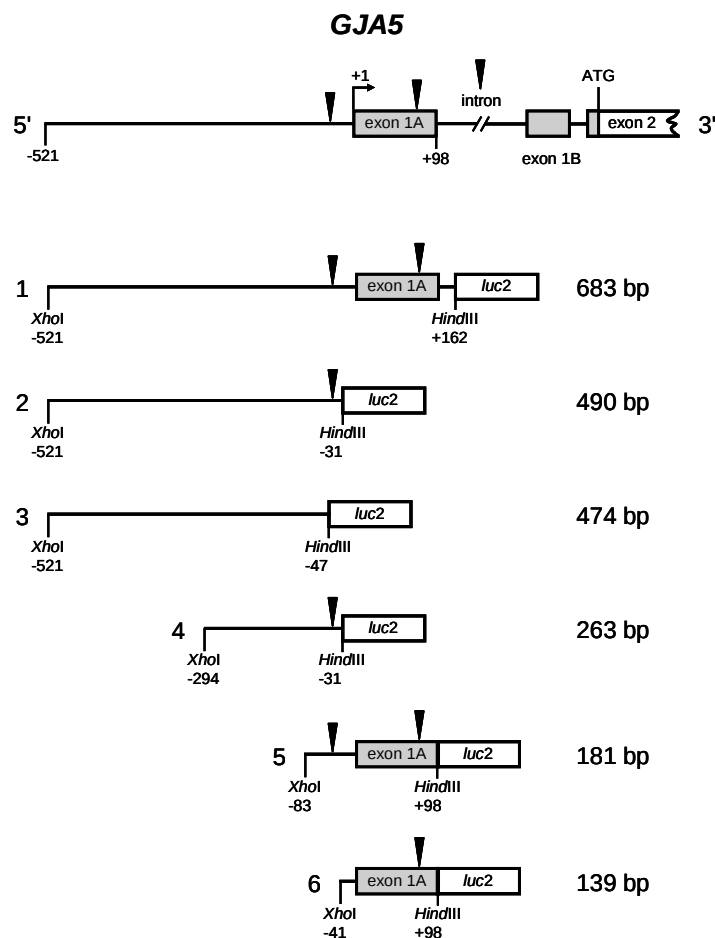


Abbildung 17: Schematische Darstellung des für Cx40-codierenden Gens *GJA5* mit einem Teil der 5' stromaufwärts gelegenen Region, der 5'-UTR mit Exon 1A, Exon 1B und Exon 2 (obere Reihe). Darunter folgend die in Reporter-gen-Assays verwendeten Konstrukte 1-6 mit der Angabe der Insertgröße in Basenpaaren (bp). Sie enthielten unterschiedliche Sequenzen des *GJA5*-Gens (angegeben durch Nummerierung), welche für die Insertion in einen Vektor mit einem promotorlosen Firefly-Luciferasegen (pGL4.10[*luc2*]) mit Restriktionsschnittstellen (*Xho*I, *Hind*III) versehen wurden. Die Promotoraktivität ausgehend von den inserierten Sequenzen wurde nach Transfektion in HeLa-Zellen bestimmt. Die Pfeile entsprechen den zwei in der Kohorte häufig auftretenden Polymorphismen (-44A, +71G) und dem zur Selektion der Kohorte gewählten SNP im Intron von *GJA5* (rs791295).

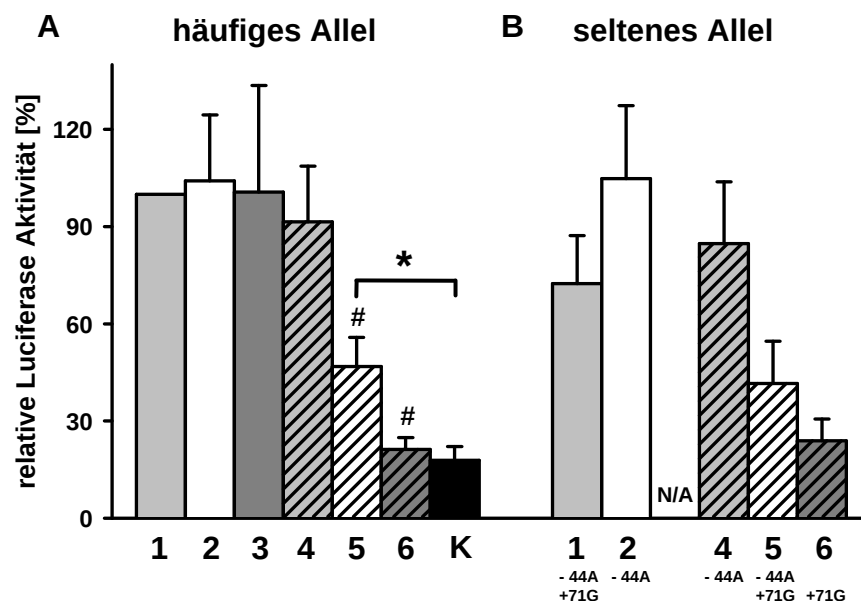


Abbildung 18: Relative Promotoraktivität ausgehend von sechs verschiedenen langen Cx40-Sequenzen vor einem Luciferase-Reportergen (siehe Abb. 17) ohne (A, häufiges Allel) und mit (B, seltenes Allel) Polymorphismen (-44A, +71G) und dem leeren Vektor pGL4.10[luc2] als Kontrolle (K) bestimmt nach Transfektion in HeLa-Zellen. Die Promotoraktivität der einzelnen Konstrukte wurde jeweils auf das längste Konstrukt Nr. 1 (683 bp) mit dem häufigen Allel normalisiert. Eine Verkürzung der 5' stromaufwärts von *GJA5* gelegenen Region von -521 bp auf bis zu -294 bp (Konstrukt Nr. 4) führte zu keiner Veränderung der Promotoraktivität. Die weitere Eingrenzung der Promotorregion bis zur Base -83 (Konstrukt Nr. 5) reduzierte die Aktivität, während eine Verkürzung bis auf -41 bp (Konstrukt Nr. 6) zum vollständigen Verlust der Promotoraktivität führte. Es bestanden keine Unterschiede zwischen der Promotoraktivität der Sequenzen mit dem häufigen (A) und dem seltenen Allel an Position -44 bp und +71 bp (B). Da das Konstrukt Nr. 3 eine Sequenz des *GJA5* Gens enthielt, in dessen Umfang kein Polymorphismus lag (siehe Abb. 13), gibt es hierzu keine aufgezeigte Promotoraktivität (N/A für not available). n=5 Experimente als Vierfachbestimmung ausgeführt. #: $P < 0,05$ vs. Konstrukt Nr. 1 (ungepaarter t-Test nach Bonferroni korrigiert). *: $P < 0,05$ vs. leeren Kontrollvektor (ungepaarter t-Test nach Bonferroni korrigiert).

4. Diskussion

4.1. Die Regulation des arteriellen Blutdrucks erfolgt unabhängig von Cx57

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen am Mausmodell vor dem Hintergrund der Assoziation des humanen für Cx62 codierenden Gens *GJA10* mit Hypertonie durchgeführt. Das murine Ortholog zum humanen Cx62 ist Cx57 (Willecke *et al.*, 2002; Söhl *et al.*, 2003). Die telemetrischen Blutdruckmessungen an wachen Cx57-defizienten Mäusen zeigten keine Unterschiede im arteriellen Druck zu Wildtyp Kontrollen. Auch die Herzfrequenzen waren gleich. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Cx57 in der Maus zur Regulation des arteriellen Blutdrucks in Ruhe nicht notwendig ist.

Die Expressionsdaten des Cx57 unterstützen diese Folgerung. Erste Northern-Blot Hybridisierungen zeigten eine Cx57 mRNA Expression im Herzen, der Haut, Niere, Lunge, den Eierstöcken und Hoden der Maus (Manthey *et al.*, 1999). Nachfolgende Northern-Blot Analysen anderer Arbeitsgruppen konnten diese Expressionsdaten nicht bestätigen. Es konnte lediglich eine deutliche Cx57 mRNA Expression in der Retina (Hombach *et al.*, 2004; Ciolofan *et al.*, 2007), und in Teilen des Gehirns von Mäusen nachgewiesen werden, welche durch real-time PCR bestätigt wurde (Zappalà *et al.*, 2010). Für Untersuchungen zur Cx57 Expression unabhängig von spezifischen Antikörpern und zur weiteren funktionellen Analyse wurden Cx57-defiziente Mäuse generiert, in denen die β -Galaktosidase unter dem endogenen Cx57-Promotor exprimiert wird (Cx57^{lacZ/lacZ}-Mäuse). Anhand von β -Galaktosidasefärbungen von Organen dieser Cx57-defizienter Mäuse konnte in der Retina die genaue Lokalisation des Cx57 bestimmt werden. Cx57 wird in den Horizontalzellen am Übergang der inneren Körnerschicht (inner nuclear layer, INL) zur äußeren plexiformen Schicht (outer plexiform layer, OPL) exprimiert (Hombach *et al.*, 2004). Western-Blot-Analysen und immunhistologische Methoden bestätigten die Protein-Expression in den Horizontalzellen der Retina (Ciolofan *et al.*, 2007; Janssen-Bienhold *et al.*, 2009) und in Teilen des Gehirns (Zappalà *et al.*, 2010). Über die Aktivität des Cx57 Promotors in anderen Organen dieser genetisch modifizierten Maus wurde bisher nicht berichtet.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine β -Galaktosidasefärbung von Retina, Aorta, Lunge, Leber, Milz, Niere, Lymphknoten, Musculus cremaster, Oesophagus sowie dem Herzen solcher *lacZ*-tragenden, Cx57-defizienten Mäuse. Da diese Mäuse die β -Galaktosidase unter dem endogenen Cx57-Promotor exprimierten, bedeutete eine Blaufärbung des Gewebes die Aktivität des endogenen Cx57 Promotors und lässt eine physiologische Expression von Cx57 vermuten. Als einziger Expressionsort von Cx57 konnte hier ebenfalls die Retina identifiziert werden. Es zeigte sich lediglich ein Unterschied in der Lokalisation der Blaufärbung innerhalb der Retina im Vergleich zu den veröffentlichten Daten der Gruppe um Hombach *et al.*. Die Blaufärbung beschränkte sich nicht nur auf den Übergang der inneren Körnerschicht zur äußeren plexiformen Schicht, sondern war in der vorliegenden Arbeit neben der äußeren plexiformen Schicht und der inneren Körnerschicht auch in der inneren plexiformen Schicht und der Ganglion Zellschicht zu detektieren. Die Blaufärbung lässt jedoch keinen direkten Schluss auf die Ausprägung der endogenen Cx57 Promotoraktivität zu, da die Blaufärbung nicht quantifizierbar ist. Außerdem kann anhand der Blaufärbung nicht auf das Vorhandensein funktioneller Cx57 Kanäle in der Membran der Horizontalzellen geschlossen werden, so dass eventuell trotz Anwesenheit von Cx57 benachbarte Zellen nicht miteinander kommunizieren können.

Aufgrund des Fehlens von Cx57 in kardiovaskulären Organen, wie den Blutgefäßen und dem Herzen, und der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Normotonie Cx57-defizienter Mäuse, ergeben sich verschiedene Interpretationsmöglichkeiten zur Assoziation des humanen für Cx62 codierenden Gens (*GJA10*) mit Hypertonie. Möglicherweise ist das murine Cx57, wie von Söhl *et al.* 2003 und 2010 beschrieben, trotz einer Identität der Aminosäuren von 78 % und einer Nukleotididentität von 82% nicht das adäquate Ortholog zum humanen Cx62. Von den 21 im Menschen identifizierten Connexinen haben zwei (Cx59, Cx25) kein murines Ortholog (Sohl & Willecke, 2004). Auch das unterschiedliche Expressionsmuster von Cx57 und Cx62 deutet auf verschiedene Funktionen dieser Connexine in den verschiedenen Spezies hin. Im Gegensatz zu Cx57 in der Maus wird Cx62 im Menschen neben der Retina auch im Skelettmuskel und im Herzen exprimiert (Söhl *et al.*, 2003; Söhl *et al.*, 2010). Daher könnten pathophysiologische Vorgänge, die einer Krankheitsassoziation mit dem humanen Cx62 unterliegen, möglicherweise nicht im Tiermodell vorliegen und auch nicht darstellbar sein. Bisher gibt es in der Literatur keine Hinweise auf Krankheiten im Menschen, die auf Veränderungen im *GJA10*

zurückzuführen sind. Andererseits kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Assoziation des *GJA10* um ein falsch positives Ergebnis in der genomweiten Assoziationsstudie handelt.

Ungeachtet der Diskrepanz bezüglich der Orthologie und des Expressionsmusters des murinen Cx57 und des humanen Cx62 lässt sich feststellen, dass der Verlust von Cx57 in der Maus keinen Einfluss auf den arteriellen Blutdruck hat.

4.2. Assoziation von SNPs in der Promotorregion von *GJA5* mit Hypertonie und LVH

Die Basis für den zweiten Teil der Promotionsarbeit bildete die gefundene Assoziation eines SNPs im Intron des für Cx40 codierenden Gens *GJA5* mit linksventrikulärer Hypertrophie in Patienten. Zur Klärung dieser Assoziation wurde nach funktionellen Polymorphismen in *GJA5* in 178 Probanden der genomweiten Assoziationsstudie gesucht. Die untersuchten Probanden wiesen daher alle den SNP rs791295 im Intron von *GJA5* auf.

In der codierenden Region des *GJA5* in Exon 2 wurde bei keinem der 178 untersuchten Probanden ein Basenaustausch identifiziert, so dass bei allen von der Expression eines funktionellen Cx40 auszugehen ist. Um mögliche Polymorphismen in der Promotorregion zu identifizieren, die das Expressionsniveau von Cx40 modifizieren, wurde eine Region, die den putativen Promotor des Transkripts 1A enthielt, bestehend aus einem Teil der 5' stromaufwärts von *GJA5* gelegen Region und der 5'-UTR mit Exon 1A, sequenziert.

Im Menschen werden zwei Transkripte (1A, 1B) ausgehend von *GJA5* zellspezifisch exprimiert, welche dieselbe codierende Region in Exon 2 haben. Transkript 1A wird in Endothelzellen exprimiert (Pfenniger *et al.*, 2012), das Transkript 1B in plazentaren Zytotrophoblasten. Im Ventrikel und Atrium des Herzens sind beide Transkripte nachweisbar, jedoch überwiegt in allen Bereichen das Transkript 1A (Dupays *et al.*, 2003). Aufgrund dieses Expressionsmusters und vor dem Hintergrund der Assoziation mit

linksventrikulärer Hypertrophie wurde bei der Sequenzierung der Fokus auf das *GJA5* Transkript 1A gelegt.

In der untersuchten Region wurden mittels Sequenzierung zwei im Kopplungsungleichgewicht stehende Polymorphismen (-44 bp G>A, rs35594137; +71 bp A>G, rs11552588) identifiziert. Die Polymorphismen wurden bereits in verschiedenen Kohorten identifiziert. Jedoch beschreiben diese Studien kontroverse Assoziationen mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Einerseits stehen sie in Zusammenhang mit familiärem Vorhoffstillstand (Groenewegen *et al.*, 2003), einer höheren Anfälligkeit des Vorhofs für Flimmern (Firouzi *et al.*, 2004) und einem erhöhten Risiko für Männer an Hypertonie zu erkranken (Firouzi *et al.*, 2006). Andererseits wird in einer weiteren Studie berichtet, dass in einer größeren Kohorte keine Assoziation dieser Polymorphismen mit Hypertonie oder koronarer Herzkrankheit zu finden war (Pfenniger *et al.*, 2012). Von den 178 Probanden der vorliegenden Arbeit wiesen 30 (17%) den homozygot häufigen Genotyp, 72 (40%) den homozygot seltenen Genotyp und 76 (43%) den heterozygoten Genotyp der beiden SNP-Loci auf. Obwohl die Genotypverteilung im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht lag ($P=0,45$), war die Häufigkeit des Auftretens der homozygot seltenen Variante auffällig. Das mit 5 bis 7% in der Literatur und der Datenbank dbSNP beschriebene Auftreten des homozygot seltenen Genotyps in gesunden Kontrollgruppen (Groenewegen *et al.*, 2003; Pfenniger *et al.*, 2012) ist signifikant unterschiedlich im Vergleich zu der Häufigkeit des homozygot seltenen Genotyps in der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte (40%, 72 von 178 Probanden, $P<0,0001$ vs. Auftreten des homozygot seltenen Genotyps in der Kontrollgruppe von Pfenniger *et al.*). Möglicherweise liegt dem 6 bis 8-fach erhöhten Auftreten des homozygot seltenen Genotyps die Vorselektion der Kohorte zugrunde. Die 178 Probanden der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte wiesen alle einen SNP im Intron von *GJA5* auf, welcher in der GWAS mit linksventrikulärer Hypertrophie assoziiert war.

Nach der Zuordnung der Kohortenmitglieder entsprechend ihres kardiovaskulären Krankheitsbildes zeigte sich der homozygot seltene Genotyp (-44AA) in der Annahme eines rezessiven Modells, in dem nur das homozygote Vorliegen des veränderten Allels zur Entstehung einer kardiovaskulären Erkrankung beiträgt, sowohl mit LVH als auch mit Hypertonie assoziiert. In der Annahme eines additiven Modells, in welchem die Anzahl der exprimierten seltenen Allele den Phänotyp in kumulativer Art und Weise beeinflussen, so dass die Anzahl eines seltenen Allels die Effektgröße bestimmt, stellte sich lediglich ein

Trend zur Assoziation dar. Die Assoziation war interessanterweise im männlichen Geschlecht vorhanden und fand sich nicht in den weiblichen Probanden der Kohorte. Da ca. 80% der Patienten über 55 Jahren mit LVH auch eine Hypertonie aufweisen (Félix-Redondo *et al.*, 2012) und verschiedene Studien eine erhöhte Prävalenz der LVH bei Hypertonie gezeigt haben (Kannel, 1992; Verdecchia *et al.*, 1998; Coca *et al.*, 1999; Schirmer *et al.*, 1999), wurden die Probanden mit LVH und Hypertonie in einer Gruppe zusammengefasst und gegen die normotensive Gruppe in Bezug auf das Auftreten des homozygot seltenen Genotyps untersucht. Dies ergab eine Assoziation des homozygot seltenen Genotyps sowohl im additiven als auch im rezessiven Modell mit der kardiovaskulären Erkrankung, welche wiederum nur im männlichen Geschlecht zu finden war.

Die Assoziation der beiden SNP Loci mit Hypertonie vorrangig im männlichen Geschlecht ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Firouzi *et al.* aus den Niederlanden, bei der der homozygot seltene Genotyp in einer Subpopulation ihrer Gesamtkohorte von 177 männlichen Probanden mit Hypertonie assoziiert war. 50% der männlichen Probanden waren hypertensiv, von denen wiederum 7% den homozygot seltenen Genotyp aufwiesen (Firouzi *et al.*, 2006). Sie ist jedoch konträr zu dem Ergebnis einer Studie von Pfenniger *et al.*, bei der keine Assoziation mit Hypertonie in einer größeren Kohorte von 786 Schweizer Probanden beider Geschlechter festgestellt werden konnte. Von 411 hypertensiven Probanden wiesen 3% den homozygot seltenen Genotyp auf, in der normotensiven Gruppe aus 375 Probanden hatten 6% den homozygot seltenen Genotyp (Pfenniger *et al.*, 2012). Aufgrund der Vorselektion der hier untersuchten Kohorte anhand des mit LVH assoziierten SNPs im Intron von *GJA5* erhöhte sich das Vorkommen des homozygot seltenen Genotyps drastisch. Falls eine Assoziation der Polymorphismen mit Bluthochdruck oder LVH tatsächlich vorhanden ist, sollte sie in dieser Kohorte deutlich werden. Um in einer nicht-vorselektierten Kohorte auf ebenso viele Träger des homozygot seltenen Genotyps bei einer Genotypfrequenz von 5% zu kommen, müsste die zu untersuchende Kohorte statt aus nur 167 Probanden mit bekannten Blutdruckdaten aus 1340 Probanden bestehen. Zudem würde die Assoziation der SNPs mit Hypertonie in der vorselektierten Kohorte die große Anzahl hypertensiver Probanden erklären (67%, 112 der 167 untersuchten Probanden).

In der Annahme des additiven Modells führte das Vorliegen des heterozygoten Genotyps im Vergleich zum homozygot häufigen Genotyp im männlichen Geschlecht zu einer

Verdopplung des Risikos an Hypertonie zu erkranken (Odds Ratio = 2,0). Der Vergleich des homozygot häufigen Genotyps mit dem homozygot seltenen ergab einen vierfachen Anstieg des Risikos an einer Hypertonie zu erkranken (OR = 4,0). Daher sollten die beiden Polymorphismen in *GJA5* (-44A, +71G) als Risikofaktor für Hypertonie in Betracht gezogen werden.

Zusätzlich zu den zwei bisher beschriebenen Polymorphismen wurden in einem einzelnen Probanden bei der Sequenzierung der putativen Promotorregion vier weitere Basenaustausche identifiziert (-451C>T, rs791284; -202A>G, rs791285; -21G>C, rs791286; +130G>A, rs1692137). Der einzelne Proband wies für jede Position den heterozygoten Genotyp auf. Laut NCBI Datenbank dbSNP liegen die Frequenzen dieser Polymorphismen für den heterozygoten Genotyp in der europäischen Bevölkerung bei 0%. Die ethnische Herkunft dieses Probanden war jedoch unbekannt und aufgrund des einmaligen Auftretens lassen sich keine Assoziationen mit Hypertonie oder LVH berechnen.

Die funktionellen Konsequenzen der identifizierten Polymorphismen bezüglich der Genexpression von Cx40 wurden mit Hilfe von Reporter-gen-Assays in humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa) und humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) untersucht. Eine 683 bp umfassende DNA-Sequenz (-521 bp bis +162 bp), die neben der 5'-UTR mit Exon 1A auch einen Teil der 5' stromaufwärts von *GJA5* gelegenen Region und somit den putativen Promotor enthielt, zeigte deutliche Promotoraktivität (6 bis 9-fach höhere Aktivität im Vergleich zum leeren Kontrollvektor) in HeLa und HMEC-1 Zellen. Die zwei im Kopplungsungleichgewicht stehenden Polymorphismen (-44A, +71G) beeinflussten die Promotoraktivität der inserierten Sequenz aber weder in HeLa noch in HMEC-1 Zellen. Die vier weiteren in dem einen Probanden identifizierten SNPs hingegen reduzierten die Promotoraktivität der *GJA5* Sequenz in HeLa Zellen deutlich (41%). Es verblieb aber weiterhin eine signifikante Promotoraktivität im Vergleich zum leeren Kontrollvektor ($P < 0,001$).

Die Verkürzung der *GJA5* Sequenz in Reporter-gen-konstrukten sowohl vom 5'-Ende als auch vom 3'-Ende, um die Region mit Promotoraktivität näher einzugrenzen und einen möglichen Einfluss der SNPs zu untersuchen, ergab eine unveränderte Aktivität bis zu einer Reduktion auf -294 bp in HeLa Zellen. Eine weitere Verkürzung auf bis zu -83 bp

fürte zu einer Abnahme und bis zu -41 bp zur Aufhebung der Promotoraktivität. Daraus ergab sich eine Sequenz von 263 bp (-294 bp bis -31 bp), die vermutlich den Core-Promotor und wichtige Transkriptionsfaktorbindestellen für die Expression von Cx40 enthielt. In dieser Sequenz sind beispielsweise fünf putative Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 enthalten (Dupays *et al.*, 2003), der neben GATA4 entscheidend die Cx40 Promotoraktivität in Ratte und Mensch reguliert (Bierhuizen *et al.*, 2000; Firouzi *et al.*, 2006). Das Vorhandensein essentieller Sp1 Bindestellen in der 5' stromaufwärts von GJA5 gelegenen Region erklärt zudem die Abnahme der Promotoraktivität bei einer Verkürzung der Sequenz auf bis zu -83 bp, da durch diese Verkürzung vier Sp1 Bindestellen entfernt wurden. In allen untersuchten Konstrukten führte das Vorhandensein der Polymorphismen nicht zu einer Änderung der Promotoraktivität. Beide Positionen liegen zudem nicht in putativen Bindungsstellen von SP1 oder GATA4.

Diese Ergebnisse sind konträr zu Reporter-gen-Assays in einer Linie von glatten Muskelzellen der thorakalen Aorta der Ratte (A7r5), in denen die seltenen Varianten zu einer Reduktion der Promotoraktivität um 65% führte (Groenewegen *et al.*, 2003). Für diese Studien wurden zwar nicht mit den vorliegenden Konstrukten identische Reporter-genkonstrukte kloniert, sie enthielten eine Region von -177 bp bis +98 bp von GJA5, jedoch war dieses Konstrukt entweder vollständig in den hier untersuchten enthalten (Konstrukt 1: -521 bp bis +162 bp) bzw. nur um den Bereich des Exon 1A unterschiedlich (Konstrukt 4: -294 bp bis -31 bp), sodass dies für die divergenten Befunde nicht ursächlich sein sollte. Anzunehmen ist eher ein Zelltyp-spezifischer Effekt der SNPs, denn auch die vier weiteren identifizierten Polymorphismen beeinflussten die Promotoraktivität nur in HeLa Zellen und nicht in HMEC-1 Zellen. Da das Transkript 1A vorrangig in Endothelzellen exprimiert wird (Dupays *et al.*, 2003) und Cx40 nicht bzw. nur in glatten Muskelzellen einiger Leitungsgefäße exprimiert wird, erschien die Verwendung der HMEC-1 Zelllinie für Reporter-gen-Assays als am wenigsten artifiziell. Da die Polymorphismen -44A und +71G das Risiko einer Hypertonie oder LVH geschlechtsspezifisch zu verändern scheinen, wie in der vorliegenden Arbeit und in einer anderen Studie gezeigt werden konnte (Firouzi *et al.*, 2006), treten möglicherweise zusätzliche Probleme bei der Durchführung von Zellkulturexperimenten auf. Zelllinien sind zum einen nicht von beiden Geschlechtern verfügbar und von manchen Zelllinien ist das Geschlecht unbekannt, so dass die Ausprägung mancher Polymorphismen eventuell

nicht die Situation im Organismus widerspiegelt. HeLa Zellen sind eindeutig weiblichen Ursprungs (Gebärmutterhals) und HMEC-1 Zellen sind männlichen Ursprungs (Vorhaut).

Zu beachten ist ebenfalls, dass Polymorphismen in der Sequenz stromaufwärts der codierenden Region eines Gens nicht nur die mRNA Expression sondern auch die Translation sowie zuvor und anschließend ablaufende Modifikationen beeinflussen können. So konnte für die Polymorphismen in Transkript 1A gezeigt werden, dass sich die Cx40 mRNA Menge im Gewebe des Vorhofs nicht zwischen den Genotypen unterschied, jedoch das Vorhandensein des heterozygoten (-44AG) oder seltenen Genotyps (-44AA) zu einer Reduktion des Cx40 auf Proteinebene führte (Chaldoupi *et al.*, 2012). Daher kann auch anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Reporter-gen-Assays trotz eines unveränderten Luciferasesignals kein Rückschluss auf die Menge funktioneller Gap junctions bestehend aus Cx40 in den Probanden mit den Polymorphismen gezogen werden.

In der Maus, in der lediglich ein einziges Cx40 Transkript exprimiert wird, führt die Cx40-Defizienz zu einer Hypertonie (de Wit *et al.*, 2003). Das Fehlen von Cx40 verhindert die Kommunikation zwischen den Renin-produzierenden juxtaglomerulären Zellen in der Niere. Dadurch inhibiert der Perfusionsdruck in der Niere die Reninsekretion nicht mehr und es kommt zu einer Renin-abhängigen Hypertonie (Wagner *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2010). Da weder bekannt ist welches Cx40 Transkript in Renin-produzierenden juxtaglomerulären Zellen der Niere des Menschen exprimiert wird, noch Plasma-Renin-Spiegel in den untersuchten Probanden bestimmt wurden, ist es derzeit nicht möglich die Assoziation der Polymorphismen in *GJA5* mit Hypertonie bzw. LVH in eine Verbindung mit der Reninsekretion zu bringen.

Seit der Entschlüsselung der Basenabfolge des humanen Genoms und der Identifikation genetischer Varianten im menschlichen Genom im Rahmen des internationalen HapMap Projekts Anfang des neuen Jahrtausends gewinnen wir immer mehr Einblicke in die Vielzahl der beteiligten Komponenten menschlicher Erkrankungen und ihrer komplexen Zusammenhänge. Genomweite Assoziationsstudien decken stetig neue an einer Erkrankung beteiligte Faktoren auf, so dass die pathophysiologischen Mechanismen immer komplizierter werden. Darum wird es noch viel Zeit in Anspruch nehmen, bis die Wissenschaft diese einzelnen Loci und ihre Bedeutung im Netzwerk der komplexen

Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen zu verstehen und letztlich in sie einzugreifen weiß, um Erkrankungen zu verbessern, heilen oder gar verhindern zu können. Für das Cx40 konnte eine Assoziation mit Hypertonie und LVH gezeigt werden, welche vorrangig im männlichen Geschlecht vorliegt. Inwieweit die Polymorphismen im Cx40 Transkript 1A zu einer gestörten Kommunikation in den Renin-produzierenden Zellen der Niere und einem damit verbundenen Renin-Exzess führen, bleibt zu klären.

5. Zusammenfassung

Die stetige Zunahme kardiovaskulärer Erkrankungen in der Bevölkerung und die damit verbundenen Kosten erfordern höchsten Einsatz in der Erforschung möglicher Ursachen und deren Behandlung. Doch gerade Erkrankungen wie z.B. Hypertonie oder linksventrikuläre Hypertrophie sind multifaktoriell bedingte Krankheiten, was das Auffinden der unterliegenden Pathomechanismen und das Eingreifen in diese erheblich erschwert. Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) ermöglichen eine genaue Analyse genetischer Varianten einer bestimmten Kohorte und eine nachfolgende Assoziation von Polymorphismen (SNP) mit Erkrankungen. Durch die assoziierten SNPs in der GWAS werden Gene in der unmittelbaren Umgebung des SNPs mit Erkrankungen in Verbindung gebracht, die diese hervorrufen oder beeinflussen können. Das pathophysiologische Verständnis dieser Zusammenhänge kann letztendlich Erkrankungen verstehen helfen, Behandlungen ermöglichen oder Erkrankungen gar verhindern.

In der vorliegenden Dissertation wurden Untersuchungen zu zwei in GWAS identifizierten Connexin-Genen (Cx) durchgeführt. Zum einen das humane Cx62 Gen (*GJA10*), welches mit Hypertonie assoziiert war, zum anderen das humane Cx40 Gen (*GJA5*), welches mit linksventrikulärer Hypertrophie (LVH) assoziiert war. Connexine sind die Strukturproteine der Gap junctions (GJ), welche den morphologischen Baustein für den direkten Austausch von elektrischen und chemischen Signalen zwischen benachbarten Zellen bilden. Sie werden nahezu ubiquitär exprimiert und ermöglichen z.B. die Erregungsfortleitung im Herzen und die Fortleitung von Gefäßantworten entlang des Endothels und des glatten Muskels.

Cx57 ist das murine Ortholog zum humanen Cx62. Daher wurde in wachen Cx57-defizienten Mäusen und entsprechenden Wildtyp Kontrolltieren der Blutdruck telemetrisch über mehrere Tage gemessen. Der systolische, der diastolische und der mittlere arterielle Druck waren in heterozygoten und homozygot Cx57-defizienten Tieren nicht verschieden vom Wildtyp. Lediglich der systolische Druck war in homozygot Cx57-defizienten Tieren erhöht und unterschied sich signifikant von heterozygoten Tieren. Die Herzfrequenz war in allen Genotypen nicht voneinander verschieden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Cx57 in der Maus nicht zur Regulation des arteriellen Blutdrucks in Ruhe beiträgt. Diese Folgerung

wird von Expressionsdaten des Cx57 gestützt. Eine β -Galaktosidasefärbung verschiedener Organe dieser Maus, in der das *lacZ* Gen unter der Kontrolle des endogenen Cx57 Promotors exprimiert wird und diese Färbung als Reporter für die Cx57 Expression verwendet werden kann, zeigte lediglich in der Retina eine deutliche Blaufärbung.

Zur Untersuchung der Assoziation von *GJA5* mit LVH wurde nach funktionellen Polymorphismen im codierenden Bereich und im Promotorbereich von *GJA5* in Patienten-DNA gesucht. Diese Bereiche wurden in 178 Probanden der GWAS, die den mit LVH assoziierten SNP im Intron des *GJA5* aufwiesen, sequenziert. Der codierende Bereich von *GJA5* wies bei keinem Probanden Auffälligkeiten auf, was auf ein potentiell funktionelles Protein schließen lässt. Jedoch wurden in der Promotorregion zwei bereits in der Literatur beschriebene SNPs identifiziert, die in der vorselektierten Gesamtkohorte mit Hypertonie und LVH assoziiert waren. Diese Assoziation des homozygot seltenen Genotyps war interessanterweise im männlichen Geschlecht vorhanden (n=112) und fand sich nicht bei Frauen (n=55). Funktionelle Auswirkungen der in der putativen Promotorregion von *GJA5* gelegenen zwei Polymorphismen (-44A, +71G) wurden mit Luciferase-Reporter-Gen-Assays in HeLa und HMEC-1 Zellen untersucht. Die zwei gekoppelten Polymorphismen beeinflussten die Promotoraktivität der inserierten Sequenz weder in HeLa noch in HMEC-1 Zellen. In einem einzigen Probanden wurden vier weitere heterozygot vorliegende Polymorphismen identifiziert, welche die Promotoraktivität der *GJA5* Sequenz in HeLa Zellen deutlich reduzierten (41%).

Zusammenfassend ließ sich für die Assoziation des *GJA10* mit Hypertonie im Menschen in der Maus kein pathophysiologischer Zusammenhang feststellen. Dagegen zeigte sich eine Assoziation zweier bereits beschriebener Polymorphismen in der putativen Promotorregion des *GJA5* mit Hypertonie und LVH in einer mittels Cx40 Intron SNP präselektierten Kohorte. Die Relevanz der Polymorphismen für die Cx40 Funktion bleibt leider unklar, da die Cx40 Expression durch diese unverändert blieb.

6. Literaturverzeichnis

Alexander DB & Goldberg GS. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Curr Med Chem* (2003) **10**: 2045-2058.

Bevans CG, Kordel M, Rhee SK & Harris AL. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J Biol Chem* (1998) **273**: 2808-2816.

Bierhuizen MF, van Amersfoorth SC, Groenewegen WA, Vliex S & Jongsma HJ. Characterization of the rat connexin40 promoter: two Sp1/Sp3 binding sites contribute to transcriptional activation. *Cardiovasc Res* (2000) **46**: 511-522.

Bruzzone R, Haefliger JA, Gimlich RL & Paul DL. Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Mol Biol Cell* (1993) **4**: 7-20.

Chadjichristos CE, Scheckenbach KEL, van Veen TAB, Richani Saredidine MZ, de Wit C, Yang Z, Roth I, Bacchetta M *et al.*. Endothelial-specific deletion of connexin40 promotes atherosclerosis by increasing CD73-dependent leukocyte adhesion. *Circulation* (2010) **121**:123-131.

Chaldoupi S, Hubens LEG, Smit Duijzentkunst DA, van Stuijvenberg L, Bierhuizen MFA, van Aarnhem EEHL, Nelen M, de Bakker JMT *et al.*. Reduced connexin40 protein expression in the right atrial appendage of patients bearing the minor connexin40 allele (-44 G --> A). *Europace* (2012) **14**: 1199-1205.

Ciolofan C, Lynn BD, Wellershaus K, Willecke K & Nagy JI. Spatial relationships of connexin36, connexin57 and zonula occludens-1 in the outer plexiform layer of mouse retina. *Neuroscience* (2007) **148**: 473-488.

Coca A, Gabriel R, de la Figuera M, López-Sendón JL, Fernández R, Sagastagoitia JD, García JJ & Barajas R. The impact of different echocardiographic diagnostic criteria on the prevalence of left ventricular hypertrophy in essential hypertension: the VITAE study. *ventriculo izquierdo tension arterial española. J Hypertens* (1999) **17**: 1471-1480.

Cohen-Salmon M, Ott T, Michel V, Hardelin JP, Perfettini I, Eybalin M, Wu T, Marcus DC *et al.*. Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr Biol* (2002) **12**: 1106-1111.

Davies TC, Barr KJ, Jones DH, Zhu D & Kidder GM. Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse. *Dev Genet* (1996) **18**: 234-243.

de Bock M, Wang N, Bol M, Decrock E, Ponsaerts R, Bultynck G, Dupont G & Leybaert L. Connexin 43 hemichannels contribute to cytoplasmic Ca^{2+} oscillations by providing a bimodal Ca^{2+} -dependent Ca^{2+} entry pathway. *J Biol Chem* (2012) **287**: 12250-12266.

de Wit C. Connexins pave the way for vascular communication. *News Physiol Sci* (2004) **19**: 148-153.

de Wit C, Roos F, Bolz S & Pohl U. Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiol Genomics* (2003) **13**: 169-177.

de Wit C, Roos F, Bolz SS, Kirchhoff S, Kruger O, Willecke K & Pohl U. Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice. *Circ Res* (2000) **86**: 649-655.

Dedek K, Pandarinath C, Alam NM, Wellershaus K, Schubert T, Willecke K, Prusky GT, Weiler R *et al.*. Ganglion cell adaptability: does the coupling of horizontal cells play a role? *PLoS One* (2008) **3**: e1714.

Dewey MM & Barr L. Intercellular connection between smooth muscle cells: the nexus. *Science* (1962) **137**: 670-672.

Dhein S. Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation. *Trends Pharmacol Sci* (1998) **19**: 229-241.

Dupays L, Mazurais D, Rucker-Martin C, Calmels T, Bernot D, Cronier L, Malassine A, Gros D *et al.*. Genomic organization and alternative transcripts of the human connexin40 gene. *Gene* (2003) **305**: 79-90.

Ebihara L. New roles for connexons. *News Physiol Sci* (2003) **18**: 100-103.

Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hulser DF & Willecke K. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* (1995) **129**: 805-817.

Evans WH, De Vuyst E & Leybaert L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J* (2006) **397**: 1-14.

Figuroa XF, Paul DL, Simon AM, Goodenough DA, Day KH, Damon DN & Duling BR. Central role of connexin40 in the propagation of electrically activated vasodilation in mouse cremasteric arterioles in vivo. *Circ Res* (2003) **92**: 793-800.

Fiori MC, Figuroa V, Zoghbi ME, Saéz JC, Reuss L & Altenberg GA. Permeation of calcium through purified connexin 26 hemichannels. *J Biol Chem* (2012) **287**: 40826-40834.

Firouzi M, Bierhuizen MFA, Kok B, Teunissen BEJ, Jansen AT, Jongsma HJ & Groenewegen WA. The human Cx40 promoter polymorphism -44G-->A differentially affects transcriptional regulation by Sp1 and GATA4. *Biochim Biophys Acta* (2006) **1759**: 491-496.

Firouzi M, Kok B, Spiering W, Busjahn A, Bezzina CR, Ruijter JM, Koeleman BPC, Schipper M *et al.*. Polymorphisms in human connexin40 gene promoter are associated with increased risk of hypertension in men. *J Hypertens* (2006) **24**: 325-330.

Firouzi M, Ramanna H, Kok B, Jongsma HJ, Koeleman BPC, Doevendans PA, Groenewegen WA & Hauer RNW. Association of human connexin40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation. *Circ Res* (2004) **95**: e29-33.

Flagg-Newton J, Simpson I & Loewenstein WR. Permeability of the cell-to-cell membrane channels in mammalian cell junction. *Science* (1979) **205**: 404-407.

Francis D, Stergiopoulos K, Ek-Vitorin JF, Cao FL, Taffet SM & Delmar M. Connexin diversity and gap junction regulation by pHi. *Dev Genet* (1999) **24**: 123-136.

Félix-Redondo FJ, Fernández-Bergés D, Calderón A, Consuegra-Sánchez L, Lozano L & Barrios V. Prevalence of left-ventricular hypertrophy by multiple electrocardiographic criteria in general population: Hermex study. *J Hypertens* (2012) **30**: 1460-1467.

Gabriel HD, Jung D, Bützler C, Temme A, Traub O, Winterhager E & Willecke K. Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J Cell Biol* (1998) **140**: 1453-1461.

Gollob MH, Jones DL, Krahn AD, Danis L, Gong X, Shao Q, Liu X, Veinot JP *et al.*. Somatic mutations in the connexin 40 gene (*GJA5*) in atrial fibrillation. *N Engl J Med* (2006) **354**: 2677-2688.

Goodenough DA. Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Characterization of the principal protein, connexin. *J Cell Biol* (1974) **61**: 557-563.

Goodenough DA. In vitro formation of gap junction vesicles. *J Cell Biol* (1976) **68**: 220-231.

Goodenough DA & Paul DL. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2003) **4**: 285-294.

Goodenough DA & Revel JP. A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. *J Cell Biol* (1970) **45**: 272-290.

Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR, Vliex S, van Langen IM, Sandkuijl L, Smits JPP, Hulsbeek M *et al.*. A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin40 genotype in familial atrial standstill. *Circ Res* (2003) **92**: 14-22.

Gu H, Smith FC, Taffet SM & Delmar M. High incidence of cardiac malformations in connexin40-deficient mice. *Circ Res* (2003) **93**: 201-206.

Haefliger J, Nicod P & Meda P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc Res* (2004) **62**: 345-356.

Hagendorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Luderitz B & Willecke K. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation* (1999) **99**: 1508-1515.

Hammond IW, Devereux RB, Alderman MH, Lutas EM, Spitzer MC, Crowley JS & Laragh JH. The prevalence and correlates of echocardiographic left ventricular hypertrophy among employed patients with uncomplicated hypertension. *J Am Coll Cardiol* (1986) **7**: 639-650.

Harris AL. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog Biophys Mol Biol* (2007) **94**: 120-143.

Hennemann H, Suchyna T, Lichtenberg-Fraté H, Jungbluth S, Dahl E, Schwarz J, Nicholson BJ & Willecke K. Molecular cloning and functional expression of mouse connexin40, a second gap junction gene preferentially expressed in lung. *J Cell Biol* (1992) **117**: 1299-1310.

Hombach S, Janssen-Bienhold U, Sohl G, Schubert T, Bussow H, Ott T, Weiler R & Willecke K. Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *Eur J Neurosci* (2004) **19**: 2633-2640.

Hwan Seul K & Beyer EC. Heterogeneous localization of connexin40 in the renal vasculature. *Microvasc Res* (2000) **59**: 140-148.

Janssen-Bienhold U, Trumpler J, Hilgen G, Schultz K, Muller LPDS, Sonntag S, Dedek K, Dirks P *et al.*. 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**: 363-374.

Jobs A, Schmidt K, Schmidt VJ, Lübke-meier I, van Veen TAB, Kurtz A, Willecke K & de Wit C. Defective Cx40 maintains Cx37 expression but intact Cx40 is crucial for conducted dilations irrespective of hypertension. *Hypertension* (2012) **60**: 1422-1429.

Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J & Nedergaard M. Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci* (2008) **28**: 4702-4711.

Kannel WB. Left ventricular hypertrophy as a risk factor in arterial hypertension. *Eur Heart J* (1992) **13 Suppl D**: 82-88.

Kanter HL, Saffitz JE & Beyer EC. Cardiac myocytes express multiple gap junction proteins. *Circ Res* (1992) **70**: 438-444.

Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF & Leigh IM. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* (1997) **387**: 80-83.

Kihara AH, de Castro LM, Moriscot AS & Hamassaki DE. Prolonged dark adaptation changes connexin expression in the mouse retina. *J Neurosci Res* (2006) **83**: 1331-1341.

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

Kruger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O *et al.*. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* (2000) **127**: 4179-4193.

Kumar NM & Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell* (1996) **84**: 381-388.

Lo CW & Gilula NB. Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo. *Cell* (1979) **18**: 399-409.

Loewenstein WR. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* (1981) **61**: 829-913.

Lorell BH & Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* (2000) **102**: 470-479.

Lübckemeier I, Machura K, Kurtz L, Neubauer B, Dobrowolski R, Schweda F, Wagner C, Willecke K *et al.*. The connexin40 A96S mutation causes renin-dependent hypertension. *J Am Soc Nephrol* (2011) **22**: 1031-1040.

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**: 14716-14723.

Milks LC, Kumar NM, Houghten R, Unwin N & Gilula NB. Topology of the 32-kd liver gap junction protein determined by site-directed antibody localizations. *EMBO J* (1988) **7**: 2967-2975.

Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, Najjar SS, Zhao JH *et al.*. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat Genet* (2009) **41**: 666-676.

Okuda H, Nishida K, Higashi Y & Nagasawa K. NAD(+) influx through connexin hemichannels prevents poly(ADP-ribose) polymerase-mediated astrocyte death. *Life Sci* (2013) **92**: 808-14.

Orellana JA, Froger N, Ezan P, Jiang JX, Bennett MVL, Naus CC, Giaume C & Sáez JC. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J Neurochem* (2011) **118**: 826-840.

Petersen MB & Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet* (2006) **69**: 371-392.

Pfenniger A, Wohlwend A & Kwak BR. Mutations in connexin genes and disease. *Eur J Clin Invest* (2011) **41**: 103-116.

Pfenniger A, van der Laan SW, Foglia B, Dunoyer-Geindre S, Haefliger J, Winnik S, Mach F, Pasterkamp G *et al.*. Lack of association between connexin40 polymorphisms and coronary artery disease. *Atherosclerosis* (2012) **222**: 148-153.

Robertson JD. The occurrence of a subunit pattern in the unit membranes of club endings in mauthner cell synapses in goldfish brains. *J Cell Biol* (1963) **19**: 201-221.

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

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

Revel JP & Karnovsky MJ. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* (1967) **33**: C7-C12.

Schillaci G, Verdecchia P, Porcellati C, Cuccurullo O, Cosco C & Perticone F. Continuous relation between left ventricular mass and cardiovascular risk in essential hypertension. *Hypertension* (2000) **35**: 580-586.

Schirmer H, Lunde P & Rasmussen K. Prevalence of left ventricular hypertrophy in a general population; The Tromsø Study. *Eur Heart J* (1999) **20**: 429-438.

Shelley J, Dedek K, Schubert T, Feigenspan A, Schultz K, Hombach S, Willecke K & Weiler R. Horizontal cell receptive fields are reduced in connexin57-deficient mice. *Eur J Neurosci* (2006) **23**: 3176-3186.

Simino J, Rao DC & Freedman BI. Novel findings and future directions on the genetics of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2012) **21**: 500-507.

Simon AM, Goodenough DA & Paul DL. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr Biol* (1998) **8**: 295-298.

Simon AM, Goodenough DA, Li E & Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* (1997) **385**: 525-529.

Sohl G & Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* (2004) **62**: 228-232.

Stout CE, Costantin JL, Naus CCG & Charles AC. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem* (2002) **277**: 10482-10488.

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

Söhl G, Nielsen PA, Eiberger J & Willecke K. Expression profiles of the novel human connexin genes hCx30.2, hCx40.1, and hCx62 differ from their putative mouse orthologues. *Cell Commun Adhes* (2003) **10**: 27-36.

The International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies *et al.*. Genetic Variants in Novel Pathways Influence Blood Pressure and Cardiovascular Disease Risk. *Nature* (2011) **478**: 103-109.

Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Gattobigio R, Zampi I, Reboldi G & Porcellati C. Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation* (1998) **97**: 48-54.

Wagner C, Jobs A, Schweda F, Kurtz L, Kurt B, Lopez MLS, Gomez RA, van Veen TAB *et al.*. Selective deletion of connexin40 in renin-producing cells impairs renal baroreceptor function and is associated with arterial hypertension. *Kidney Int* (2010) **78**: 762-768.

Wagner C, de Wit C, Kurtz L, Grunberger C, Kurtz A & Schweda F. Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ Res* (2007) **100**: 556-563.

Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M, Deutsch U & Söhl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* (2002) **383**: 725-737.

Wirka RC, Gore S, Van Wagoner DR, Arking DE, Lubitz SA, Lunetta KL, Benjamin EJ, Alonso A *et al.* A common connexin-40 gene promoter variant affects connexin-40 expression in human atria and is associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* (2011) **4**: 87-93.

Yeager M & Gilula NB. Membrane topology and quaternary structure of cardiac gap junction ion channels. *J Mol Biol* (1992) **223**: 929-948.

Zappalà A, Parenti R, La Delia F, Cicirata V & Cicirata F Expression of connexin57 in mouse development and in harmaline-tremor model. *Neuroscience* (2010) **171**: 1-11.

7. Kongressbeiträge & Auszeichnungen

7.1. Vorträge

XIV. Treffen der Ostsee-Physiologen, 08./09. Mai 2009, Greifswald

Identifikation von Cx40 und Cx57 in genomweiten Assoziationsstudien als Kandidatengene bei Hypertonie: Funktionelle Analyse

15. Westerländer Gespräch, 17.-19. September 2009, Westerland

Identifikation von Cx40 in genomweiter Assoziationsstudie als Kandidatengen bei Hypertonie: Funktionelle Analyse

Hypertonie 2009, 33. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V.

DHL[®] 19.-21. November 2009, Lübeck

Untersuchung des Connexin40-kodierenden *GJA5* als Kandidatengen bei Hypertonie im Menschen

Lübeck Workshop on Smooth Muscle Function, 14. Dezember 2009, Lübeck

The connexin40-coding gene *GJA5* as candidate gene for hypertension in humans

XV. Treffen der Ostsee-Physiologen, 09./10. Juli 2010, Lübeck

Funktionelle Analyse von Polymorphismen im Promotor von Connexin40 – Assoziation mit linksventrikulärer Hypertrophie und Bluthochdruck

9th World Congress for Microcirculation, 26.-28. September 2010, Paris, Frankreich

Enhanced endothelium-derived hyperpolarising factor-type dilations in TRPC1-deficient mice

2. Lübeck Workshop on Smooth Muscle Function, 20. Dezember 2010, Lübeck

TRPC1-deficient mice exhibit enhanced EDHF-type dilations

90th Annual Meeting of the German Physiological Society, 26.-29. März 2011, Regensburg
Loss of TRPC1 increases endothelium-derived hyperpolarising factor-type dilations
in mice

3. Lübeck Workshop on Smooth Muscle Function, 05. Dezember 2011, Lübeck
Impact of target genes for myocardial infarction identified in genome-wide
association studies on neointima formation in mice

XVII. Treffen der Ostsee-Physiologen, 04./05. Mai 2012, Rostock
Die Expression des endothelialen Proteins Cx37 ist abhängig von Cx40

Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V. – Annual Meeting, 27.-29.
September 2012, Mannheim
The presence of Connexin37 in endothelial cells depends crucially on Cx40 in mice
in vivo

4. Lübeck Workshop on Smooth Muscle Function, 10. Dezember 2012, Lübeck
Cyp17a1-deficient mice exhibit increased body weight and altered lipid metabolism
but are normotensive

Experimental Biology 2013, 20.-24. April 2013, Boston, MA, USA
Association of two polymorphisms in the Cx40 promoter with hypertension and left
ventricular hypertrophy

XVIII. Treffen der Ostsee-Physiologen, 24./25. Mai 2013, Greifswald
Cyp17a1-deficient mice exhibit enhanced body weight and fat deposition but are
normotensive

Council on Basic Cardiovascular Science (CBCS) Summer School on Cardiovascular
Sciences, 16.-20. Juni 2013, European Heart House, Sophia-Antipolis, Frankreich
Association of two polymorphisms in the Cx40 promoter with hypertension and left
ventricular hypertrophy

2nd Joint Meeting of the German Society for Microcirculation and Vascular Biology (GfMVB) and the Swiss Society for Microcirculation and Vascular Research (SSMVR), 26.-28. September 2013, Dresden

Cyp17a1-deficiency affects lipid metabolism without altering arterial blood pressure in mice

7.2. Poster

Uni im Dialog – Dritter Lübecker Doktorandentag 09./10. Juni 2009, Lübeck
Von der Maus zum Menschen: Identifikation einer neuen Ursache des Bluthochdrucks?

Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies, 27.-30. März 2010, Kopenhagen, Dänemark

Identification and functional evaluation of single nucleotide polymorphisms in the connexin40 (*GJA5* gene) promoter

Frontiers in Cardiovascular Biology 2010, 16.-19. Juli 2010, Berlin

Single nucleotide Polymorphisms within the connexin40 (*GJA5* gene) promoter directly affect its activity

Experimental Biology 2011, 9.-13. April 2011, Washington, DC, USA

TRPC1-deficiency amplifies EDHF-type dilations in mice

Uni im Dialog – Fünfter Lübecker Doktorandentag 18. Mai 2011, Lübeck

Take a *TRiP* to the arteries

91st Annual Meeting of the German Physiological Society, 22.-25. März 2012, Dresden

The metalloproteinase Adamts-7 is crucial for neointima formation after vessel injury in mice

Joint Meeting of the British Microcirculation Society and The Microcirculatory Society,
04.-06. Juli 2012, Oxford, UK

The presence of Connexin37 in endothelial cells depends crucially on Cx40 in mice
in vivo

Experimental Biology 2013, 20.-24. April 2013, Boston, MA, USA

Association of two polymorphisms in the Cx40 promoter with hypertension and left
ventricular hypertrophy

Council on Basic Cardiovascular Science (CBCS) Summer School on Cardiovascular
Sciences, 16.-20. Juni 2013, European Heart House, Sophia-Antipolis, Frankreich

Association of two polymorphisms in the Cx40 promoter with hypertension and left
ventricular hypertrophy

IUPS 2013, 21.-26. Juli 2013, Birmingham, UK

Normotension with enhanced body weight and fat deposition in mice deficient for
Cyp17a1

7.3. Auszeichnungen

Posterpreis, Uni im Dialog – Dritter Lübecker Doktorandentag 09./10. Juni 2009, Lübeck

Young Investigator Award, Hypertonie 2009, 33. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL[®] 19.-21. November 2009, Lübeck

Zweifach Graduate Student Travel Award of The Microcirculatory Society Inc., Spring Microcirculatory Society Meeting with Experimental Biology 2011, 9.-13. April 2011, Washington, DC

Young Investigator Preis der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie 2012, 29. September 2012, Mannheim

Zweifach Graduate Student Travel Award of The Microcirculatory Society Inc., Spring Microcirculatory Society Meeting with Experimental Biology 2013, 20.-24. April 2013, Boston, MA

8. Publikationen

8.1. Beiträge zu wissenschaftlichen Journalen

Amplification of EDHF-type vasodilatations in TRPC1-deficient mice.

Schmidt K, Dubrovskaja G, Nielsen G, Fesüs G, Uhrenholt TR, Hansen PB, Gudermann T, Dietrich A, Gollasch M, de Wit C, Köhler R. *Br J Pharmacol*. 2010 Dec;161(8):1722-33.

Defective Cx40 maintains Cx37 expression but intact Cx40 is crucial for conducted dilations irrespective of hypertension.

Jobs A, **Schmidt K**, Schmidt VJ, Lübckemeier I, van Veen TA, Kurtz A, Willecke K, de Wit C. *Hypertension*. 2012 Dec; 60(6):1422-9.

Activation of KCa 3.1 by SKA-31 induces arteriolar dilation and lowers blood pressure in normo- and hypertensive connexin40-deficient mice.

Radtke J, **Schmidt K**, Wulff H, Köhler R, de Wit C. *Br J Pharmacol*. 2013 Jun 4.

8.2. Abstract-Publikationen

TRPC1-deficiency amplifies EDHF-type dilations in mice

Kjestine Schmidt, Galyna Dubrovskaya, Gorm Nielsen, Gabor Fesus, Torben R Uhrenholt, Pernille B Hansen, Thomas Gudermann, Alexander Dietrich, Maik Gollasch, Cor de Wit and Ralf Köhler. *The FASEB Journal*. 2011;25:814.10

Investigation of the coronary artery disease risk gene ADAMTS-7 in a murine knockout model

Zouhair Aherrahrou, Thorsten Kessler, **Kjestine Schmidt**, Cor de Wit, Heribert Schunkert & Jeanette Erdmann. NGFN Abstract Book 2011, O-II-4, 4th Annual Meeting of NGFN-Plus and NGFN-Transfer in the Program of Medical Genome Research, Urania, Berlin

Knockout of the Coronary Artery Disease Risk Gene Adamts-7 Inhibits Neointima Formation and Stenosis of Arteries.

Zouhair Aherrahrou, Thorsten Kessler, **Kjestine Schmidt**, Cor de Wit, Heribert Schunkert, Jeanette Erdmann. *Circulation*. 2011; 124: A15199

THE METALLOPROTEINASE ADAMTS-7 IS CRUCIAL FOR NEOINTIMA FORMATION AFTER VESSEL INJURY IN MICE

Schmidt K., Aherrahrou Z., Kessler T., Schunkert H., Erdmann J., de Wit C.

Acta Physiologica 2012; Volume 204, Supplement 689 :P178

Deletion of the coronary artery disease risk gene *ADAMTS-7* prevents structural remodelling of injured vessels without effects on metabolic parameters or lipid deposition.

T. Keßler, Z. Aherrahrou, **K. Schmidt**, C. de Wit, H. Schunkert, J. Erdmann

Clin Res Cardiol 101, Suppl 1, April 2012, V1563

Investigating coronary artery disease risk genes in murine knockout models: The Cardiovascular Gene Knockout Project (CardioGen KO-Project)

Z. Aherrahrou, T. Keßler, J. Freyer, P. M. Rumpf, R. Aherrahrou, J. Al-Hasani, **K. Schmidt**, N. Alenina, M. Bader, C. de Wit, H. Schunkert, J. Erdmann

Clin Res Cardiol 101, Suppl 1, April 2012, V1567

Impaired neointima formation in mice lacking the coronary artery disease risk gene ADAMTS-7 after cessation of blood flow

T. Kessler, Z. Aherrahrou, **K. Schmidt**, C. DeWit, H. Schunkert, J. Erdmann.

Eur Heart J (2012) 33 (suppl 1): 941-1105.

Diverse Functional Effects of GWAs CAD Risk Genes in Mice: CardioGENE KO-Project.

Zouhair Aherrahrou, Thorsten Kessler, Jennifer Freyer, Moritz P Rumpf, Redouane Aherrahrou, Jaafar Al-Hasani, **Kjestine Schmidt**, Evanthia Mergia, Natalia Alenina, Michael Bader, Cor de Wit, Heribert Schunkert, Jeanette Erdmann.

Circulation. 2012; 126: A15390

Cyp17a1 deficient mice display increased body weight, visceral/subcutaneous fat deposition and altered lipid metabolism

Zouhair Aherrahrou, Redouane Aherrahrou, **Kjestine Schmidt**, Thorsten Kessler, Jaafar Al-Hasani, Jennifer Freyer, Natalia Alenina, Michael Bader, Cor de Wit, Heribert Schunkert & Jeanette Erdmann. NGFN Abstract Book 2012, O-V-5, 5th Annual Meeting of NGFN-Plus and NGFN-Transfer in the Program of Medical Genome Research, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg

Diverse functional effects of genetic deletion of CAD risk genes in mice: CardioGENE KO-Project

Zouhair Aherrahrou, Thorsten Kessler, Jennifer Freyer, Philipp M. Rumpf, Redouane Aherrahrou, Jaafar Al-Hasani, **Kjestine Schmidt**, Natalia Alenina, Michael Bader, Cor de Wit, Heribert Schunkert & Jeanette Erdmann.

NGFN Abstract Book 2012, P-V-16, 5th Annual Meeting of NGFN-Plus and NGFN-Transfer in the Program of Medical Genome Research, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg

Deletion of the CAD/Hypertension risk gene Cyp17a1 in mice display increased body weight, visceral/subcutaneous fat deposition and altered lipid metabolism

Z. Aherrahrou, R. Aherrahrou, **K. Schmidt**, T. Kessler, J. Al-Hasani, J. Freyer, N. Alenina, M. Bader, C. de Wit, H. Schunkert, J. Erdmann

Clin Res Cardiol 102, Suppl 1, April 2013, P1085

Association of two polymorphisms in the Cx40 promoter with hypertension and leftventricular hypertrophy

Kjestine Schmidt, Frank J Kaiser, Heribert Schunkert, Jeanette Erdmann and Cor de Wit

The FASEB Journal. 2013;27:678.10

9. Anhang

9.1. Gelelektrophorese-Bilder

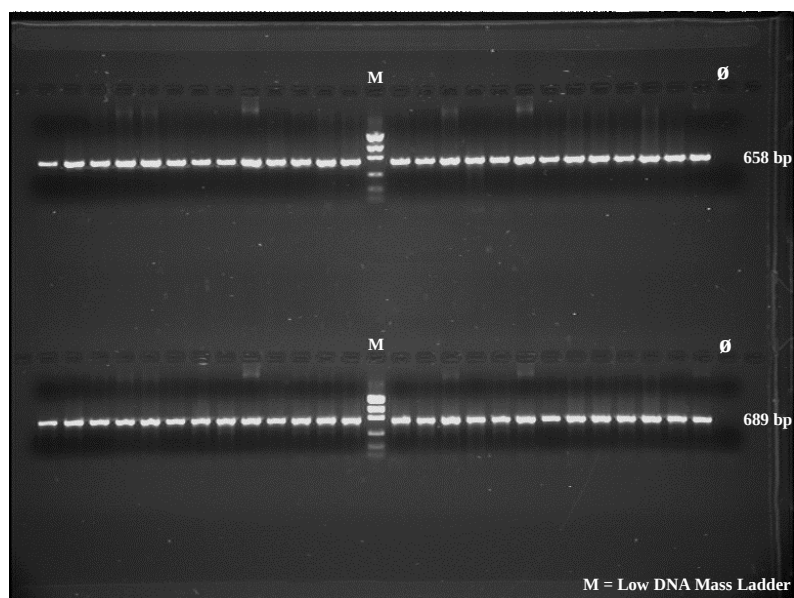


Abbildung 19: PCR der codierenden Region von *GJA5* am Beispiel der Probanden 1-26 mit zwei verschiedenen Primerpaaren (Primerpaar 1 oben = 658 bp Fragment; Primerpaar 2 unten = 689 bp Fragment).

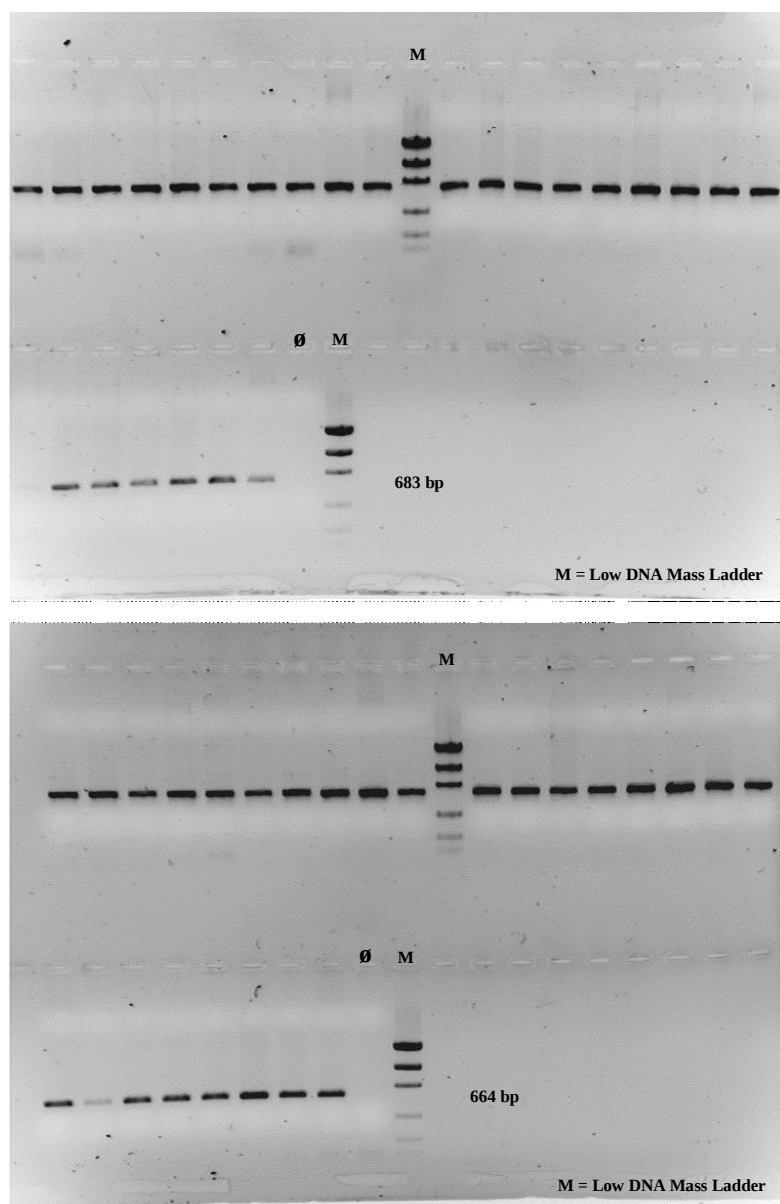


Abbildung 20: PCR der Exon 1 umgebenden Region von *GJA5* am Beispiel der Probanden 1-26 mit zwei verschiedenen Primerpaaren (Primerpaar 1 = 683 bp Fragment oberes Gel; Primerpaar 2 = 664 bp Fragment unteres Gel).

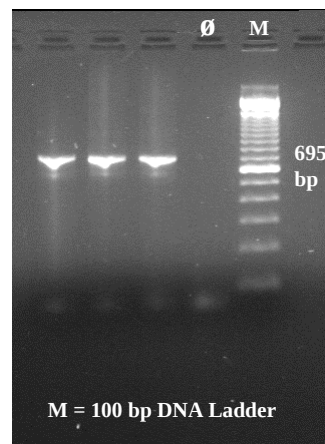


Abbildung 21: PCR der Exon 1 umgebenden Region von GJA5 mit Primern mit Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XhoI* eines Probanden mit dem homozygot seltenen Genotyp (-44 AA, +71 GG, Lane 1), eines Probanden mit dem homozygot häufigen Genotyp (-44 GG, +71 AA, Lane 2) und eines Probanden mit vier heterozygot veränderten Positionen (-451 CT, -202 AG, -21 GC, +130 GA, Lane 3). Es ergab sich eine Fragmentgröße von 695 bp.

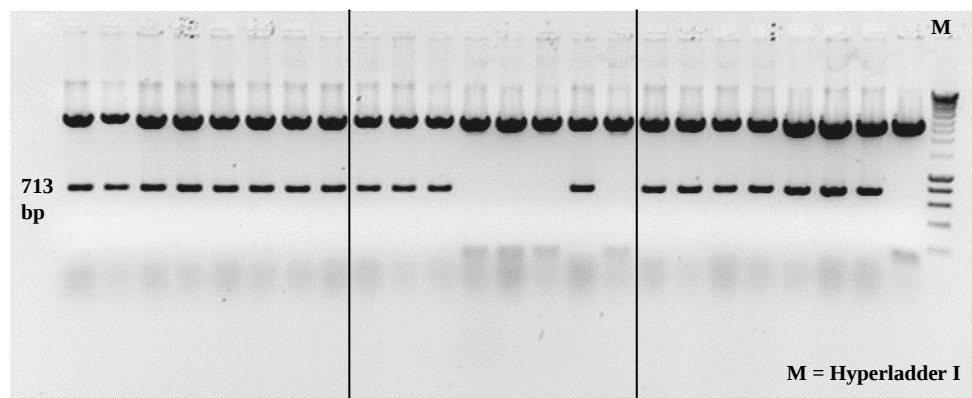


Abbildung 22: *EcoRI* Restriktionsverdau der Plasmidpräparationen (Mini) der pGEM Klone mit der Sequenz der Exon 1 umgebenden Region von *GJA5* mit seltenen Allelen (-44 A, +71 G, Lane 1-8), mit häufigen Allelen (-44 G, +71 A, Lane 9-16) und mit vier veränderten Positionen (-451 T, -202 G, -21 C, +130 A, Lane 17-24) vor der Sequenzierung einzelner Klone. Der Restriktionsverdau ergab eine erwartete Fragmentgröße von 713 bp.

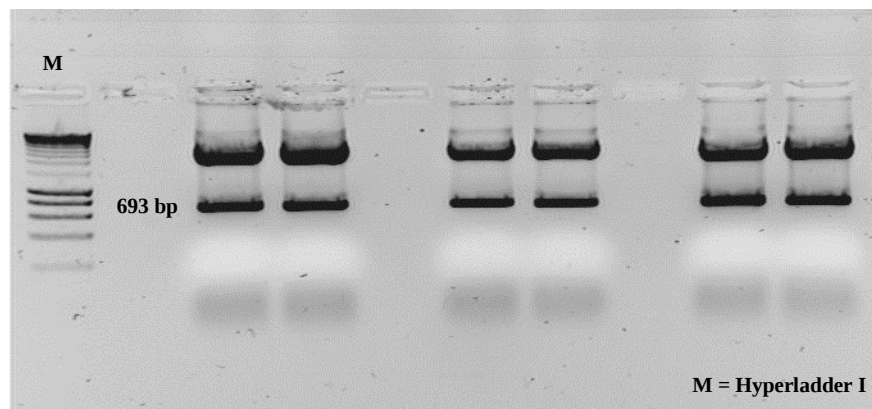


Abbildung 23: *Hind*III / *Xho*I Restriktionsverdau der sequenzierten pGEM Klone mit der Sequenz der Exon 1 umgebenden Region von *GJA5* mit seltenen Allelen (-44 A, +71 G, Lane 3, 4), mit häufigen Allelen (-44 G, +71 A, Lane 6, 7) und mit vier veränderten Positionen (-451 T, -202 G, -21 C, +130 A, Lane 9, 10) für anschließende Fragmentisolierung und Klonierung in den *Hind*III / *Xho*I gespaltenen Vektor pGL4.10[*luc2*]. Die erwartete Fragmentgröße lag bei 693 bp.

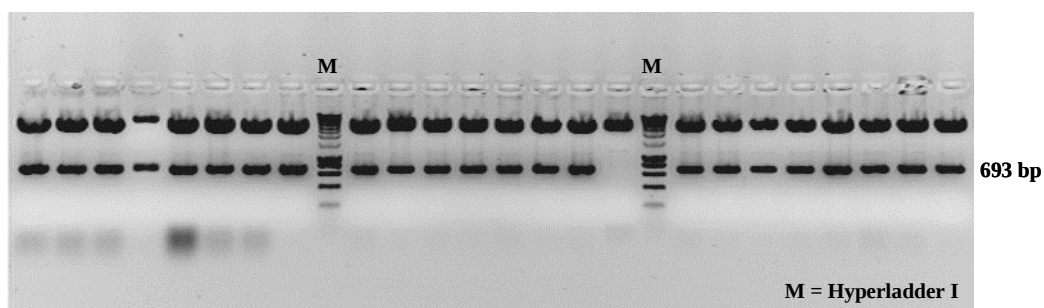


Abbildung 24: *Hind*III / *Xho*I Restriktionsverdau einiger pGL4.10[*luc2*] Klone mit der Sequenz der Exon 1 umgebenden Region von *GJA5* mit seltenen Allelen (-44 A, +71 G, Lane 1-8), mit häufigen Allelen (-44 G, +71 A, Lane 10-17) und mit vier veränderten Positionen (-451 T, -202 G, -21 C, +130 A, Lane 19-26) zur Kontrolle der inserierten Sequenzen. Das erwartete Fragment war 693 bp groß.

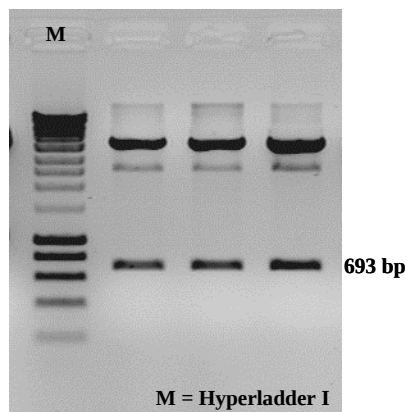


Abbildung 25: *Hind*III / *Xho*I Restriktionsverdau von reiner Plasmid-DNA aus Midi-Präparationen der drei pGL4.10[*luc2*] Klone mit der Sequenz der Exon 1 umgebenden Region von *GJA5* mit seltenen Allelen (-44 A, +71 G, Lane 2), mit häufigen Allelen (-44 G, +71 A, Lane 3) und mit vier veränderten Positionen (-451 T, -202 G, -21 C, +130 A, Lane 4) zur Kontrolle der inserierten Sequenzen vor der Transfektion von Zellen. Das erwartete Fragment war 693 bp groß.

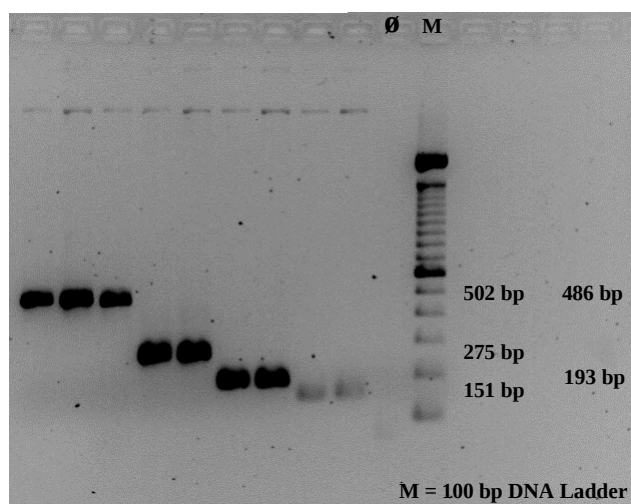


Abbildung 26: PCR an reiner Plasmid-DNA pGL4.10[*luc2*] mit der inserierten Sequenz mit den häufigen oder den seltenen Allelen an Position -44 bp und +71 bp zur Verkürzung der putativen Promotorregion von *GJA5*. Es wurden Primer verwendet, die eine *Hind*III- bzw. *Xho*I- Schnittstelle aufwiesen. Die PCR ergab ein Fragment für das 2. Konstrukt mit häufigem/seltenem Allel einer Größe von 502 bp (Lane 1, 2), ein Fragment für das 3. Konstrukt einer Größe von 486 bp (Lane 3), ein Fragment für das 4. Konstrukt mit einem häufigen/seltenen Allel einer Größe von 274 bp (Lane 4, 5), ein Fragment für das 5. Konstrukt mit häufigen/seltenen Allelen einer Größe von 193 bp (Lane 6, 7) und ein Fragment für das 6. Konstrukt mit einem häufigen/seltenen Allel einer Größe von 151 bp (Lane 8, 9).

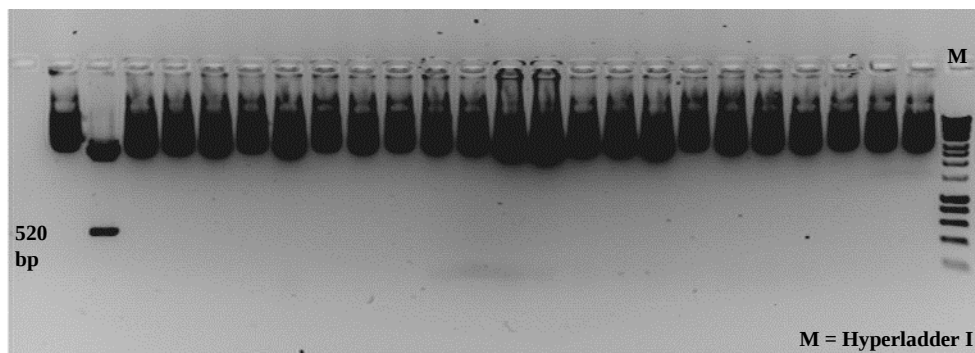


Abbildung 27: *Eco*RI Restriktionsverdau der Plasmidpräparationen (Mini) der pGEM Klone mit dem 2. Konstrukt mit häufigem Allel an Position -44 bp (520 bp).

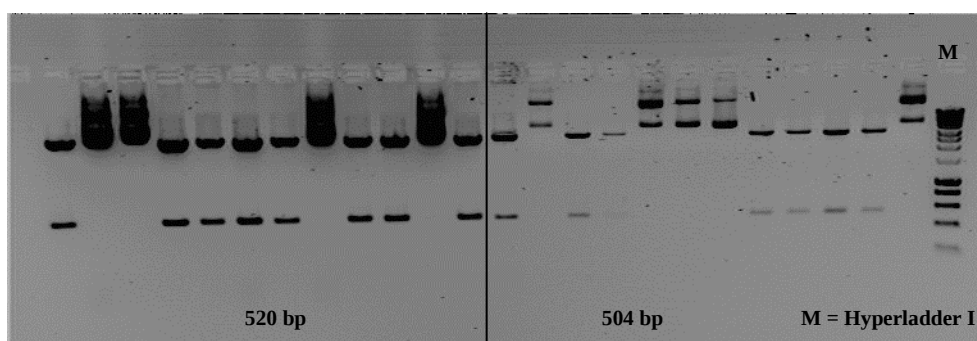


Abbildung 28: *Eco*RI Restriktionsverdau der Plasmidpräparationen (Mini) der pGEM Klone mit dem 2. Konstrukt mit seltenem Allel an Position -44 bp (520 bp, Lane 1-12) und der pGEM Klone mit dem 3. Konstrukt (504 bp, Lane 13-24).

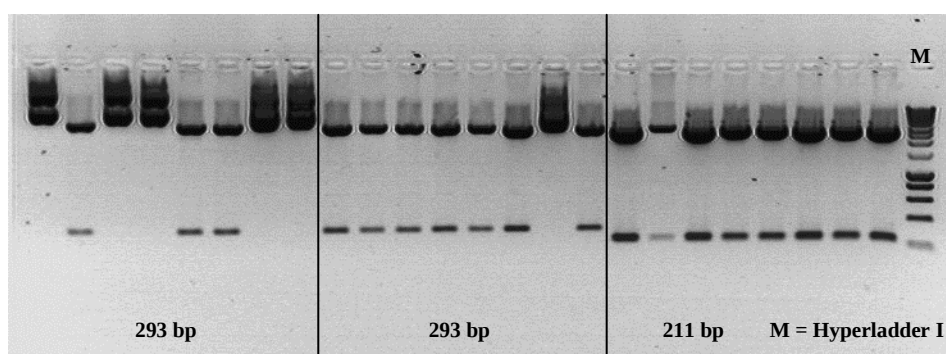


Abbildung 29: *Eco*RI Restriktionsverdau der Plasmidpräparationen (Mini) der pGEM Klone mit dem 4. Konstrukt mit häufigem Allel an Position -44 bp (293 bp, Lane 1-8), der pGEM Klone mit dem 4. Konstrukt mit seltenem Allel an Position -44 bp (293 bp, Lane 9-16) und der pGEM Klone mit dem 5. Konstrukt mit häufigen Allelen an Position -44 bp und +71 bp (211 bp, Lane 17-24).

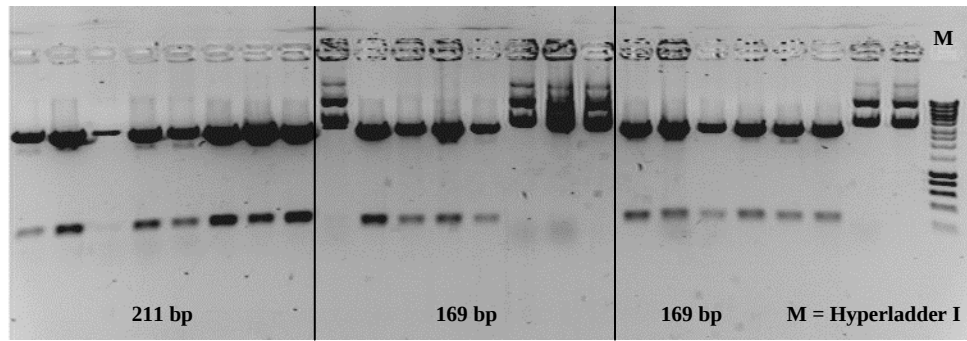


Abbildung 30: *EcoRI* Restriktionsverdau der Plasmidpräparationen (Mini) der pGEM Klone mit dem 5. Konstrukt mit seltenen Allelen an Position -44 bp und +71 bp (211 bp, Lane 1-8), der pGEM Klon mit dem 6. Konstrukt mit häufigem Allel an Position +71 bp (169 bp, Lane 9-16) und der pGEM Klon mit dem 6. Konstrukt mit seltenem Allel an Position +71 bp (169 bp, Lane 17-24).

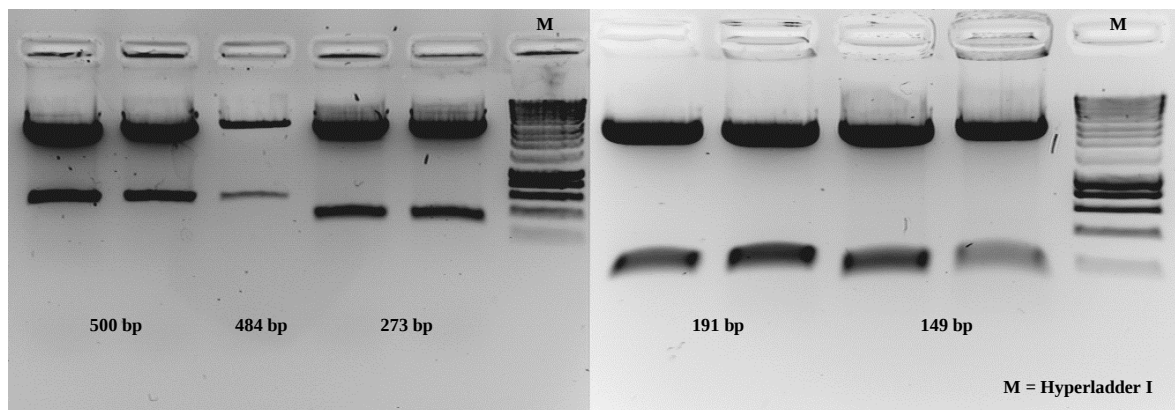


Abbildung 31: *HindIII* / *XhoI* Restriktionsverdau der sequenzierten pGEM Klone mit den unterschiedlich langen Sequenzen der Exon 1 umgebenden Region von *GJA5*. 2. Konstrukt mit häufigen/seltenen Allelen und einer Fragmentgröße von 500 bp (Lane 1, 2, links), ein Fragment des 3. Konstrukts mit einer Größe von 484 bp (Lane 3, links), ein Fragment für das 4. Konstrukt mit einem häufigen/seltenen Allel und einer Größe von 273 bp (Lane 4, 5, links), ein Fragment des 5. Konstrukts mit häufigen/seltenen Allelen einer Größe von 191 bp (Lane 1, 2, rechts) und ein Fragment des 6. Konstrukts mit einem häufigen/seltenen Allel einer Größe von 149 bp (Lane 3, 4, rechts). Die Fragmente wurden anschließend aus dem Gel extrahiert und in den *HindIII* / *XhoI* gespaltenen Vektor pGL4.10[*luc2*] inseriert.

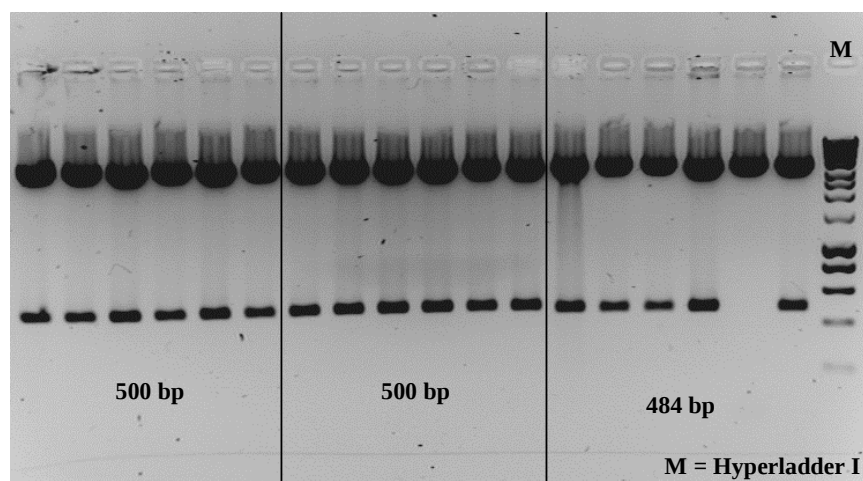


Abbildung 32: *HindIII* / *XhoI* Restriktionsverdau einiger pGL4.10[*luc2*] Klone mit dem 2. Konstrukt mit häufigem (500 bp, Lane 1-6) und seltenem Allel (500 bp, Lane 7-12) an Position -44 bp und einiger pGL4.10[*luc2*] Klone mit dem 3. Konstrukt (484 bp, Lane 13-18).

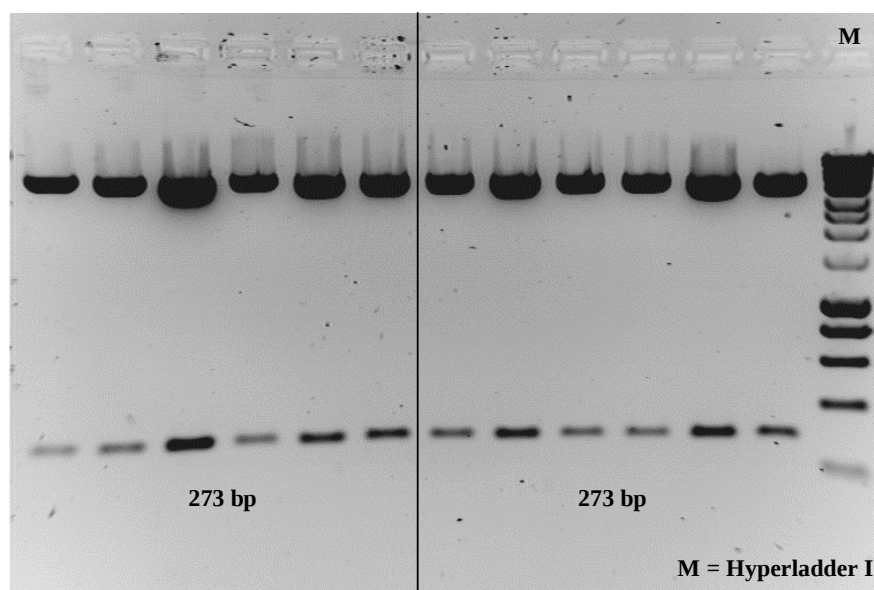


Abbildung 33: *HindIII* / *XhoI* Restriktionsverdau einiger pGL4.10[*luc2*] Klone mit dem 4. Konstrukt mit häufigem (273 bp, Lane 1-6) und seltenem Allel (273 bp, Lane 7-12) an Position -44 bp.

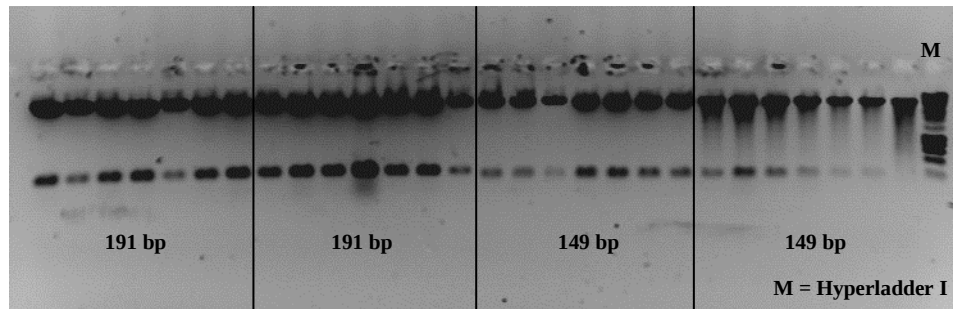


Abbildung 34: *Hind*III / *Xho*I Restriktionsverdau einiger pGL4.10[*luc2*] Klone mit dem 5. Konstrukt mit häufigen (191 bp, Lane 1-7) und seltenen Allelen (191 bp, Lane 8-14) an Position -44 bp und +71 bp und einiger pGL4.10[*luc2*] Klone mit dem 6. Konstrukt mit häufigem (149 bp, Lane 15-21) und seltenem Allel (149 bp, Lane 22-28) an Position +71 bp.

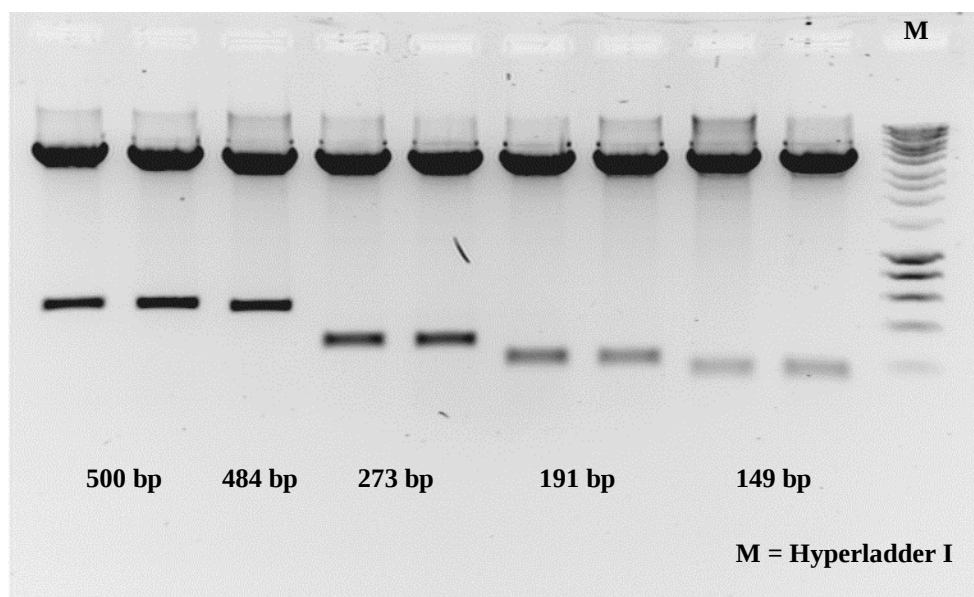


Abbildung 35: *Hind*III / *Xho*I Restriktionsverdau von reiner Plasmid-DNA aus Midi-Präparationen der verschiedenen pGL4.10[*luc2*] Klone Konstrukt 2-6 mit den unterschiedlich langen Sequenzen der Exon 1 umgebenden Region von *GJA5* mit häufigen und seltenen Allelen zur Kontrolle der inserierten Sequenzen vor der Transfektion von Zellen (2. Konstrukt: Lane 1, 2; 3. Konstrukt: Lane 3; 4. Konstrukt: Lane 4, 5; 5. Konstrukt: Lane 6, 7; 6. Konstrukt: Lane 8, 9).

9.2. Abkürzungsverzeichnis

A

A. dest	destilliertes Wasser (Aqua destillatum)
ad	auffüllen auf (lat.: zu, nach)
ATP	Adenosintriphosphat

B

C

cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cx	Connexin

D

ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphate (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTO	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DSI	Fa. Data Sciences International
dTTP	Desoxythymidintriphosphat

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol

F

FA	Formaldehyd
FCS	Fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)

G

GJ Gap junctions

H

HeLa Zellen Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms von Henrietta Lacks

HMEC-1 Zellen engl.: human microvascular endothelial cells

HPLC High Performance Liquid Chromatography

H₂O Wasser

I

IP₃ Inositol-1,4,5-triphosphat

J**K**

K-Acetat (CH₃COOK) Kaliumacetat

KH₂PO₄ Kaliumdihydrogenphosphat

KCl Kaliumchlorid

K₄Fe(CN)₆ x 3 H₂O Kaliumhexacyanoferrat II

K₃Fe(CN)₆ Kaliumhexacyanoferrat III

KG Körpergewicht

L

LB Luria-Bertani Medium für *E. coli*

M

Mg²⁺ Magnesium

MgCl₂ x 6 H₂O Magnesiumchlorid-Hexahydrat

N

Na₂ EDTA Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat

NaCl Natriumchlorid

Na₂HPO₄ x 2 H₂O di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat

NaOH Natriumhydroxid

O

O₂ Sauerstoff

OH-Gruppe Hydroxylgruppe

P

P1, 2 bzw. 3 Puffer1, 2 bzw. 3

PBS phosphatgepufferte Salzlösung
(engl. phosphate buffered saline)

Q

R

® registrierte Warenmarke

RT Raumtemperatur

S

ssDNA einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure

SDS Natriumdodecylsulfat (engl.: Sodium dodecyl sulfate)

SNP engl.: single nucleotide polymorphism

T

TAE Puffer Tris-Acetat-EDTA Puffer

Taq DNA Polymerase DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus*

TBE Puffer Tris-Borsäure-EDTA Puffer

™ unregistrierte Warenmarke (engl.: Trade Mark)

U

ÜN über Nacht

UV-Licht ultraviolettes Licht

V

v/v Konzentrationsangabe: volume per volume

W

w/v Konzentrationsangabe: weight per volume

X

X-Gal 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid

Y**Z**

9.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Topologie von Connexinen (aus Kumar & Gilula, 1996).....	7
Abbildung 2: Möglicher Aufbau der interzellulären Kanäle (aus Kumar & Gilula, 1996). 8	
Abbildung 3: Verteilung der Connexin Isoformen innerhalb des Herzens	9
Abbildung 4: Lage des Katheters in der <i>Arteria carotis communis</i> und des Druckabnehmers in der Maus.....	34
Abbildung 5: Hydrolyse von X-Gal durch die β -Galaktosidase. (www.tcichemicals.com).	35
Abbildung 6: Biolumineszente Reaktionen katalysiert von der Firefly und Renilla Luciferase (Promega)	46
Abbildung 7: Telemetrische Messung des arteriellen Blutdruckes und der Herzfrequenz.	49
Abbildung 8: Mittelwerte des systolischen, mittleren und diastolischen arteriellen Druckes und der Herzfrequenz.	50
Abbildung 9: β -Galaktosidasefärbung der Retina.	52
Abbildung 10: β -Galaktosidasefärbung der Aorta und des Musculus cremasters. β -Galaktosidasefärbung und HE-Färbung des Herzens.	53
Abbildung 11: β -Galaktosidasefärbung und HE-Färbung eines mesenterialen Lymphknotens, der Milz und der Leber.	54
Abbildung 12: β -Galaktosidasefärbung und HE-Färbung der Lunge, der Niere und des Oesophagus.	55
Abbildung 13: Genomische Anordnung des humanen Cx40-codierenden Gens <i>GJA5</i> mit SNP im Intron von <i>GJA5</i>	56
Abbildung 14: Genomische Anordnung des humanen Cx40-codierenden Gens <i>GJA5</i> mit SNP im Intron von <i>GJA5</i> und den SNPs an Position -44 und +71 bp. .	58
Abbildung 15: Einzelsequenzen zweier Probanden um die Region -44 bp und +71 bp des Gens <i>GJA5</i>	59
Abbildung 16: Reporteragen-Assays. Relative Promotoraktivität einer 683 bp umfassenden Sequenz in HeLa und HMEC-1 Zellen.....	65
Abbildung 17: Schematische Darstellung des für Cx40-codierenden Gens <i>GJA5</i> und der in Reporteragen-Assays verwendeten Konstrukte 1-6.	67

Abbildung 18: Relative Promotoraktivität von sechs verschieden langen Cx40-Sequenzen bestimmt nach Transfektion in HeLa-Zellen.	68
Abbildung 19: PCR der codierenden Region von <i>GJA5</i>	100
Abbildung 20: PCR der Exon 1 umgebenden Region von <i>GJA5</i>	101
Abbildung 21: PCR der Exon 1 umgebenden Region von <i>GJA5</i> mit Primern mit Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.	102
Abbildung 22: <i>EcoRI</i> Restriktionsverdau der Plasmidpräparationen (Mini) der pGEM Klone mit der Sequenz der Exon 1 umgebenden Region von <i>GJA5</i>	102
Abbildung 23: <i>HindIII</i> / <i>XhoI</i> Restriktionsverdau der sequenzierten pGEM Klone mit der Sequenz der Exon 1 umgebenden Region von <i>GJA5</i>	103
Abbildung 24: <i>HindIII</i> / <i>XhoI</i> Restriktionsverdau einiger pGL4.10[<i>luc2</i>] Klone mit der Sequenz der Exon 1 umgebenden Region von <i>GJA5</i>	103
Abbildung 25: <i>HindIII</i> / <i>XhoI</i> Restriktionsverdau von reiner Plasmid-DNA aus Midi-Präparationen der drei pGL4.10[<i>luc2</i>] Klone mit der Sequenz der Exon 1 umgebenden Region von <i>GJA5</i>	104
Abbildung 26: PCR an reiner Plasmid-DNA pGL4.10[<i>luc2</i>] mit der inserierten Sequenz mit den häufigen oder den seltenen Allelen zur Verkürzung der putativen Promotorregion von <i>GJA5</i>	104
Abbildung 27: <i>EcoRI</i> Restriktionsverdau der Plasmidpräparationen (Mini) der pGEM Klone mit dem 2. Konstrukt mit häufigem Allel an Position -44 bp.	105
Abbildung 28: <i>EcoRI</i> Restriktionsverdau der Plasmidpräparationen (Mini) der pGEM Klone mit dem 2. Konstrukt mit seltenem Allel an Position -44 bp und der pGEM Klone mit dem 3. Konstrukt.	105
Abbildung 29: <i>EcoRI</i> Restriktionsverdau der Plasmidpräparationen (Mini) der pGEM Klone mit dem 4. Konstrukt mit häufigem Allel an Position -44 bp, der pGEM Klone mit dem 4. Konstrukt mit seltenem Allel an Position -44 und der pGEM Klone mit dem 5. Konstrukt mit häufigen Allelen an Position -44 bp und +71 bp.	105
Abbildung 30: <i>EcoRI</i> Restriktionsverdau der Plasmidpräparationen (Mini) der pGEM Klone mit dem 5. Konstrukt mit seltenen Allelen an Position -44 bp und +71 bp, der pGEM Klone mit dem 6. Konstrukt mit häufigem Allel an Position +71 bp und der pGEM Klone mit dem 6. Konstrukt mit seltenem Allel an Position +71 bp.	106

Abbildung 31: <i>Hind</i> III / <i>Xho</i> I Restriktionsverdau der sequenzierten pGEM Klone mit den sechs unterschiedlich langen Sequenzen der Exon 1 umgebenden Region von <i>GJA5</i>	106
Abbildung 32: <i>Hind</i> III / <i>Xho</i> I Restriktionsverdau einiger pGL4.10[<i>luc2</i>] Klone mit dem 2. Konstrukt mit häufigem und seltenem Allel an Position -44 bp und einiger Klone mit dem 3. Konstrukt.....	107
Abbildung 33: <i>Hind</i> III / <i>Xho</i> I Restriktionsverdau einiger pGL4.10[<i>luc2</i>] Klone mit dem 4. Konstrukt mit häufigem und seltenem Allel an Position -44 bp. ..	107
Abbildung 34: <i>Hind</i> III / <i>Xho</i> I Restriktionsverdau einiger pGL4.10[<i>luc2</i>] Klone mit dem 5. Konstrukt mit häufigen und seltenen Allelen an Position -44 bp und +71 bp und einiger mit dem 6. Konstrukt mit häufigem und seltenem Allel an Position +71 bp.....	108
Abbildung 35: <i>Hind</i> III / <i>Xho</i> I Restriktionsverdau von reiner Plasmid-DNA aus Midi-Präparationen der verschiedenen pGL4.10[<i>luc2</i>] Klone Konstrukt 2-6. ...	108

9.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung der Blutdruckdaten entsprechend der DHL.	4
Tabelle 2: Häufigkeiten der Cx40 Genotypen in der Gesamtheit der untersuchten Probanden und in den geschlechterspezifischen Gruppen.	62

10. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Cor de Wit, der mir die Chance und das Vertrauen gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe viele neue Methoden zu erlernen und kritisch zu beurteilen, um mit diesen verschiedenste Projekte selbstständig zu bearbeiten. Die Vielfältigkeit des Arbeitens in seiner Arbeitsgruppe und in Zusammenarbeit mit anderen Institutionen sorgte für Freude und Motivation. Er hat mich stets herausgefordert, und auch wenn das Wasser manchmal sehr kalt war, habe ich viel für das Leben gelernt und dies mit seiner Unterstützung. Zudem möchte ich für das Ermöglichen der zahlreichen Kongressteilnahmen danken.

Ebenfalls besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann für die Bereitstellung der GWAS Daten und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Frank Kaiser für die freundliche Aufnahme im Institut für Humangenetik. Ohne Ihre Unterstützung, Anregungen und Diskussionen hätten diese Projekte nicht durchgeführt werden können.

Ein großes Dankeschön möchte ich Frau Rita Meuer aussprechen. Sie hat mich in allen Höhen und Tiefen durch die letzten Jahre begleitet. Nicht nur ihre hervorragende technische Assistenz sondern auch ihre Menschlichkeit und ihr Verständnis haben mich unterstützt und gestärkt. Wenn es keine Zufälle gibt, dann sollte dies wirklich so sein.

Herrn Dr. rer. nat. Markus Böttcher danke ich für die grenzenlose Hilfsbereitschaft und Freundschaft. Wie ist es nur möglich, dass es Menschen gibt, die annähernd jedes Problem lösen, jedes Gerät zum Funktionieren bringen und immer da sind, wenn man sie braucht? Herzlichen Dank, aber die Zeit unseres Büro-WG-Lebens war einfach zu kurz. Zudem möchte ich Herrn Dr. med. Volker Schmidt danken, der mir mit viel Geduld und großer Sorgfalt gezeigt hat, wie man eine Maus für die Intravitalmikroskopie operiert, und Herrn Alexander Jobs, für die Einweisung in die Blutdruckmessung bei Mäusen. Vielen Dank für den guten Start in der Arbeitsgruppe.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, wie schön, dass es Euch gibt. Obwohl ihr nah und fern seid, ihr glaubt an mich und seid für mich da, auch wenn es nicht immer so einfach ist. Tausend Dank.