

Trophoblast-Stammzellen als Modell zur Analyse der Connexin vermittelten Signalwege in der Plazentaentwicklung der Maus

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Mark Kibschull

aus Essen

April 2003

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. E. Winterhager

2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. B. Opalka

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Thomale

Tag der mündlichen Prüfung: 6.8.2003

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG.....</u>	1
1.1	DIE PLAZENTAENTWICKLUNG DER MAUS	1
1.2	DIE INTERZELLULÄRE KOMMUNIKATION ÜBER GAP JUNCTIONS.....	4
1.3	CONNEXINE IN DER PLAZENTAENTWICKLUNG DER MAUS	7
1.4	DIFFERENZIERUNG ENTLANG DER TROPHOBLASTZELLINIE	9
1.4.1	FRÜHE TROPHOBLASTZELLINIE.....	9
1.4.2	EKTOPLAZENTARKONUS/SPONGIOTROPHOBLAST	10
1.4.3	TROPHOBLAST-RIESENZELLEN	11
1.4.4	LABYRINTH	11
1.4.5	TROPHOBLAST-STAMMZELLEN.....	12
1.5	ZIELSETZUNG	13
2	<u>MATERIAL UND METHODEN.....</u>	15
2.1	MATERIAL	15
2.1.1	CHEMIKALIEN, ENZYME UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	15
2.1.2	KITS	16
2.1.3	ANTIKÖRPER	17
2.1.4	BAKTERIENSTÄMME	17
2.1.5	HÄUFIG VERWENDETE LÖSUNGEN	17
2.1.6	KULTURMEDIEN	18
2.1.7	OLIGONUKLEOTIDE.....	18
2.1.8	VEKTOREN	19
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	21
2.2.1	MENGENBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	21
2.2.2	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE ZUR AUFTRENNUNG VON DNA.....	21
2.2.3	DENATURIERENDE RNA-GELELEKTROPHORESE.....	21
2.2.4	ISOLIERUNG VON DNA FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELN.....	22
2.2.5	ETHANOLFÄLLUNG VON NUKLEINSÄUREN.....	22
2.2.6	RESTRIKTION VON DNA.....	22
2.2.7	LIGATION	23
2.2.8	CHEMISCHE TRANSFORMATION	23
2.2.9	ELEKTROTRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> -ZELLEN.....	23
2.2.10	PRÄPARATION VON PLASMID DNA IM ANALYTISCHEN MAßSTAB.....	24
2.2.11	MAXI-PRÄPARATION VON PLASMID-DNA.....	25
2.2.12	ISOLATION VON GENOMISCHER DNA AUS GEWEBEN UND SÄUGERZELLEN.....	25
2.2.12.1	DNA-Isolation aus Schwanzspitzen und Ohrbiopsien	25
2.2.12.2	DNA-Isolation aus Zellkulturen	25
2.2.13	TRANSFER VON NUKLEINSÄUREN AUF NYLONMEMBRANEN	26
2.2.14	RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA	26
2.2.15	HYBRIDISIERUNG MIT EINER RADIOAKTIVEN DNA-SONDE	26
2.2.16	SEQUENZIERUNG	27
2.2.17	POLYMERASE-KETTENREAKTION	27
2.2.18	RT-PCR-ANALYSE	28
2.2.18.1	DNaseI Verdau von RNA.....	28
2.2.18.2	Reverse Transkription	28

2.2.18.3	RT-PCR.....	29
2.3	TIERE.....	29
2.3.1	LOGISTIK.....	29
2.3.2	C57BL/6J.....	30
2.3.3	Cx26-DEFIZIENTE MAUS.....	30
2.3.4	Cx31-DEFIZIENTE MAUS.....	30
2.3.5	Cx43-DEFIZIENTE MAUS.....	31
2.3.6	Cx31/Cx43-DEFIZIENTE MAUS.....	31
2.3.7	NACKTMAUS.....	31
2.4	KULTIVIERUNG VON SÄUGERZELLEN.....	31
2.4.1	PASSAGIEREN VON ADHÄRENTEN ZELLEN.....	32
2.4.2	ZELLZAHLBESTIMMUNG.....	32
2.4.3	KRYOKONSERVIERUNG VON SÄUGERZELLEN.....	32
2.4.4	PRÄPARATION EMBRYONALER MAUSFIBROBLASTEN.....	32
2.4.5	HERSTELLUNG VON FEEDER-ZELLEN.....	33
2.4.6	HERSTELLUNG VON FIBROBLASTEN-KONDITIONIERTEM MEDIUM.....	34
2.4.7	TROPHOBLAST-STAMMZELLKULTUR.....	34
2.4.8	GENERIERUNG VON TROPHOBLAST-STAMMZELLEN.....	34
2.4.9	DIFFERENZIERUNGSREIHEN VON TS-ZELLEN.....	35
2.4.10	ZELL-PROLIFERATIONSANALYSE.....	35
2.4.11	TS-ZELL INJEKTIONEN INS NACKTMAUSMODELL.....	35
2.5	MORPHOLOGISCHE METHODEN.....	36
2.5.1	HISTOLOGISCHE ANALYSE.....	36
2.5.2	HÄMATOXYLIN-EOSIN (HE)-FÄRBUNG.....	36
2.5.3	IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE.....	36
2.5.4	IMMUNZYTOCHEMISCHE ANALYSE.....	37
2.6	GENE-ARRAY-ANALYSE.....	37
2.6.1	PROBENAUFARBEITUNG.....	37
2.6.2	ABSOLUTE UND VERGLEICHENDE ANALYSE.....	38
2.6.3	STATISTISCHE ANALYSE.....	39
2.6.4	HIERARCHISCHES CLUSTERING.....	39
3	<u>ERGEBNISSE.....</u>	<u>40</u>
3.1	DIE Cx43-KNOCKOUT PLAZENTA.....	40
3.2	DIE Cx31/Cx43-DOPPEL-KNOCKOUT MAUS.....	42
3.3	GENERIERUNG VON TROPHOBLAST-STAMMZELLEN.....	43
3.4	WILDTYP TS-ZELLEN.....	45
3.4.1	ANALYSE DER CONNEXIN-EXPRESSION AUF TRANSKRIPTEBENE.....	45
3.4.2	REGULATION DER CONNEXIN-EXPRESSION IN DIFFERENZIERENDEN TS-ZELLEN.....	47
3.4.3	IMMUNMARKIERUNG VON CONNEXINEN IN TROPHOBLAST-STAMMZELLEN.....	49
3.4.4	TS-ZELLEN BILDEN HÄMORRHAGISCHE TUMORE IN NACKTMÄUSEN.....	51
3.5	Cx31-DEFIZIENTE TROPHOBLAST-STAMMZELLEN.....	53
3.5.1	EXPRESSIONSANALYSE VON CONNEXINEN UND TROPHOBLAST MARKERN IN Cx31-DEFIZIENTEN TS-ZELLINIEN.....	53
3.5.2	PROLIFERATIONSVERHALTEN VON Cx31-DEFIZIENTEN TS-ZELLINIEN.....	56
3.5.3	TUMORBILDENDE KAPAZITÄT Cx31-DEFIZIENTER TS-ZELLEN.....	58
3.6	Cx26-DEFIZIENTE TROPHOBLAST-STAMMZELLEN.....	60
3.7	Cx43-DEFIZIENTE TROPHOBLAST-STAMMZELLEN.....	61
3.7.1	PROLIFERATIONSVERHALTEN VON Cx43-DEFIZIENTEN TS-ZELLINIEN.....	64

3.8	VERGLEICHENDE GENE-ARRAY ANALYSEN Cx31-DEFIZIENTER TS-ZELLINIEN ..	65
3.8.1	HIERARCHISCHES CLUSTERING.....	67
3.8.2	VERGLEICHENDE ANALYSE	68
3.8.3	REGULATION DER CONNEXINE UND TROPHOBLASTMARKER WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG.....	69
3.8.4	IDENTIFIZIERUNG REGULIERTER GENE.....	70
3.8.5	DIFFERENTIELLE EXPRESSION DES GLUCOSE TRANSPORTERS 3 (<i>GLUT3</i>) IN Cx31-DEFIZIENTEN TS-ZELLEN.....	72
3.8.6	IMMUNZYTOCHEMISCHER NACHWEIS VON GLUT3 AN DIFFERENZIERENDEN Cx31-DEFIZIENTEN TS-ZELLEN.....	73
4	<u>DISKUSSION.....</u>	75
4.1	Cx43 KANN DEN VERLUST VON Cx31 IN ÜBERLEBENDEN KNOCKOUT PLAZENTEN NICHT KOMPENSIEREN	75
4.2	DAS MODELL DER TROPHOBLAST-STAMMZELLEN.....	76
4.3	DAS CONNEXIN-EXPRESSIONSMUSTER VON WILDTYP TS-ZELLEN	77
4.4	TS-ZELLEN ZEIGEN EINE KOORDINIERTER EXPRESSION VON CONNEXINEN WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG ENTLANG DER TROPHOBLASTZELLINIE.....	79
4.5	TS-ZELLEN ZEIGEN DIE INVASIVE KAPAZITÄT DES TROPHOBLASTEN	81
4.6	CONNEXIN DEFIZIENTE TS-ZELLEN	83
4.7	Cx31 IST FÜR DIE KOORDINIERTER DIFFERENZIERUNG ENTLANG DER TROPHOBLASTZELL-LINIE UND DIE ERHALTUNG DES PROLIFERATIVEN STAMMZELLPOTENTIALS VERANTWORTLICH	84
4.8	GENE-ARRAY-ANALYSEN ZU IDENTIFIZIERUNG VON GENEN DIE IN IHRER EXPRESSION DURCH DEN VERLUST VON Cx31 VERÄNDERT SIND	85
4.9	GLUT3 IST EIN MARKER FÜR UNDIFFERENZIIERTE TS-ZELLEN	87
4.10	GENE, DIE DURCH DEN VERLUST VON Cx31 IN TS-ZELLEN FEHLREGULIERT SIND. 88	
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	93
6	<u>LITERATUR</u>	95
7	<u>ANHANG</u>	105
7.1	PLASMIDKARTEN	105
7.2	GENE-ARRAY ERGEBNISSE	109

Abkürzungsverzeichnis

Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
Cx	Connexin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>Dlx3</i> / DLX3	Distal less X3
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>dpc</i>	<i>dies post coitum</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>Egfr</i> / EGFR	epidermal growth factor receptor
EMFI	Embryonale Maus Fibroblasten
<i>Err2</i> / ERR2	Estrogen related receptor 2
EST	expressed sequence tag
<i>Ets2</i> / ETS2	erythroblastosis virus oncogene homolog 2
FCS	Fötale Kälberserum
<i>Fgf4</i> / FGF 4	fibroblast growth factor 4
<i>Fgfr2</i> / FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
<i>Gcm1</i> / GCM1	glia cell missing 1
<i>Glut3</i> / GLUT3	Glukosetransporter 3
HRP	Merrettich Peroxidase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilo Basen
kD	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani
<i>Lifr</i> / LIFR	leukemia inhibitory factor receptor
<i>Mash2</i> / Mash2	mammalian achaete scute homolog protein 2
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MOPS	Morpholinopropan-sulfonsäure
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEAS	Nicht essentielle Aminosäuren
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Saline
<i>pc</i>	<i>post coitum</i>
<i>Pl-1</i> / PI-1	placental lactogen 1
<i>Pl-2</i> / PL-2	placental lactogen 2
PCP	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription

SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Tpbpa</i> / Tpbpa	Trophoblast specific binding protein a
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TS-Zellen	Tropoblast-Stammzellen
U	Unit
ÜN	Über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
<i>Vegf</i> / VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp
ZO-1 / ZO-1	Zonula occludens Protein 1

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und physikalische Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

Proteinamen sind in Standardschriftart wiedergegeben. Handelt es sich um ein Gen und seine Expression, so ist die Bezeichnung kursiv dargestellt.

1 Einleitung

Die eutherischen Mammalia sind in ihrer Embryonalentwicklung auf die Plazenta angewiesen. Dieses transiente Austauschorgan verbindet den Fötus mit der Mutter und fördert dessen Wachstum und Vitalität. Die Errichtung der Plazenta ist daher die vorrangige Aufgabe eines Embryos, die für seine weitere intrauterine Entwicklung essentiell ist. Neben der Hauptfunktion, dem feto-maternalen Transport von Gasen, Nähr- und Abfallstoffen, bildet die Plazenta Schwangerschafts-assoziierte Hormone, die verschiedene maternale aber auch embryonale, physiologische Systeme beeinflussen.

Die Plazenta ist nicht nur das erste Organ, das in der Embryogenese gebildet wird, sie ist auch das einzige das aus Geweben zweier genetisch verschiedener Organismen aufgebaut ist. Während der Plazentation, dem Prozess der Bildung und nachfolgenden Entwicklung der Plazenta, erfolgt eine komplexe Interaktion zwischen den Zellen des sich einnistenden Embryos mit den Zellen des Uterus der Mutter.

Genetische oder umweltbedingte Faktoren, die die Entwicklung der Plazenta beeinflussen, können zu plazentarer Insuffizienz, fötaler Wachstumsretardation und zum Abort führen. Bei Nutztieren gehen etwa 80% der Embryonen aufgrund von Fehlern in der Peri-Implantationsphase verloren (Roberts *et al.*, 1990). Beim Menschen enden ein Drittel aller Schwangerschaften in spontanen Aborten und davon 22% bevor die Schwangerschaft klinisch festgestellt werden kann (Wilcox *et al.*, 1988). Die Präeklampsie ist die häufigste menschliche Schwangerschaftskomplikation, die durch eine Fehlfunktion der Plazenta hervorgerufen wird und lebensbedrohlich für Fötus und Mutter sein kann (Norwitz und Repke, 2000).

Obwohl die Plazenta bei allen Mammaliern die gleiche Aufgabe besitzt, zeigt die Anatomie eine hohe zwischenartliche Variabilität (Cross *et al.*, 1994). Die molekularen Mechanismen, die der Plazentation zugrunde liegen sind jedoch zum Teil vergleichbar und Gegenstand derzeitiger Untersuchungen. Insbesondere durch genetische Manipulationen der Maus werden diese Mechanismen weiter geklärt (Hemberger und Cross, 2001; Cross *et al.*, 2000).

1.1 Die Plazentaentwicklung der Maus

Mit der Bildung der Blastozyste an Tag 3,5 *pc* (*post coitum*) findet der erste Differenzierungsschritt in der Embryonalentwicklung der Säuger statt (Abb. 1.1). Die

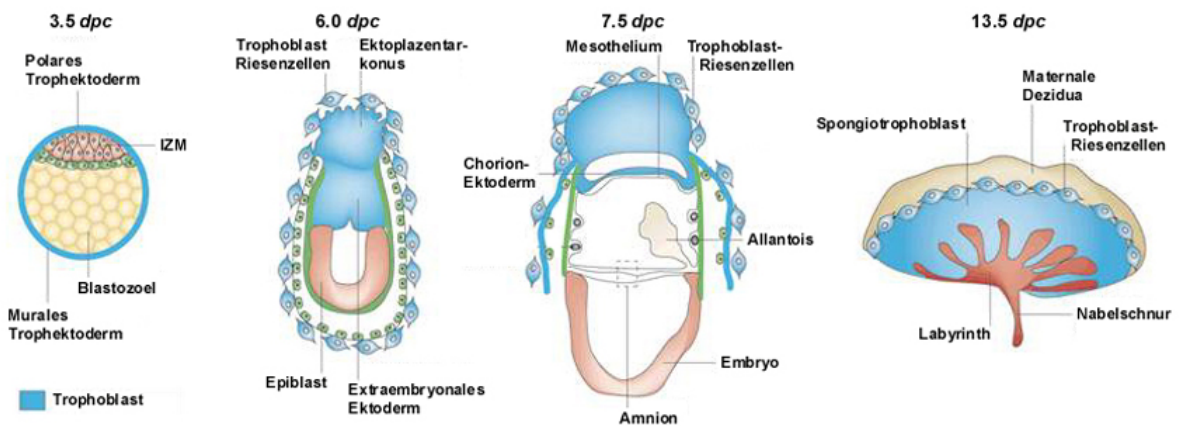


Abb.1.1. Plazentaentwicklung der Maus. Entwicklungsstadien des Mausembryos von Tag 3,5 bis 13,5 *post coitum*. Dargestellt ist der Ursprung der extraembryonalen Linien und die Zellpopulationen der reifen Plazenta. IZM, innere Zellmasse (verändert nach Rossant und Cross, 2001)

äußere, epitheliale Schicht der Blastozyste, das Trophektoderm, ist Ursprung der Trophoblastzelllinie, die den Hauptanteil der Plazenta bildet (Gardner und Johnson, 1972). Die innere Zellmasse besteht aus pluripotenten Zellen, die den gesamten Embryo, sowie einige seiner extraembryonalen Membranen hervorbringen. Im Blastozystenstadium endet die autonome Entwicklung des Embryos, der von nun an auf die Versorgung durch den mütterlichen Organismus angewiesen ist.

An Tag 4,5 der Embryonalentwicklung, findet die Implantation der Blastozyste in den Uterus statt. In diesem Stadium beginnt die Bildung der verschiedenen Trophoblast-Zelltypen. Das polare Trophektoderm, das der inneren Zellmasse aufliegt, proliferiert und bildet den diploiden Trophoblasten des extraembryonalen Ektoderms und des Ektoplazentarkonus (Copp, 1978). Die Zellen des muralen Trophektoderms, die keinen Kontakt zur inneren Zellmasse besitzen, verlieren die proliferative Aktivität und differenzieren zu postmitotischen Trophoblast-Riesenzellen, die durch zahlreiche Endoreduplikationen polytän werden (Barlow *et al.*, 1972). Die Riesenzellen, die auf das murale Trophektoderm zurückgehen werden primäre Trophoblast-Riesenzellen genannt, während Riesenzellen, die aus späteren Trophoblastpopulationen entstehen als sekundäre Trophoblast-Riesenzellen bezeichnet werden. Trophoblast-Riesenzellen sind an der Modulation des maternalen Gefäßsystems der Dezidua beteiligt (s.u.) und sie produzieren verschiedene plazentaspezifische Hormone, die dem Hypophysenhormon Prolaktin ähnlich sind (Übersicht: Linzer und Fisher, 1999). Dazu gehören PI-1, PI-2 (placental lactogen) und Proliferin, die ausschließlich von

Riesenzellen sezerniert werden. PI-1 und PI-2 modulieren die Aktivität des Ovars, indem sie die luteale Progesteronproduktion stimulieren, die essentiell für den Erhalt der Schwangerschaft ist (Talamantes und Ogren, 1988). Darüber hinaus sind PI-1 und PI-2 an der Steuerung der Brustdrüsenentwicklung beteiligt (Talamantes und Ogren, 1988).

Im weiteren Verlauf der Entwicklung entsteht durch Expansion aus dem extraembryonalen Ektoderm das Chorionektoderm (7.5 *dpc*). Parallel dazu entwickelt sich aus dem embryonalen Mesoderm die Allantois, die Ursprung der fetoplazentaren Blutgefäße und der Nabelschnur ist. Am Tag 8,5 *pc* adhärert die Allantois an das Chorion. Mit dem folgenden Fusionsprozess, auch als chorioallantoide Fusion bezeichnet, beginnt die Differenzierung der drei distinkten Trophoblaststrukturen der reifen, chorioallantoiden Plazenta, die bis zum Ende der Schwangerschaft persistieren: Labyrinth, Spongiotrophoblast und Trophoblast-Riesenzellen.

Nach der chorioallantoide Fusion sprossen fetoplazentare Blutgefäße in die Plazenta ein, die sich aus dem allantoide Mesoderm entwickeln. Der Choriontrophoblast entlang des einwachsenden Mesenchyms und der Blutgefäße differenziert dabei zum labyrinthinen Trophoblast. Durch Zellfusionen entsteht aus dem labyrinthinen Trophoblast der polynukleäre Synzytiotrophoblast, der die einwachsenden fetoplazentaren Blutgefäße interzellulärfrei überzieht. Der dreilagige Trophoblast des Labyrinths besteht aus zwei synzytialen Schichten und einer endothelartigen, die zum maternalen intervillösen Raum grenzt.

Zwischen dem Labyrinth und der äußeren Schicht der Trophoblast-Riesenzellen bildet sich der kompakte Spongiotrophoblast, der aus mononukleären, diploiden Zellen besteht. Der Spongiotrophoblast entwickelt sich wahrscheinlich aus den Zellpopulationen des Ektoplazentarkonus. Zur maternalen Dezidua hin differenzieren die Zellen des Spongiotrophoblasten in sekundäre Trophoblast-Riesenzellen. Des Weiteren produziert der Spongiotrophoblast Prolaktin-ähnliche Hormone (Linzer und Fisher, 1999) und beteiligt sich an der Bildung des Labyrinths.

Während der Schwangerschaft erfolgt ein starker Umbau des vaskulären Bettes des Uterus. Durch Dilatation bestehender Gefäße in der Dezidua sowie Vaskulogenese wird der Blutfluss zur Implantationsstelle und in die Plazenta gefördert (Adamson *et al.*, 2002). In diesem Prozess spielen die Trophoblast-Riesenzellen eine entscheidende Rolle. Sie produzieren die angiogenetischen Faktoren VEGF (Achen *et*

al., 1997) und Proliferin (Jackson *et al.*, 1994) sowie vasodilatatorischen Faktoren wie z.B. Adrenomedullin und NO (Yotsumoto *et al.*, 1998). Des Weiteren modifiziert der Trophoblast die maternalen Arterien in der Dezidua, indem er das Endothel der Gefäße arrodiert und ersetzt (Adamson *et al.*, 2002). Dadurch kommt es zu einem kontinuierlichen Blutfluss aus den maternalen Sinusoiden in Trophoblast ausgekleidete Kanäle, die das Blut durch den Spongiotrophoblasten in den interlabrynthinen Raum leiten. Da der Trophoblast direkten Kontakt an das maternale Blut besitzt, gehört die Plazenta der Maus zum Typen der hämochorialen Plazenta (Wooding und Flint, 1994). Der Nährstofftransport und Gasaustausch zwischen maternalem und fetalem Blut erfolgt über drei Plazentabbarrieren: die beiden Schichten des Synzytiotrophoblasten und das Endothel der fetoplazentaren Blutgefäße.

Die chorioallantoide Plazenta der Maus nimmt ihre Funktion um den Tag 9,0 *pc* auf und zeigt bis zur Geburt eine kontinuierliche Zunahme ihrer Größe.

1.2 Die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions

Zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion und zur Koordination von Entwicklungsprozessen kommunizieren die Zellen von Geweben und Organen miteinander. Ein weit verbreiteter Mechanismus der interzellulären Kommunikation ist die Bildung von Gap Junctions zwischen benachbarten Zellen. Gap Junctions sind Cluster von interzellulären Kanälen, die den direkten Austausch von Ionen, sekundären Botenstoffen und Metaboliten bis zu einem Molekulargewicht von 1 kD zwischen den Zytoplasmen zweier Zellen erlauben. Mit Ausnahme von Erythrozyten, Thrombozyten, Spermien und ausdifferenzierten Skelettmuskelzellen stehen alle Zellen des Vertebratenkörpers über Gap Junctions miteinander in direkter Verbindung (Evans und Martin, 2002).

Ein Gap Junction-Kanal besteht aus zwei Halbkanälen, den Connexonen. Jeder dieser Halbkanäle ist aus sechs Proteinuntereinheiten, den Connexinen, aufgebaut die sich in der Plasmamembran arrangieren und eine zentrale Pore umgeben (Kumar und Gilula, 1996). Die Connexine (Cx) bilden eine Multigenfamilie mit derzeit 19 Mitgliedern im Genom der Maus bzw. 20 Mitgliedern im humanen Genom (Willecke *et al.*, 2002). Jedes Connexin umfasst vier transmembrane Domänen, eine zytoplasmatische Schleife, den zytoplasmatischen N- und C-Terminus, sowie zwei extrazelluläre Schleifen, die das Koppeln der Connexone vermitteln (Kumar und Gilula, 1996). Es wird angenommen, dass diese Multigenfamilie durch Gen-

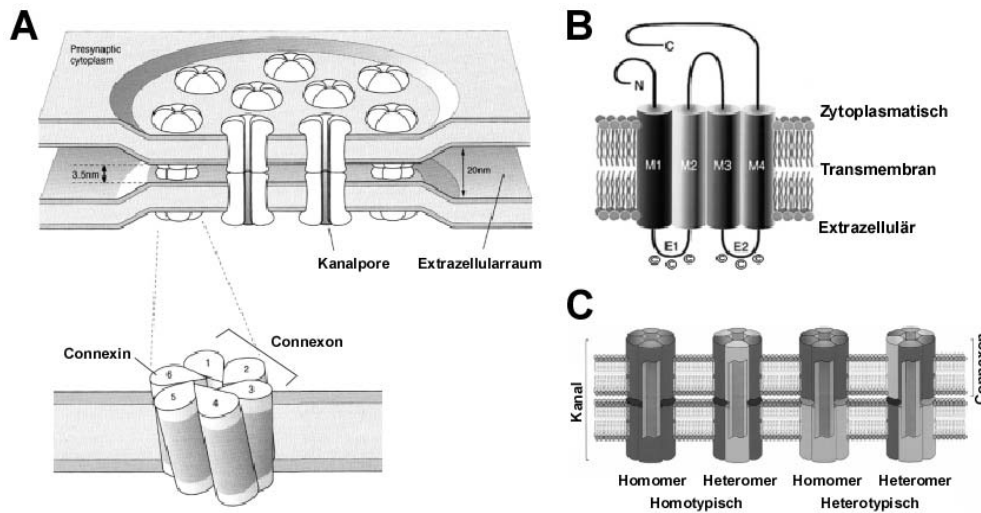


Abb. 1.2. Struktur von Gap Junctions. (A) Gap Junctions sind Cluster von interzellulären Kanälen. Ein Kanal besteht aus zwei Halbkanälen (Connexone), welches hexamere Strukturen von Proteinuntereinheiten, den Connexinen, sind. (B) Topologisches Modell von Connexinen. M1-M4, transmembrane Domänen; E1 und E2, extrazelluläre Domänen; C und N, zyttoplasmatischer C- bzw. N-Terminus. (C) Möglichkeiten der Kanalzusammensetzung. Connexone können homomer (sechs identische Connexine) oder heteromer (mehr als eine Isoform) sein. Kanäle können homotypisch (identische Connexone) oder heterotypisch (unterschiedliche Connexone) sein (Adaptiert von Willecke *et al.*, 2002).

Duplikationen aus Vorläufer-Connexinen entstanden ist (Bennett *et al.*, 1994). Bei Invertebraten bilden die Innexine topologisch und funktionell ähnliche Kanäle, weisen jedoch keine Sequenzhomologien zu den Connexinen auf (Phelan und Starich, 2001). Benannt werden die Connexine nach dem von der Aminosäureprimärsequenz abgeleiteten Molekulargewicht, das zwischen 26 und 57 kD beträgt. Die meisten Connexine werden in mehreren Geweben exprimiert; nur wenige Isoformen weisen eine gewebespezifische Expression auf, wie zum Beispiel das linsenspezifische Cx50 (White *et al.*, 1992). Da die meisten Zellen mehr als ein Connexin exprimieren, können Gap Junction-Kanäle mit unterschiedlicher Zusammensetzung gebildet werden. Homomere Halbkanäle bestehen aus sechs identischen Connexinen, während heteromere Halbkanäle aus mehr als einer Isoform zusammengesetzt sind. Koppeln zwei identische Connexone, so spricht man von homotypischen Kanälen; bei verschiedenen Connexonen von heterotypischen Kanälen. Gap Junction-Kanäle mit unterschiedlicher Connexin-Zusammensetzung besitzen jeweils veränderte elektrophysiologische Eigenschaften im Vergleich zu den entsprechenden homomeren und homotypischen Kanälen (Elfgang *et al.*, 1995).

Die Phänotypen von Connexin defizienten Mäusen (Tabelle 1.1) zeigen, dass den einzelnen Connexinen in den verschiedenen Geweben essentielle Funktionen bei der Gap Junction vermittelten Kommunikation zukommen. Unterstützt wird die Funktionsanalyse durch die zunehmende Entdeckung von Mutationen humaner Connexine, die Ursache von teilweise schwerwiegenden Erbkrankheiten sind.

Tabelle 1.1 – Connexine der Maus. Angegeben sind die derzeit bekannten Gene mit ihrem Expressionsmuster und dem Phänotyp der Knockout Maus (nach Willecke *et al.*, 2002). n.a., nicht analysiert

Connexin	Prominente Expression	Phänotyp der Cx-defizienten Maus
Cx26	Leber, Haut, Plazenta, Cochlea, Brust	Letaler Plazentadefekt an Tag E11
Cx29	Myelinisierte Zellen	n.a.
Cx30	Haut, Hirn, Cochlea	Hörschwäche
Cx30.2	n.a.	n.a.
Cx30.3	Haut	n.a.
Cx31	Haut, Plazenta	Transiente plazentare Dysmorphogenese
Cx31.1	Haut	n.a.
Cx32	Leber, Schwann-Zellen, Oligodendrozyten	Verminderter Glykogenabbau, erhöhte Leberkarzinogenese
Cx33	Testis	n.a.
Cx36	Neurone	Optische Defizite
Cx37	Endothel	Weibliche Sterilität
Cx39	n.a.	n.a.
Cx40	Herz, Endothel	Atriale Arrhythmie
Cx43	Viele Zelltypen	Fehlbildung am Herzen
Cx45	Herz, glatter Muskel, Neurone	Embryonale Letalität E10,5
Cx46	Linse	Zonularer nukleärer Katarakt
Cx47	Hirn, Rückenmark	n.a.
Cx50	Linse	Mikrophthalmie, zonularer und pulverulenter Katarakt
Cx57	Ovar	n.a.

So führt die homozygote Inaktivierung von *Cx46* bzw. *Cx50* bei der Maus zur Entwicklung von Katarakten der Linse (Gong *et al.*, 1999; White *et al.*, 1998). Mutationen im humanen *Cx46*- bzw. *Cx50*-Gen sind ebenfalls als Ursache von Kataraktbildungen beschrieben worden (Mackay *et al.*, 1999; Pal *et al.*, 1999).

In der Cochlea von Nagern und Mensch sind *Cx26* und *Cx30* in den Supporting-Zellen und Fibrozyten koexprimiert (Lautermann *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass diese Gap Junction-Kanäle eine Rolle beim Recycling von Kaliumionen spielen, die von den aktivierten Sinneszellen freigesetzt werden. Bei der Maus führt die Inaktivierung des *Cx26*-Kanals zu Taubheit (Cohen-Salmon *et al.*, 2002) und der Verlust des *Cx30*-Kanals zu einer Hörschwäche (Teubner *et al.*, 2003). Beim

Menschen sind Mutationen im *Cx26*- bzw. *Cx30*-Gen die häufigste Ursache für nicht-syndromale Taubheit (Kelsell *et al.*, 1997; Kelley *et al.*, 1999).

Nicht alle Connexin defizienten Mäuse stellen jedoch ein Tiermodell für den Menschen dar. Während Mutationen im humanen *Cx30.3*-Gen zu der Hautkrankheit Erythrokeratoderma variabilis führen (Richard *et al.*, 1998) ist diese bei Nagern unbekannt.

Aufgrund der überlappenden Expression von Connexinen wird angenommen, dass eine funktionelle Redundanz zwischen einzelnen Connexin-Proteinen besteht und der Verlust einer Isoform durch eine andere, die in der selben Zelle oder Gewebe koexprimiert ist, kompensiert werden kann (Evans und Martin, 2002). Das variierende Connexin-Expressionsmuster kann daher für die gleiche Mutation zu einem unterschiedlichen Phänotypen zwischen den Spezies führen.

Das Expressionsmuster, die gezielten Mutationen der Maus und die humanen Erbkrankheiten lassen annehmen, dass Connexin-Proteine in folgende grundlegende Funktionen involviert sind: Koordination von Migration, Kontraktion und Sekretion kommunizierender Zellen; Synchronisation von Neuronen; interzelluläre Regulation des *second messenger* Spiegels, sowie interzellulärer Transport von Ionen und Metaboliten. Bisher konnte weder geklärt werden, welche Moleküle durch die jeweiligen Gap Junction-Kanäle in einem Gewebe diffundieren können und in welche spezifischen Signalwege diese eingebunden sind.

Die Unterschiede zwischen den Connexinen basieren vor allem auf der Länge und Aminosäuresequenz des freien zytoplasmatischen C-Terminus. Dieser stellt ein Bindungsmotiv für verschiedene Proteine dar. Der C-Terminus von *Cx43* interagiert mit ZO-1 (Toyofuku *et al.*, 1998), α - und β -Tubulin (Giepmans *et al.*, 2001a) sowie c-Src (Giepmans *et al.*, 2001b). Diese Interaktionen werden durch die potentiellen SH2-, SH3- und PDZ-Domänen des *Cx43* C-Terminus vermittelt (Evans and Martin, 2002). Darüber hinaus besitzt der C-Terminus des *Cx43* nach Transfektion den gleichen Effekt als Wachstumssuppressor wie der Kanal (Moorby and Patel, 2001). Dieses deutet darauf hin, dass bei Gap Junctions neben der Kanalpore auch das Protein selbst eine Funktion in der Signaltransduktion besitzt.

1.3 Connexine in der Plazentaentwicklung der Maus

Die Connexin-Expression während der Plazentaentwicklung der Nager unterliegt einer strengen räumlichen und zeitlichen Regulation. Dabei besitzt *Cx31* eine besondere

Rolle in der frühen Trophoblastzelllinie. In der Blastozyste wird Cx31 mit anderen Connexinen koexprimiert (Houghton *et al.*, 2002). Nach der Implantation erfolgt eine strenge Segregation der Connexin-Expression. Die Expression von Cx31-Kanälen ist spezifisch für den Trophoblasten des extraembryonalen Ektoderms und des Ektoplazentarkonus (Reuss *et al.*, 1996, 1997; Dahl *et al.*, 1996). Da Cx31-Halbkanäle nur mit sich selbst funktionelle Gap Junction-Kanäle bilden können (Elfgang *et al.*, 1995), kommt es dadurch zur Errichtung von geschlossenen Kommunikations-Kompartimenten, bei denen die Trophoblastzellen gegenüber dem Cx43-exprimierenden Embryo abgegrenzt ist (Lo und Gilula, 1979).

In der Plazenta der Maus zeigt der Spongiotrophoblast als Derivat des Ektoplazentarkonus die anhaltende Expression von Cx31. In der Mitte der Schwangerschaft setzt mit zunehmender Differenzierung die Koexpression von Cx43 in den Zellen des Spongiotrophoblast ein. Die terminal differenzierten Trophoblast-Riesenzellen an der Grenze zur maternalen Dezidua sind durch die ausschließliche Expression von Cx43 gekennzeichnet (Plum *et al.*, 2001). Im Labyrinth sind die beiden Schichten des Synzytiotrophoblasten durch Cx26-Kanäle miteinander verbunden (Gabriel *et al.*, 1998; Pauken *et al.*, 1995).

Die Generierung von Knockout Mäusen zeigte, dass die Connexine in der Plazentaentwicklung spezifische Funktionen besitzen (Plum *et al.*, 2001; Kruger *et al.*, 2000; Gabriel *et al.*, 1998). Die gezielte Inaktivierung des Cx26-Gens führt zu intrauterinem Tod der Embryonen an Tag 9,5 *pc* aufgrund eines gestörten feto-maternalen Glukosetransports über den Synzytiotrophoblasten. Cx26 besitzt daher eine metabolische Funktion und beeinflusst nicht die Entwicklung der Plazenta (Gabriel *et al.*, 1998). Der Verlust des Cx31-Gens führt einer transienten plazentaren Dymorphogenese, die den Tod von 60% der Embryonen zwischen den Tagen 10,5 und 13,5 *pc* zur Folge hat (Plum *et al.*, 2001). Eine Cx31-Knockout Plazenta weist neben einem reduzierten Labyrinth und einem reduzierten Spongiotrophoblasten eine stark erhöhte Anzahl von Trophoblast-Riesenzellen auf. Die Ursache für diesen Phänotypen ist eine Verschiebung im Gleichgewicht zwischen der Proliferation von Stammzellen und ihrer Differenzierung zu Riesenzellen, die zugunsten der Differenzierung verschoben ist. Cx31 scheint daher eine Aufgabe in der Regulation von Differenzierungsabläufen entlang der Trophoblastzelllinie zu besitzen. 40% der Cx31-defizienten Plazenten zeigen ein Wiedereinsetzen der Differenzierungsprozesse, die zu einer Regeneration der Plazentaentwicklung und Funktion und damit

zum Überleben der Embryonen führt. Die Regeneration der Cx31-Knockout Plazenten ab Tag 10,5 *pc* korrespondiert mit einer Induktion der Cx43-Expression im Spongiotrophoblasten. Daher wird vermutet, dass Cx43-Kanäle die Funktion von Cx31-Kanälen in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft kompensieren können (Plum *et al.*, 2001).

Die Inaktivierung des Cx43-Gens führt zu einer Fehlbildung des Herzens, die den Tod der Embryonen während oder in den ersten Stunden nach der Geburt zur Folge hat (Reaume *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde berichtet, dass eine der beiden generierten Cx43-defizienten Mauslinien nach der Verpaarung heterozygoter Eltern eine reduzierte Anzahl homozygoter Cx43-defizienter Nachkommen zeigte. Die Ursache für diesen Befund ist unbekannt (Reaume *et al.*, 1995). Ob eine mögliche Beeinträchtigung der Plazentaentwicklung vorliegt wurde bisher nicht untersucht.

Cx45 wird in glatten Muskelzellen exprimiert. Die Cx45-Knockout Maus stirbt an Tag 10,5 *pc* aufgrund von Störungen in der vaskulären Entwicklung (Kruger *et al.*, 2000). Betroffen ist u.a. die Bildung der ersten embryonalen Blutgefäße im Dottersack aufgrund fehlender Rekrutierung der Perizyten. Die embryonalen Gefäße sind anormal vergrößert und gleichzeitig ist ihr Verzweigungsgrad stark reduziert. Als Folge davon kommt es auch zu Störungen in der Bildung von Synzytiotrophoblast. Dieser placentare Defekt der Cx45-Knockout Maus ist daher primär auf Fehlregulationen im extraembryonalen Mesoderm zurückzuführen. In Trophoblastzellen wird Cx45 nicht exprimiert (Kruger *et al.*, 2000).

1.4 Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie

Viele Mutationen von Genen der Maus führen zu Störungen in der Funktion und Entwicklung der Plazenta. Die Analyse dieser placentaren Phänotypen ermöglicht die Aufklärung von molekularen Signalwegen in der Trophoblastzelllinie und hilft die komplexen Interaktionen zwischen Zellen des Trophoblasten, des Embryos und der Mutter zu verstehen. Im Folgenden ist eine Übersicht von Genen dargestellt, die eine Rolle in der Plazentation der Maus spielen.

1.4.1 Frühe Trophoblastzelllinie

Für den Erhalt des Stammzellpotentials in der frühen Trophoblastzelllinie sind die Transkriptionsfaktoren Cdx2 und Eomes essentiell (Chawengsaksophak *et al.*, 1997;

Russ *et al.*, 2000). *Eomes*- als auch *Cdx2*-defiziente Embryonen sterben in der Peri-Implantationsphase, da sich das Trophektoderm nicht zur Trophoblastzelllinie entwickeln kann (Chawengsaksophak *et al.*, 1997; Russ *et al.*, 2000). Die Regulation von *Cdx2* und *Eomes* erfolgt über den FGF-Signalweg. FGF4 wird von der inneren Zellmasse der Blastozyste und später vom Epiblasten gebildet, während der Rezeptor (FGFR2) im Trophektoderm sowie im extraembryonalen Ektoderm und Chorion exprimiert wird (Rossant und Cross, 2001). Die *Fgf4*-Knockout Maus stirbt bei der Implantation aufgrund der schwachen Entwicklung aller Zelllinien (Feldman *et al.*, 1995) und die spezifische Blockade der FGF-Rezeptoren inhibiert die Trophoblast-Proliferation im Blastozysten-Stadium (Chai *et al.*, 1998). Die Bedeutung der FGF-Signalwege für die Entwicklung des frühen Trophoblasten wurde durch die FGF4-abhängige Isolierung von Trophoblast-Stammzellen aus dem extraembryonalen Ektoderm von 6,5 *dpc* Embryonen verdeutlicht (siehe Kapitel 1.4.5).

Der nukleäre Rezeptor Err2 (estrogen related receptor 2) besitzt ebenfalls eine essentielle Rolle in der frühen Trophoblastzelllinie. Nach Tag 7,5 *pc* wird Err2 im extraembryonalen Ektoderm exprimiert und seine Inaktivierung führt zu einer abnormalen Chorionentwicklung, die mit einem frühzeitigen Verlust des diploiden Trophoblasten und einer Zunahme der Trophoblast-Riesenzellen einhergeht (Luo *et al.*, 1997).

1.4.2 Ekto-plazentarkonus/Spongiotrophoblast

Zur Entwicklung des Ekto-plazentarkonus aus der Stammzellanlage ist der Transkriptionsfaktor *Ets2* essentiell (Yamamoto *et al.*, 1998). *Ets2* wird stark im Ekto-plazentarkonus und schwächer im Trophektoderm der Blastozyste sowie im extraembryonalen Ektoderm exprimiert. Die Knockout Maus zeigt, dass *Ets2* notwendig für die Formierung und Proliferation der Zellen des Ekto-plazentarkonus ist (Yamamoto *et al.*, 1998).

Aufgrund des Genexpressionsmusters wird angenommen, dass sich der Ekto-plazentarkonus zum Spongiotrophoblasten entwickelt (Cross *et al.*, 2003). So beginnt die Expression der Gene *Tpbpa* (Lescisin *et al.*, 1988) und *Flt1* (He *et al.*, 1999) ab Tag 7,5 bzw. 8,5 *pc* an der apikalen Seite des Ekto-plazentarkonus, ist später aber für den gesamten Spongiotrophoblasten spezifisch.

Der *basic helix-loop-helix* Transkriptionsfaktor Mash2 ist für den Erhalt des diploiden Trophoblasten im Chorion, Ekto-plazentarkonus und später im Spongiotrophoblasten

notwendig. *Mash2*-defiziente Embryonen zeigen an Tag 10,5 *pc*, ähnlich der *Cx31*-Knockout Maus, den Verlust des Spongiotrophoblasten sowie eine erhöhte Anzahl von Trophoblast-Riesenzellen (Guillemot *et al.*, 1994). Da an Tag 8,5 *pc* der Ektoplazentarkonus und das Chorion normal entwickelt sind, muss *Mash2* nur für die Derivate des Ektoplazentarkonus essentiell sein. Die sekundäre Fehlbildung des Labyrinths in *Mash2*-defizienten Plazenten demonstriert weiterhin, dass die einzelnen Subpopulationen innerhalb der Trophoblastzelllinie in ihrer Entwicklung voneinander abhängen (Guillemot *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1997).

1.4.3 Trophoblast-Riesenzellen

Trophoblast-Riesenzellen entwickeln sich direkt nach der Implantation aus dem muralen Trophektoderm der Blastozyste und später durch Differenzierung von Zellen des Ektoplazentarkonus (Cross *et al.*, 1994).

Die Differenzierung von Trophoblast-Riesenzellen wird durch die antagonistisch wirkenden *basic helix-loop-helix* Transkriptionsfaktoren *Hand1* und *Mash2* reguliert. Die Expression von *Hand1* fördert die Entwicklung zu Trophoblast-Riesenzellen (Riley *et al.*, 1998). Im Gegenzug inhibiert die ektopische Expression von *Mash2* die Riesenzellbildung (Scott *et al.*, 2000, Kraut *et al.*, 1998). *Hand1* beeinflusst die Aktivität von *Mash2* indirekt, da *Hand1* notwendig zur Repression von *Mash2* in der Riesenzelldifferenzierung ist. (Scott *et al.*, 2000). Die Signalwege in die diese beiden Transkriptionsfaktoren eingebunden sein können, sind bisher nicht bekannt. Das Repressorprotein *I-mfa* bindet *Mash2* und inhibiert dadurch seinen nukleären Import sowie die DNA-Bindungsaktivität (Kraut *et al.*, 1998).

Die Funktion von Trophoblast-Riesenzellen wird durch die Transkriptionsfaktoren *GATA2* und *GATA3* gesteuert. Mutationen in den Genen, die für diese Transkriptionsfaktoren kodieren, führen zur Repression der Trophoblast-Riesenzell spezifischen Hormone *Pl-1* und Proliferin (Ma *et al.*, 1997).

1.4.4 Labyrinth

An der Bildung des Labyrinths sind neben der Trophoblastzelllinie auch Zellen des embryonalen Mesoderms beteiligt, aus dem sich die vaskulären Anteile der Plazenta entwickeln. Mutationen in beiden Anteilen können daher zu plazentaren Fehlbildungen und zum Tod der Embryonen führen.

Gcm1 ist das einzige Trophoblast-Gen, dessen Inaktivierung zu einem Defekt in der Bildung des Synzytiotrophoblasten führt. In der Chorionplatte werden spezifisch die Stellen, an denen die Einfaltung des Trophoblasten und Einsprossung des allantoischen Mesoderms stattfindet durch die Expression von *Gcm1* gekennzeichnet (Anson-Cartwright *et al.*, 2000). Während der Verzweigungen der Blutgefäße markiert die Expression von *Gcm1* Trophoblastzellen die elongieren und zu Synzytiotrophoblast fusionieren. Durch die Inaktivierung von *Gcm1* ist die chorioallantoide Verzweigung blockiert und der labyrinthine Trophoblast bleibt undifferenziert. Als Folge dieser Fehldifferenzierung sterben die Embryonen an Tag 10 *pc* (Anson-Cartwright *et al.*, 2000).

Für die anschließende Morphogenese des Labyrinths sind die Transkriptionsfaktoren *Dlx3* (Morasso *et al.*, 1999) und *Esx1* (Li und Behringer, 1998) essentiell, ihre zelluläre Funktion und Regulation ist aber bisher nicht bekannt.

Die chorioallantoischen Verzweigungen, die zur Bildung des Labyrinths führt, sind durch verschiedene Wachstumsfaktor-Rezeptoren reguliert. So zeigen Mäuse mit mutierten Genen des *Fgfr2* (fibroblast growth factor receptor 2), *Lifr* (leukemia inhibitory factor receptor), *Egfr* (epidermal growth factor receptor) oder *Met* (dem HGF-Rezeptor) Labyrinth Defekte (Hemberger *et al.*, 2001). Viele Knockout Mäuse von Komponenten, die stromabwärts dieser Rezeptoren liegen zeigen ebenfalls Fehler in der Labyrinthbildung (Rossant und Cross, 2001).

1.4.5 Trophoblast-Stammzellen

Die Trophoblastzellen der chorioallantoischen Plazenta sind ausschließlich auf das polare Trophektoderm der Blastozyste zurückzuführen (Gardner, 1996). Dieses und sein Derivat, das extraembryonale Ektoderm, benötigen Signale aus der inneren Zellmasse um proliferativ zu sein. Tanaka *et al.* (1998) ist es gelungen aus dem extraembryonalen Ektoderm von 6,5 *dpc* Embryonen sowie aus Blastozysten Trophoblast-Stammzellen (TS-Zellen) zu isolieren und *in vitro* zu kultivieren. Die Generierung und Kultur der TS-Zellen ist abhängig von FGF4 und embryonalen Fibroblasten (bzw. Fibroblasten konditioniertem Medium), die einen noch nicht identifizierten Faktor produzieren, der zur Erhaltung des Stammzellpotentials essentiell ist. Nur das extraembryonale Ektoderm/Chorionektoderm bis zum Tage 7,5 *pc* enthält Zellen mit diesem Stammzellpotential (Rossant und Cross, 2001; Uy *et al.*, 2002). TS-Zellen weisen Markergene des extraembryonalen Ektoderms auf und

können *in vivo* in Chimären ausschließlich zur Trophoblastzelllinie beitragen. Durch den Entzug von FGF4 oder embryonalen Fibroblasten kann die Differenzierung von TS-Zellen entlang der Trophoblastzelllinie in andere Zellpopulationen induziert werden, was mit dem Verlust der Proliferation verbunden ist (Tanaka *et al.*, 1998).

TS-Zellen sind ein geeignetes Modell zur Analyse von Gen-Knockouts, die zu einem letalen Trophoblastdefekt führen. Aus den Blastozysten von Knockout Mäusen können die entsprechenden Gen defizienten TS-Zelllinien generiert werden und erlauben so *in vitro* die molekulare Funktionsanalyse eines Gens bzw. eines Proteins bei Differenzierungsprozessen innerhalb der Trophoblastzelllinie.

1.5 Zielsetzung

Das Expressionsmuster der Connexine in der Trophoblastzelllinie der Maus unterliegt einer exakten räumlichen und zeitlichen Regulation. Cx31 ist das spezifische Connexin für den frühen Trophoblasten. Die verschiedenen Zellpopulationen der reifen Plazenta sind ebenfalls durch eine spezifische Connexin-Expression charakterisiert. Der Synzytiotrophoblast des Labyrinths exprimiert Cx26, der Spongiotrophoblast Cx31 und in späteren Stadien wird zusätzlich Cx43 induziert. Trophoblast-Riesenzellen sind durch die ausschließliche Expression von Cx43 gekennzeichnet. Die Inaktivierung des Cx26- bzw. des Cx31-Gens führt zu einem plazentaren Phänotypen, der im Falle des Cx31 auf einer Fehldifferenzierung des Trophoblasten basiert. Für die Cx43-Knockout Maus sind keine plazentaren Defekte bekannt.

Die Regeneration von 40% der Cx31-Knockout Plazenten in der Mitte der Schwangerschaft korreliert mit der Induktion der Cx43-Expression im Spongiotrophoblasten. Es wird daher vermutet, dass Cx43 die Funktion des Cx31 kompensieren kann und damit zum Überleben der Embryonen führt. Zur Überprüfung dieser Hypothese soll durch Kreuzung der beiden Einzelstämme die Cx31/Cx43-Doppelknockout Maus generiert werden. An dieser Linie soll untersucht werden, ob die Doppelknockout Plazenta einen sich von der Cx31-Knockout Plazenta unterscheidenden Phänotyp besitzt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit besteht in der Generierung von TS-Zelllinien aus Wildtyp Blastozysten und der Analyse ihres Connexin-Expressionsmusters während

der Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie. Dadurch soll festgestellt werden, inwieweit TS-Zellen die Connexin-Regulation des Trophoblasten der Maus aufweisen und als Modell zur Analyse der Funktion von Connexine während der Trophoblastdifferenzierung dienen können.

Des Weiteren sollten Cx26-, Cx31- bzw. Cx43-defiziente TS-Zelllinien aus den Blastozysten der entsprechenden Knockout Mauslinien generiert werden und in ihrem Differenzierungsverhalten und Proliferationsverhalten im Vergleich zum Wildtyp analysiert werden. Diese Zelllinien sollen als Grundlage für weitere zell- und molekularbiologische Analysen der Connexin-vermittelten Signalkaskaden in der Plazentadifferenzierung der Maus dienen.

Durch Injektion der generierten TS-Zelllinien in ein Nacktmaus-Modell soll untersucht werden, inwieweit TS-Zellen das invasive Verhalten des Trophoblasten der Plazenta zeigen. An diesem Modell soll weiterhin analysiert werden, zu welchen Änderungen im Invasionsverhalten der Verlust von Cx31 führt.

Mittels vergleichender Gene-Array-Analysen von Cx31-defizienten TS-Zelllinien sollen Kandidatengene identifiziert werden, die durch den Verlust des Cx31-Kanals in ihrer Expression verändert sind und Hinweise auf die Stellung von Cx31 in den Signalwegen der Trophoblastdifferenzierung geben könnten. Entsprechende Gene sollen daraufhin weiter untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Agarose	peqLab, Erlangen
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
DAB	DAKO, Hamburg
Desoxynukleotidmix (je 10 mM)	Genecraft, Münster
Dextransulfat	Serva, Heidelberg
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
DNaseI (RNase frei) für Molekularbiologie	Invitrogen, Karlsruhe
DNaseI (Gradin) für Zellkultur	Roche, Mannheim
DTT	Gibco, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FCS	Seromed, Berlin
FGF4 (human, rekombinantes Protein)	R&D-Systems, Wiesbaden
Formamid, deionisiert	Sigma, Taufkirchen
Heparin	Sigma, Taufkirchen
Heringssperm DNA	Roche, Mannheim
IPTG	Sigma, Taufkirchen
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (2U/µl)	Genecraft, Münster
LB-Agar	Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin (100x)	Gibco, Karlsruhe
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma, Taufkirchen
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
M-MLV Reverse Transkriptase u. Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
MOPS	Serva, Heidelberg
Natriumpyruvat-Lösung (100x)	Gibco, Karlsruhe
NEAS (100x)	Gibco, Karlsruhe
Nylonmembran Hybond N	Amersham, Braunschweig
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	MWG, Ebersberg

PBS Dulbecco	Seromed, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)	Gibco, Karlsruhe
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Radiochemikalien: α -(^{32}P)-dCTP; 3000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$	ICN, Eschwege
Rinderserumalbumin, Fraktion V (BSA)	Sigma, Taufkirchen
RNase A	Sigma, Taufkirchen
Röntgenfilme: Kodak X-AR 5	Kodak, Stuttgart
RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe
StreptAB-Komplex/HRP	DAKO, Hamburg
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5U/ μl)	Genecraft, Münster
Trypsin/EDTA-Lösung (1x)	Gibco, Karlsruhe
Vectashield	Vector Lab, Peterborough, UK
Whatman 3MM-Papier	Biometra, Göttingen
X-Gal	Hybaid-AGS, Heidelberg
Zellkulturplatten und Flaschen	Falcon, Heidelberg

Alle sonstigen Chemikalien und Enzyme wurden, sofern nicht gesondert aufgeführt, in Analyse-Qualität von den Firmen Roche (Mannheim), MBI-Fermentas (München), Merck (Darmstadt), Fluka/Riedel-de-Haën (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Takara (Taufkirchen) bezogen.

2.1.2 Kits

Megaprime DNA Labelling System	Amersham, Freiburg
TA Cloning Kit Dual Promotor	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
MiniElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
MiniElute PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
One Shot TOPF' Bakterien	Invitrogen, Karlsruhe
RNase-free DNaseI Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Midi Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.3 Antikörper

Die Connexin spezifischen Antikörper wurden freundlicherweise von Dr. O. Traub (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Die in Kaninchen generierten Antikörper waren jeweils gegen den C-Terminus des Connexin-Moleküls gerichtet und wurden gegen das entsprechende Antigen affinitätsgereinigt. Der Zytokeratin 8 spezifische Antikörper (TROMA-1) wurde freundlicherweise von Prof. R. Kemler (Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg) überlassen.

Primärantikörper	Verdünnung	Beschreibung – Referenz
Cx26	1:300	Traub <i>et al.</i> , 1989
Cx30	1:100	Sohl <i>et al.</i> , 2000
Cx32	1:100	Traub <i>et al.</i> , 1982
Cx31	1:300	Butterweck <i>et al.</i> , 1994
Cx37	1:100	Traub <i>et al.</i> , 1998
Cx40	1:200	Traub <i>et al.</i> , 1994
Cx43	1:500	Traub <i>et al.</i> ; 1994
Cx45	1:100	Butterweck <i>et al.</i> , 1994
Zytokeratin 8 (TROMA-1)	1 :10	Monoklonaler Antikörper (Hybridoma) gegen Zytokeratin 8 der Maus (Kemler <i>et al.</i> , 1981)
GLUT3	1:500	Polyklonales Kaninchen Antiserum gegen GLUT3 der Maus (Chemicon, Hofheim)

Sekundärantikörper	konjugiert mit	Verdünnung	Firma
Schwein-anti-Kaninchen IgG	FITC	1:50	DAKO, Hamburg
Esel-anti-Ratte IgG	Cy3	1:500	Dianova, Hamburg
Kaninchen-anti-satte IgG	biotinyliert	1:400	DAKO, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen IgG	Cy3	1:300	Dianova, Hamburg

2.1.4 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH10b	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ø80dlacZΔM15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK gamma ⁻ rpsL nupG	Gibco, Karlsruhe
<i>E. coli</i> TOP10F'	F' {lacI ^q Tn10(Tet ^R)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ø80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5 Häufig verwendete Lösungen

Moscona	140 mM NaCl, 4 mM KCl, 0,4 mM NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O, 0,2 mM KH ₂ PO ₄ , 12 mM NaHCO ₃ , 9 mM D-Glucose-Monohydrat; pH 7,4
---------	---

MOPS-Puffer (10x)	0,2 M MOPS, 2 M NaAcetat, 0,5 M EDTA; pH 7,0
PBS	140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 KH ₂ PO ₄ ; pH 7,5
PBS/BSA	0,5 Gew.% BSA (Fraktion V) in 1x PBS gelöst; pH 7,5
Pen/Strep (100X)	10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin in 0,85 Vol.% PBS
SSC-Puffer (20x)	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,5
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8.5, 1 mM EDTA
Trypsin/EDTA (1x)	0,05 Gew.% Trypsin, 0,02 Gew.% EDTA in 0,85 Vol.% PBS

2.1.6 Kulturmedien

LB-Medium	25 g/l LB-Agar in <i>A. bidest</i> lösen und autoklavieren. Für Plattenagar wurden 15 g/l Bacto-Agar zugegeben. Ampicillin wurde auf 100 µg/ml zugesetzt.
EMFI-Medium	DMEM, 15 Vol.% FCS, 0,1 mM NEAS, 1 mM Na-pyruvat, 100 µM β-Mercaptoethanol, 1x Pen/Strep
TS-Medium	RPMI 1640, 20 Vol.% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1mM Na-pyruvat, 100 µM β-Mercaptoethanol, 1x Pen/Strep
FK-TS-Medium	75% EMFI-konditioniertes TS-Medium, 25% TS-Medium, 25 ng/ml FGF4, 1 µg/ml Heparin

2.1.7 Oligonukleotide

Die im Folgenden aufgelisteten Oligonukleotide wurden in dieser Arbeit als Primer für die PCR verwendet. Die ‚Accession number‘ bezieht sich auf den entsprechenden Sequenzeintrag in der Datenbank des NCBI.

Tab. 2.1a: Oligonukleotide für die Genotypisierung transgener Tiere und TS-Klone

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Grösse	AT	Amplikon	Referenz
Cx26-5'	CCTACGGGAGACATGAAAAGAAACGGAAG	29mer	70	WT: 1118	Gabriel
Cx26-3'	AGCCCAGCACGCCAGTGATGAATACAATA	29mer		Mutation:	<i>et al.</i> , (1998)
Cx26-neo	GGATCGGCCATTGAACAAGATGGATTGCAC	30mer		827	
GT1	CTGGACTCTGACATGTGCACATAC	24mer	70	WT: 600	Plum <i>et al.</i> ,
GT2	CTACATGCAGGATGACCAGCATAG	24mer		Mutation:	(2001)
GT3	CCACAGATGAAACGCCGAGTTAAC	24mer		450	
Cx43extern	AATCGATTGGCAGCTTGATGTTCAAGCC	28mer	70	WT: 1400	Gramsch
Cx43intern	GGTCAACGTGGAGATGCACCTGAAGCAGAT	30mer		Mutation:	(2001)
Neo3	TGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATG	30mer		900	

Tab. 2.1b: Oligonukleotide für die RT-PCR

Bezeichnung	Accession	Sequenz 5'→3'	Grösse	AT	IS	Amplikon
mCx26FOR	BC013634	GACCCGCTTCAGACCTGCTCCTTAC	25mer	64	+	658
mCx26REV		GCCTGGAAATGAAGCAGTCCACTGT	25mer			
mCx30up1	Z70023	GTTTAAAGAATAAGCCTGCACGATGGACTGG	30mer	60	-	1058
mCx30down1		ACATAGGACTTGTCCAGGTGACTCCAAGGC	30mer			
mCx30up2	Z70023	TGAACAAGCACTCTACCAGCATAGGGAAGG	30mer	60	-	969
mCx30down2		CAGTTGTCACGAGGGCTTGGTTTTTCAGAGA	30mer			
mCx30.3FOR	M91443	CTCCAGGGAATCCTGAGTGGTGTG	25mer	64	-	868
mCx30.3REV		CTGCAGAAGACCACACTCCCTTCG	25mer			
mCx30.3FOR2	M91443	AACAAGTACTCCACGGCCTGGGC	25mer	64	-	804
mCx30.3REV2		GCTTCAGTGGACAGACAGTCCACT	25mer			
mCx31up1	X63099	AGGAATCAAGGCCAGGTCTGAGCAGAGAGA	30mer	64	-	1060
mCx31down1		GGAACTGGGTCTGTTATGCTACCTAAACC	30mer			
mCx31.1FOR	M91236	TGACATGAATTCTGATGCTTGCTG	25mer	64	+	978
mCx31.1REV		GATTCTGGAACCTTCCAGGTCATG	25mer			
mCx36FOR	AF226992	AGAACGTGCCCGGTACTGCCAG	24mer	64	+	980
mCx36REV		CGAAATGGGAACACTGACTCGAGG	26mer			
mCx36FOR2	AF226992	TTGTCTGCTGCCCTCCGGATGCACA	25mer	60	+	916
mCx36REV2		CGTATCTCATAGACTGACTTCCTC	25mer			
mCx40FOR	X61675	CAGTTGAACAGCAGCCAGAGCCTG	25mer	64	+	837
mCx40REV		NM008121	CTGGTGCTTGTCCACACCCTGCC			
mCx40FOR2	X61675	AAGAAGCCAACCTCCAGGGAGGAGG	25mer	64	+	791
mCx40REV2		NM008121	TGACTTGCCAAAGCGCTGTCCGAT			
mCx43up2	NM010288	CGAGGTATCAGCACTTTTCTTTCATTGGGG	30mer	64	+	1102
mCx43down2		GCTTGTGTGTAATTGCGGCAGGAGGAATTGT	30mer			
mCx45up1	X63100	CATACAGTCTATACACCTGGCGCCAGGGAA	30mer	64	+	1119
mCx45down1		GTGAGTCTCGAATTGTCCCAAACCCTAAGT	30mer			
mCx47FOR	NM080454	CTGTCTCATGTGCGCTTCTGGGTC	25mer	64	-	683
mCx47REV		CGACGGCCGCGCACAGCATCCTGC	25mer			
mCx47FOR2	NM080454	GATAGTGGTCATCTCCACACCTTC	25mer	64	-	627
mCx47REV2		CTGCCGAGACCCAGGTGCGCCATC	25mer			
mCx57FOR	AJ010741	GGTACTTGGTGTGCTGCTGAGGAC	26mer	64	-	1319
mCx57REV		CAGTGGCGGACGGCAGAGGTGATGG	25mer			
mCx57FOR2	AJ010741	TGATGAACAGTCCGCCTTTGCCTG	25mer	64	-	1213
mCx57REV2		TGAGCTTCCTGAGTCACTATGCCG	25mer			
β-actin-up	X03672	CGTGGGCCGCCCTAGGCACCAG	23mer		+	243
β-actin-down		TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG	23mer			
GLUT3-FOR1	NM011401	CAGAGATCCTGCAGCGCTTG	22mer	62	+	400
GLUT3-REV1		TTAGTAACAGCGAAATCGTCAT	23mer			
GLUT1-FOR1	NM011400	CGGGTATCAATGCTGTGTTC	20mer	62	+	466
GLUT1-REV1		AGCACCGTGAAGATGATGAAG	21mer			

Accession: NCBI-Datenbankeintrag

IS: Intronüberspannende Primer sind durch (+) gekennzeichnet

AT: verwendete Annealing-Temperatur (°C) bei der PCR

Amplikon: Größe des PCR-Produktes in bp

2.1.8 Vektoren

Die im Folgenden aufgeführten Vektoren wurden in dieser Arbeit hergestellt. Die Plasmidkarten befinden sich im Anhang 7.1. Das cDNA-Fragment konnte jeweils durch einen EcoRI-Verdau ausgeschnitten und als Sonde verwendet werden.

pCRII_Cx26	658 bp cDNA-Fragment aus dem OLR des Maus Cx26, amplifiziert mit den Primern mCx26FOR und mCx26REV
pCRII_Cx30	969 bp cDNA-Fragment aus dem OLR des Maus Cx30, amplifiziert mit den Primern mCx30up2 und mCx30down2
pCRII_Cx30.3	804 bp cDNA-Fragment aus dem OLR des Maus Cx30.3, amplifiziert mit den Primern mCx30.3FOR2 und mCx30.3REV2
pCRII_Cx31	1060 bp cDNA-Fragment aus dem OLR des Maus Cx31, amplifiziert mit den Primern mCx31up1 und mCx31 down1
pCRII_Cx31.1	978 bp cDNA-Fragment aus dem OLR des Maus Cx31.1, amplifiziert mit den Primern mCx31.1FOR und mCx31.1REV
pCRII_Cx43	1102 bp cDNA-Fragment aus dem OLR des Maus Cx43, amplifiziert mit den Primern mCx43up1 und mCx43 down1
pCRII_Cx45	1119 bp cDNA-Fragment aus dem OLR des Maus Cx45, amplifiziert mit den Primern mCx45up1 und mCx45down1
pCRII_Cx47	627 bp cDNA-Fragment aus dem OLR des Maus Cx47, amplifiziert mit den Primern mCx47FOR2 und mCX47REV2
pCRII_Cx57	1213 bp cDNA-Fragment aus dem OLR des Maus Cx57, amplifiziert mit den Primern mCx57FOR2 und mCx57REV2

Folgende Vektoren mit einer cDNA-Sonde wurden zur Verfügung gestellt:

Cx32	Vektor pGEM-3 mit einem 1,5 kb cDNA-Fragment, das die kodierende Region des Ratten Cx32 enthält (Paul, 1986).
Cx40	Vektor SP64T mit einem 600 bp cDNA-Fragment des Ratten Cx40. Das Fragment wurde über BglIII/XhoI isoliert (Haefliger <i>et al.</i> , 1992)
Aktin	3,6 kb cDNA-Fragment des humanen β -Aktin (Moos und Gallwitz, 1983)
Mash2	Vektor pBKS ⁺ mit einem 2 kb cDNA Fragment des Maus <i>Mash2</i> . Sondenpräparation erfolgte über EcoRI (Nakayama <i>et al.</i> , 1997)
PI-1	800 bp cDNA-Fragment des Maus <i>PI-1</i> im Vektor pGEM2. Die Sondenpräparation erfolgte über HindIII/PstI (Colosi <i>et al.</i> , 1987)
Tpbpa	750 bp cDNA-Fragment des Maus <i>Tpbpa</i> . Die Sondenpräparation erfolgte über XbaI/HindIII (Lescisin <i>et al.</i> , 1987)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Mengenbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung des DNA bzw. RNA-Gehalts einer Probe erfolgte durch Photometrie im GeneQuant II Photometer der Firma Pharmacia (Freiburg). Die optische Dichte der Probe wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm, unter Verwendung einer Quarzküvette, gegen *Aqua bidest* als Leerwert bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1 entsprach einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in Gelen mit 0,8-2,0 Gew.% Agarose und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TBE als Gel- und Laufpuffer. Die Elektrophorese wurde in Flachbettkammern bei einer konstanten Stromstärke von 50-80 mA (100-160 V) durchgeführt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben in 1x DNA-Probenpuffer aufgenommen. Die Visualisierung der aufgetrennten DNA erfolgte in UV-Licht. Als Größenmarker diente je nach Fragmentgröße eine 1 kb bzw. eine 100 bp Leiter (Genecraft). Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mittels des Gel Images System von INTAS (Göttingen)

1 x DNA-Probenpuffer

0.15 Gew.% Glycerin

0.004 Gew.% Bromphenolblau

0.004 Gew.% Xylenzanol

in 1x TBE-Puffer

TBE-Puffer (1x)

0,1 M Tris/HCl pH 8,5

89 mM Borsäure

2 mM EDTA

2.2.3 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in formaldehydhaltigen Agarosegelen. Unter diesen Bedingungen wurde die Bildung von Sekundärstrukturen verhindert und die RNA nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Das verwendete Gel enthielt 1,68 Gew.% Agarose und 6,6 Vol.% Formaldehyd in 1x MOPS-Puffer. Die RNA wurde in 3 µl *Aqua bidest* aufgenommen und mit 12 µl RNA-Probenpuffer versetzt. Nach 15 Min. Denaturierung bei 60°C wurden 1,5 µl RNA-Ladepuffer zugesetzt und der Ansatz auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei

einer Spannung von 100 V in 1x MOPS als Laufpuffer. Nach Beendigung wurde das Gel unter UV-Licht dokumentiert und die RNA anschließend mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert.

RNA-Probenpuffer

8,26 Vol.% Formaldehyd

62,5 Vol.% Formamid

83 µg/ml Ethidiumbromid

in 1x MOPS-Puffer

RNA-Ladepuffer

50 Vol.% Glycerin

1 mM EDTA

0.004 Gew.% Bromphenolblau

0.004 Gew.% Xylencyanol

2.2.4 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem ausgeschnittenem Gelstück erfolgte unter Verwendung des MiniElute Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach den Instruktionen des Herstellers.

2.2.5 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Die Anreicherung von Nukleinsäuren und die Abtrennung von Verunreinigungen wurde durch eine Ethanolfällung erreicht. Der Ansatz wurde dazu mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Vol. 100% Ethanol versetzt und für 30 Min. bei -70°C inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (14000 UpM, 20 Min., 4°C) wurden die präzipitierten Nukleinsäuren sedimentiert, anschließend mit 70 Vol.% Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

2.2.6 Restriktion von DNA

Die Restriktionsendonukleasen wurden von der Firmen Roche (Mannheim), MBI-Fermentas (München), Hybaid-AGS (Heidelberg) sowie Takara (Taufkirchen) bezogen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer eingesetzt. Zur vollständigen Restriktion von 1,5 µg Plasmid-DNA wurde diese für 90 Min. mit 5 Units Enzym bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Die Kontrolle der Restriktion erfolgte in einer Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.7 Ligation

Die Ligation eines gereinigten PCR-Fragmentes erfolgte mittels der überhängenden 3'-Adenosin-Enden, die bei der Amplifikation durch eine *Taq*-Polymerase entstehen, in den pCRII-Klonierungsvektor (Invitrogen), der komplementäre Thymidin-Überhänge besitzt. In einem 10 µl Ligationsansatz wurden 50 ng TA-Vektor, 50-100 ng gereinigtes PCR-Produkt, 1 µl Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA Ligase (4 Weiss Units) vermischt. Der Ansatz wurde für mindestens 4 h bei 14°C inkubiert und anschließend transformiert.

2.2.8 Chemische Transformation

Zur Transformation eines Ligationsansatzes wurden chemisch-kompetente *E. coli* TOP10F' Bakterien (Invitrogen) eingesetzt. Ein Aliquot der Bakterien wurde aus Eis aufgetaut, mit dem gesamte Ligationsansatz vermischt und für 30 Min. in Eis inkubiert. Es erfolgte eine Hitzeschockbehandlung für 30 Sek. bei 42°C im Heizblock. Danach wurde der Ansatz sofort für 2 Min. in Eis gestellt, anschließend mit 250 µl SOC Medium versetzt und für 1 h bei 37°C im Schütteininkubator zur Resistenzausbildung bebrütet. Auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden 50 µl 40 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid und 4 µl 1M IPTG ausgespatelt. 25 bzw. 225 µl der Bakteriensuspension wurden dann jeweils auf der Agarplatte ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

2.2.9 Elektrotransformation von *E. coli*-Zellen

Zur routinemäßigen Vermehrung von Plasmid-DNA wurde diese durch Elektroporation in kompetente *E. coli* DH10b transformiert. Aus einer Vorkultur wurden 250 ml LB-Medium 1:100 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 bebrütet (220 UpM, 37°C). Die Kultur wurde anschließend für 15 Min. auf Eis inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten kontinuierlich auf Eis. Durch Zentrifugation (4000 x g, 15 Min., 4°C) wurden die Bakterien sedimentiert, anschließend in 250 ml eiskaltem sterilen *Aqua bidest* aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 mal durchgeführt und die Bakterien danach in 5 ml 10 Vol.% Glycerin aufgenommen. Es erfolgte ein Zentrifugation bei 3000 x g (15 Min., 4°C) nach der das Sediment in 1 ml 10 Vol.% Glycerin aufgenommen wurde. Die Konzentration der

Suspension lag bei $1-3 \times 10^{10}$ Bakterien. Von der Suspension wurden 40 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -75°C gelagert.

Zur Transformation mit Plasmid-DNA wurde ein Aliquot der Zellen auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA vermischt und in eine 2 mm Elektroporationsküvette (Eurogentec, Seraing, B) gegeben. Bei einer Voreinstellung von 25 μF elektrischer Kapazität, 2,5 kV elektrischer Spannung und 800 Ω elektrischem Widerstand wurde im Elektroporator (Bio-Rad, München) ein Impuls auf die Küvette gegeben, der die Bakterienmembran kurzzeitig durchlässig für die DNA machte. Nach dem Impuls wurden sofort 1 ml eiskaltes LB-Medium in die Küvette pipettiert, der Ansatz in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 45 Min. bei 220 UpM, 37°C geschüttelt. Auf einem entsprechenden Selektivnährboden wurde ein Aliquot des Transformationansatzes ausplattiert und für 18 h bei 37°C bebrütet.

2.2.10 Präparation von Plasmid DNA im analytischen Maßstab

Diese Methode wurde für die schnellen Isolation von Plasmid-DNA zur Identifizierung rekombinanter Bakterienklone eingesetzt. Die Bakterien aus einer 3 ml ÜN-Kultur wurden sedimentiert (10000 UpM, 1 Min., RT), und in 250 μ l GTE-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 0,5 ml Lysispuffer und mehrmaliger Inversion des Reaktionsgefäßes erfolgte die Lyse der Bakterien für 5 Min. bei RT. Nach Zugabe von 0,5 ml 3 M Na-Acetat pH 5,2 wurde der Ansatz für 5 Min. auf Eis inkubiert und anschließend zur Entfernung von Zelltrümmern und chromosomaler DNA zentrifugiert (140000 UpM, 15 Min., 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur DNA-Fällung mit 800 μ l 100% Ethanol versetzt. Nach einer Zentrifugation (14000 UpM, 20 Min., 4°C) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

GTE-Puffer

50 Mm Tris/HCl pH 7,5

50 mM Glucose

10 mM EDTA

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A

1 Spatelspitze Lysozym

Lysispuffer

0,2 M NaOH

1,0 Gew.% SDS

2.2.11 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation größerer Mengen reiner Plasmid-DNA wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit eingesetzt. 150 ml LB Medium wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum und 20 µl einer ÜN-Bakterien-Kultur angeimpft und für 18 h in einem Orbitalschüttler bei 200 UpM, 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA aus den pelletierten Bakterien wurden entsprechend des Kit-Protokolls isoliert und in 300 µl TE-Puffer aufgenommen. Ausbeute und Reinheit der Präparation wurde photometrisch bestimmt.

2.2.12 Isolation von genomischer DNA aus Geweben und Säugerzellen

Diese Methode wurde zur Gewinnung von genomischer DNA aus den Schwanzspitzen bzw. Ohrbiopsien von Mäusen oder aus TS-Zellkulturen eingesetzt. Die isolierte DNA konnte für die anschließende PCR-Genotypisierung der transgenen Mäuse bzw. Gen defizienten Zellklone eingesetzt werden.

2.2.12.1 DNA-Isolation aus Schwanzspitzen und Ohrbiopsien

Etwa 5 mm einer Schwanzspitze bzw. 2 mm von der Ohrspitze einer Maus wurden mit 0,5 ml Lysispuffer ÜN bei 55°C im Rollofen inkubiert. Durch Zentrifugation (14000 UpM, 5 Min., RT) wurden unverdaubare Haare sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol versetzt. Durch heftiges Schütteln des Ansatzes wurde die DNA ausgefällt und als weißer Faden sichtbar. Durch eine Zentrifugation wurde dieser sedimentiert (14000 UpM, 20 Min., 4°C), mit 70% Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 50 µl *Aqua bidest* resuspendiert.

Lysispuffer: 80 µg/ml Proteinase K
100 mM Tris/HCl pH 8,5
5 mM EDTA
0,2 Gew.% SDS
200 mM NaCl

2.2.12.2 DNA-Isolation aus Zellkulturen

Von einer adhärennten Zellkultur wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Moscona gewaschen. Anschließend wurden 0,5 ml Lysispuffer zugegeben und die

Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt. Das Zelllysate wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, über Nacht bei 55°C inkubiert und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

2.2.13 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennter RNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte mittels Kapillarblot. Der Blotaufbau erfolgte wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. Als Transferpuffer diente 20 x SSC. Nach 12-18 h Transfer wurde die RNA durch 2 h Inkubation bei 80°C auf der Membran fixiert.

2.2.14 Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von doppelsträngiger DNA erfolgte nach dem Protokoll des Megaprime Labelling Systems (Amersham, Freiburg). Sie basierte auf dem Einsatz von Hexanukleotiden zufälliger Sequenz, die an die denaturierte DNA-Einzelstränge hybridisierten und als Starter für die Synthese des komplementären DNA Stranges dienten. Die Synthese des komplementären DNA-Stranges erfolgte durch das Klenow-Enzym unter Einbau von α -(³²P)dCTP anstelle des dCTP. Zur Markierung wurden 25-50 ng DNA mit *Aqua bidest* auf ein Volumen von 29 μ l eingestellt. Nach der Zugabe von 5 μ l Primerlösung wurde die DNA für 5 Min. in kochendem Wasser denaturiert. Nach Abkühlung auf RT wurden 10 μ l Reaktionspuffer, 4 μ l α -(³²P)dCTP und 2 μ l Klenow-Enzym hinzugeben und der Ansatz für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der markierten DNA von den nicht eingebauten Radionukleotiden erfolgte unter Verwendung des MiniElute PCR Purification Kit. Die DNA-Sonde wurde durch 100 μ l TE-Puffer von der Säule eluiert.

2.2.15 Hybridisierung mit einer radioaktiven DNA-Sonde

Die Membran mit der fixierten RNA wurde zunächst für mindestens 3 h mit 10 ml Prähybridisierungspuffer bei 42°C im Rollinkubator inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss daran wurde die radioaktive DNA-Sonde für 5 Min. bei 100°C denaturiert, anschließend für 2 Min. auf Eis abgekühlt und zu den Membranen in den Prähybridisierungspuffer gegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 12-18 h bei 42°C. Nach der Hybridisierung wurde die Membran durch stringentes

Waschen bei 60°C in mehreren Schritten von unspezifischen Bindungen befreit: 30 Min. in 1 x SSC; 0.1% SDS, gefolgt von 30 Min. in 0,5 x SSC; 0.1% SDS und 60 Min. in 0,2 x SSC; 0,1% SDS. Nach dem Einschweißen der Membran in Klarsichtfolie erfolgte die Autoradiographie mit einem Röntgenfilm in Filmkassetten mit Intensivierungsfolie bei –80°C für 1-10 Tage.

Prähybridisierungspuffer: 10 Gew.% Dextransulfat
 50 Vol.% Formamid
 0,8 Gew.% SDS
 1 mg/ml Heringssperm DNA
 1 M NaCl

2.2.16 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Doppelstrang DNA erfolgte durch die Firma MWG Biotech (Reutlingen). Dazu wurden 2 µg einer zu sequenzierenden DNA gefällt und als Lyophilisat zusammen mit einem spezifischen Primerlösung (10 pmol/µl) eingeschickt. Die Analyse der Sequenzierungsdaten erfolgte mittels der BLAST Software und der Datenbank des NCBI.

2.2.17 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifizierung eines definierten DNA Abschnitts, der durch die Sequenz zweier Primer spezifiziert ist. Die PCR wurde zur Genotypisierung von transgenen Mäusen und TS-Zelllinien eingesetzt, sowie zum Nachweis von spezifischen cDNA-Sequenzen in RT-Ansätzen. Ein Reaktionsansatz

<i>ad</i> 50 µl beinhaltete:	Matrize	speziell
	<i>Taq</i> -Reaktionspuffer	Endkonzentration: 1 x
	MgCl ₂	1,5 mM
	dNTPs	je 200 µM
	Primer	je 50 pmol
	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	2,5 Units

Der Ansatz wurde im Thermocycler (Biometra) mit Deckelheizung nach folgendem Schema inkubiert:

Initiale Denaturierung:	94°C	2 Min.	
Denaturierung	94°C	30 Sek.	
Annealing	64°C	40 Sek.	33 Zyklen
Elongation	72°C	40 Sek.	
Finale Elongation	72°C	5 Min.	

2.2.18 RT-PCR-Analyse

Bei der reversen Transkription wird ausgehend von isolierter mRNA ein komplementärer DNA Strang (cDNA) durch das Enzym reverse Transkriptase synthetisiert. Als Primer für diese Reaktion dienen Thymidinoligomere, die an den poly-Adenosin-Schwanz der mRNA hybridisieren. Der durch eine reverse Transkription synthetisierte cDNA-Strang dient als Matrize für die Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnittes durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase. Die RT-PCR ermöglicht daher den sehr sensitiven und spezifischen Nachweis von RNA-Transkripten in Zellen oder Geweben.

2.2.18.1 DNaseI Verdau von RNA

Der RT-Reaktion geht ein DNaseI Verdau voraus, um Kontaminationen mit chromosomaler DNA zu entfernen. Dazu wurden 2 µg isolierter RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 16 µl eingestellt und anschließend 2 µl DNase Puffer und 2 µl DNaseI zugesetzt. Nach 15 Min. Inkubation bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl EDTA gestoppt und die DNaseI durch 10 Min. Inkubation bei 65°C inaktiviert.

2.2.18.2 Reverse Transkription

Ein 50 µl RT-Ansatz beinhaltet folgende Komponenten:

Matrize	2 µg DNA-freier RNA
Reaktionspuffer	Endkonzentration: 1 x
dNTPs	je 500 µM
DTT	4 µM
Oligo-dT ₁₂₋₁₈ Primer	10 ng
M-MLV Reverse Transkriptase	400 U
DEPC-Wasser	ad 50 µl

Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C im Thermocycler (Biometra) inkubiert und anschließend für 5 Min. zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase auf 95°C erhitzt und bei –20°C gelagert.

2.2.18.3 RT-PCR

Zur Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz (entsprechend Abschnitt Polymerase-Kettenreaktion) wurden routinemäßig 4 µl des reversen Transkriptionsansatzes als Matrize eingesetzt. Wenn die entsprechenden Informationen in der Datenbank (NCBI) zugänglich waren, wurden intronüberspannende Primer konstruiert, um falsch positive Ergebnisse durch mögliche Verunreinigungen mit genomischer DNA zu verhindern. Zur internen Kontrolle wurden jedem RT-PCR-Ansatz intronüberspannende β-Aktin-spezifische Primer zugesetzt (je 10 pmol). Sollte der semiquantitative Nachweis eines bestimmten Transkripts durch die RT-PCR erfolgen, so wurde in den zu vergleichenden Ansätzen die gleiche RNA-Menge eingesetzt und eine Zyklenzahl von 25 gewählt.

2.3 Tiere

2.3.1 Logistik

Als Organspender bzw. Versuchstier diente die Labormaus: Gattung: *Mus*, Familie: *Muridae*, Ordnung: *Rodentia*.

Die Zucht und Haltung der Versuchstiere erfolgte im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen unter der Leitung von Prof. Dr. Militzer. Die Mäuse wurden in einer kontrollierten, pathogenfreien Umgebung mit reguliertem Licht/Dunkel Zyklus (12h/12h) gehalten und hatten unbegrenzten Zugang zu Nahrung und Wasser. Verwendet wurden autoklavierte Käfige mit Filterhaube.

Alle Organentnahmen und Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Gesetzen der Bundesrepublik Deutschland sowie des Landes Nordrhein-Westfalen und mit behördlicher Erlaubnis durchgeführt (Tierschutznummer G588/00; G589/00).

Das Ansetzen einer natürlichen Verpaarung erfolgte nach Whitten und Champlin (1978). Durch den konstanten Licht/Dunkel Zyklus unter dem die Tiere gehalten wurden, erfolgte die Fertilisation gegen Mitternacht (Sommerzeit), ca. 2 h nach der

Ovulation. Zur Verpaarung wurde ein Männchen mit 1 bis 2 Weibchen am Nachmittag zusammengesetzt. Die erfolgte Kopulation konnte am Morgen des nachfolgenden Tages durch das Auftreten eines vaginalen Plugs erkannt werden. Um 12 Uhr mittags befanden sich die Embryonen laut Konvention im Stadium 0,5 *dpc*.

2.3.2 C57BL/6J

Zur Gewinnung von Wildtyp Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien, sowie als Hintergrundstamm zum Einkreuzen transgener Mäuse wurde der Inzuchtstamm C57BL/6J aus der Zucht des Zentralen Tierlabors des Universitätsklinikum Essen verwendet.

2.3.3 Cx26-defiziente Maus

Die Cx26-defiziente Mauslinie wurde von Dr. Gabriel in der AG von Prof. Dr. Willecke (Universität Bonn) erzeugt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Durch ein gerichtetes Targeting wurde eine 1065 bp umfassende Sequenz aus dem OLR des Exon2 durch eine *PKG*-Promotor gesteuerte *neo*-Resistenzkassette ersetzt (Gabriel *et al.*, 1998). Aufgrund der embryonalen Letalität einer homozygoten Inaktivierung des Cx26-Gens wurde die Linie als heterozygote gezüchtet. Die Genotypisierung erfolgte durch PCR unter Verwendung der Primer Cx26-5', Cx26-3' und Cx26-*neo*.

2.3.4 Cx31-defiziente Maus

Die Cx31-defiziente Mauslinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Willecke (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Durch ein gerichtetes Targeting wurde die gesamte kodierende Region des Cx31-Gens stromabwärts vom Startkodon sowie der 3'-untranslatierte Bereich durch ein *lacZ* Reportergen und ein *neo^R*-Gen, unter der Kontrolle des *MCI*-Promotors, ersetzt (Plum *et al.*, 2001). Der Hintergrundstamm war C57BL/6. Die Cx31-defizienten Tiere wurden über zwei Generationen in den C57BL/6J Stamm des ZTL eingekreuzt und als Cx31^{+/-} sowie Cx31^{-/-} Tiere gehalten. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR unter Verwendung der Primer GT1, GT2 und GT3 in einem 50 µl Ansatz (Plum *et al.*, 2001).

2.3.5 Cx43-defiziente Maus

Die Cx43-defiziente Mauslinie wurde aus dem Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Bei dieser Linie wurde durch ein gerichtetes Targeting ein promotorloses *neo^R*-Gen hinter die zweite Aminosäure des Cx43 geschaltet (Reaume *et al.*, 1995). Der Hintergrundstamm war C57/BL6J. Die Mauslinie konnte aufgrund der postnatalen Letalität einer homozygoten Cx43-Defizienz nur als heterozygote Linie erhalten werden. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR (Gramsch *et al.*, 2001) unter Verwendung der Primer Cx43extern, Cx43intern und neo3 in einem 50 µl Ansatz.

2.3.6 Cx31/Cx43-defiziente Maus

Durch Kreuzung wurde in dieser Arbeit die Linie Cx31/Cx43 erstellt, die zur Analyse der Folge einer gleichzeitigen Inaktivierung von Cx31 und Cx43 diene. Aufgrund der hohen Verlustrate von Cx31^{-/-} Embryonen und der Letalität einer homozygoten Inaktivierung des Cx43-Gens erfolgte die Zucht durch Verpaarung von Cx31^{-/-}/Cx43^{+/-} mit Cx31^{+/-}/Cx43^{+/+} Tieren. Für die Gewinnung von Doppelknockout Plazenten wurden Cx31^{+/-}/Cx43^{+/-} Weibchen mit Cx31^{-/-}/Cx43^{+/-} Männchen verpaart.

2.3.7 Nacktmaus

Die TS-Zell-Injektionen wurden in athymische Nacktmäuse (Han: NMRI nu/nu) aus der Zucht des ZTL durchgeführt. Verwendet wurden männliche Tiere im Alter von 4 Wochen bis 4 Monate.

2.4 Kultivierung von Säugerzellen

Die Inkubation von Säugerzellen wurde in Brutschränken bei 37°C, 10% CO₂ Partialdruck und wassergesättigter Atmosphäre durchgeführt. Alle Arbeiten an den Zellkulturen fanden in Sterilbänken mit Laminar-Luftstrom statt. Für die Kultur wurden Zellkulturschalen und Lochplatten der Firma Falcon (Heidelberg) verwendet.

2.4.1 Passagieren von adhärennten Zellen

Von einer konfluenten Kultur wurde das Medium abgesaugt und die Zellen kurz mit Moscona gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen mit vorgewärmter Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und bis zur Ablösung der Zellen im Brutschrank inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml Medium gestoppt und die Zellen bei 800 UpM für 5 Min. in einer Haereus Tischzentrifuge sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und ein Aliquot in einer neuen Zellkulturschale ausplattiert.

2.4.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Kultur wurde das CASY-Counter System (Schärfe, Reutlingen) eingesetzt. Die Zellen einer Kultur wurden durch Trypsinierung abgelöst, in Medium resuspendiert und ein Aliquot in CASYton (Schärfe, Reutlingen) verdünnt. Die Zellzahl wurde im CASY-Counter bestimmt, wobei die Programmparameter so eingestellt waren, dass alle Zellen mit einem Durchmesser von 9-90 µm gezählt wurden.

2.4.3 Kryokonservierung von Säugerzellen

Die Langzeitlagerung von Säugerzellen fand in Kryoröhrchen bei -196°C in flüssigem Stickstoff statt. Zum Einfrieren wurden $10^6 - 5 \times 10^6$ Zellen in 0,9 ml frischem Kulturmedium aufgenommen, in ein 2 ml Kryoröhrchen (Greiner, Nürtingen) überführt und mit 0,1 ml DMSO versetzt. Das Röhrchen wurde zunächst für 24 h bei -80°C inkubiert und danach in den flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurde ein Röhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im 37°C Wasserbad geschwenkt. Das zugesetzte DMSO verhinderte dabei die Bildung von Eiskristallen, die zur Zerstörung der Zellen führen. Die aufgetauten Zellen wurden mit 5 ml frischem Medium vermischt, abzentrifugiert anschließend in einer entsprechenden Menge Medium aufgenommen und ausplattiert.

2.4.4 Präparation embryonaler Mausfibroblasten

Embryonale Mausfibroblasten (EMFI) dienen der Herstellung von konditioniertem Medium für die Trophoblast-Stammzellkultur. Sie produzieren einen noch nicht

identifizierten Wachstumsfaktor, der für die Generierung und Kultur von TS-Zellen essentiell ist. Zur Isolierung von EMFI wurde einer schwangeren Maus am Tag 12,5-14,5 *post coitum* der Uterus entnommen. Unter sterilen Bedingungen wurde der Uterus zunächst 2 mal in Moscona gewaschen und anschließend die Embryonen freipräpariert, wobei alle Gewebereste von Uterus, Plazenta und Fruchtblase entfernt wurden. Nach zweimaligem Waschen der Embryonen in DMEM wurde der Kopfschädel unterhalb der Augen, die Extremitäten, der Schwanz und die blutführenden Organe entfernt. Die Rumpfe wurden 3 mal in DMEM gewaschen und anschließend mit einem sterilen Skalpell fein zerkleinert. Der Gewebebrei wurde in 35 ml Disksektionsmedium aufgenommen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die DNase I im Dissektionsmedium verhinderte ein Gelatinisieren der Präparation durch freigesetzte genomische DNA. Der Ansatz wurde für 10 Min. bei 180 UpM, 37°C geschüttelt und nach kurzem Absetzen von groben Gewebestücken wurde der Überstand abgenommen und mit 1 Vol. EMFI-Medium abgestoppt. Auf die abgesetzten Gewebestücke wurden erneut 35 ml Dissektionsmedium gegeben und der Ansatz wie beschrieben aufgearbeitet. Insgesamt wurde dies 3 mal durchgeführt. Die gesammelten und abgestoppten Überstände wurden vereinigt, die Zellen abzentrifugiert und in EMFI-Medium mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen auf 10 cm Kulturschalen ausplattiert. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% wurden die Zellen eingefroren (2 Schalen pro Kryoröhrchen).

Dissektionsmedium: 200 µg/ml DNase I (Grad II) in Trypsin/EDTA-Lösung

2.4.5 Herstellung von Feeder-Zellen

Zur Herstellung von konditioniertem Medium und zur Kokultur mit TS-Zellen wurden die EMFI durch Mitomycin C in der G1-Phase der Mitose arretiert, um ein Überwachsen zu verhindern. Dazu wurde eine konfluente EMFI-Kultur mit 10 µg/ml Mitomycin C in EMFI-Medium überschichtet und für 4 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen (als Sondermüll entsorgt) und die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Die Feeder-Zellen wurden danach eingefroren oder konnten maximal 10 Tage verwendet werden.

2.4.6 Herstellung von Fibroblasten-konditioniertem Medium

Zur Herstellung von Fibroblasten- (EMFI) konditioniertem TS-Medium wurden 10,5 ml TS-Medium auf eine 10 cm Kulturschale mit konfluenten Feeder-Zellen gegeben und für 72 h inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, zentrifugiert (5000 UpM, 15 Min. RT), durch einen Sterilfilter (0,2 µm Porengröße) filtriert und bei – 20°C gelagert.

2.4.7 Trophoblast-Stammzellkultur

Etablierte Trophoblast-Stammzellen wurden in FK-TS-Medium bestehend aus: 75% EMFI-konditioniertem Medium, 25% TS-Medium, 25 ng/µl FGF4, und 1 µg/ml Heparin kultiviert. FGF4 und Heparin wurde einzelnen Aliquots von TS-Medium zugesetzt und das Medium sofort benutzt. Unter diesen Kulturbedingungen wurden die TS-Zellen im undifferenzierten und proliferativen Zustand gehalten (Stammzell-Bedingungen). Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und 1 Teil von 10 bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% passagiert. Durch Entzug von FK-TS-Medium, FGF4 und Heparin wurde die Differenzierung der TS-Zellen induziert (Differenzierungs-Bedingungen).

2.4.8 Generierung von Trophoblast-Stammzellen

Die Generierung von TS-Zelllinien fand in Anwesenheit von Feeder-Zellen statt, die einen noch unbekanntem Faktor produzieren, der essentiell für die Erhaltung des Stammzellpotentials der TS-Zellen ist. Einmal etablierte TS-Zelllinien können ohne Feeder-Zellen, nur in Anwesenheit von FK-TS-Medium kultiviert werden.

Eine Blastozyste wurde individuell in die Vertiefung einer 24well Platte auf 2×10^5 vorplattierte Feeder-Zellen gegeben und in 1 ml 75% FK-TS-Medium kultiviert. Im Folgenden streifte die Blastozyste die *zona pellucida* ab, ahärierte an die Kulturschale und bildete einen Trophoblast *outgrowth*, der am 3. Tag nach Plattierung durch Zugabe von 100 µl Trypsin/EDTA-Lösung für 15 Min. bei 37°C inkubiert und mit Hilfe einer Pasteurpipette mechanisch disaggregiert wurde. Anschließend wurde 1 ml neues Medium zugegeben und der Ansatz im selben Kulturwell weiter inkubiert. Ab Tag 6 bildeten sich erste Kolonien von TS-Zellen, die bei einer Konfluenz von 50% komplett in ein 6well mit vorplattierten Feeder-Zellen passagiert wurden. Die weitere

Kultur erfolgte bis zur Passage 9 auf Feeder-Zellen. Ab Passage 10 wurden die TS-Zellen ohne Feeder-Zellen nur in 75% FK-TS-Medium kultiviert.

2.4.9 Differenzierungsreihen von TS-Zellen

Undifferenzierte TS-Zellen wurden mit einer Dichte von 40000 Zellen/6well in FK-TS-Medium ausplattiert. Nach 24 h (Tag 0) wurde das Medium durch TS-Medium ersetzt, wodurch die Differenzierung induziert wurde. An Tag 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 und 13 wurden die Zellen von jeweils 4-6 wells abgekratzt, die Gesamt-RNA isoliert und eine Northern Blot-Analyse durchgeführt.

2.4.10 Zell-Proliferationsanalyse

In einer 12well-Platte wurden 5000 TS-Zellen entweder in FK-TS-Medium oder in TS-Medium ausplattiert (Tag 0). Die Zellen wurden an Tag 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 und 17 durch Trypsinierung gesammelt und die Gesamtzellzahl im CASY-Counter bestimmt. Für jeden Tag wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt.

Um zu ermitteln, ob der Unterschied in der Proliferation von heterozygoten und homozygoten *Cx31*-defizienten TS-Zellen statistisch signifikant war, wurde ein unpaariger Students *t*-Test durchgeführt.

2.4.11 TS-Zell Injektionen ins Nacktmausmodell

Für die Injektion wurden TS-Zellen durch Trypsinierung gewonnen und jeweils 10^7 Zellen in 250 μ l 100% FK-TS-Medium, mit 250 ng/ μ l FGF4 ng 10 μ g/ml Heparin aufgenommen. Die Zellen wurden subkutan in die rechte und linke Flanke einer Nacktmaus injiziert und das Tumorwachstum durch tägliche Messung verfolgt. Das Tumolvolumen wurde unter der Annahme einer ellipsoiden Form berechnet. Am Ende des Versuchs wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Die Tumore wurden präpariert, in 4% Formalin fixiert und für die Morphologie in Paraffin oder Technovit (Kulzer, Frankfurt) eingebettet.

2.5 Morphologische Methoden

2.5.1 Histologische Analyse

Die Gewebe wurden für 24 h in 4% Formalin fixiert, anschließend über 4 Tage im Einbettautomaten (Citadell 1000 Shandon, Frankfurt) durch eine aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Alternativ zu Paraffin konnte eine Einbettung in Technovit (Kulzer, Frankfurt), einem kalt polymerisierenden Kunststoff, durchgeführt werden. Die Einbettung in Technovit erfolgte nach der Vorschrift der Firma Kulzer (Frankfurt) und unter Verwendung der firmeneigenen Produkte. Am Mikrotom wurden anschließend Präparatschnitte mit einer Schichtdicke von 7 µm hergestellt, auf Superfrost-Objekträger (Novaglas, Bern, Schweiz) aufgezogen und getrocknet.

2.5.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die Paraffinschnitte wurden zunächst in Histoclear entparaffiniert, anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (96-40%) hydriert und mit einer Hämatoxylin-Eosin-Lösung nach Shandon gefärbt. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Histomount eingedeckt. Die Technovitschnitte konnten ohne Vorbehandlung HE-gefärbt werden. Anschließend erfolgte eine alkoholische Dehydrierung und die Eindeckung mit Histomount.

2.5.3 Immunhistochemische Analyse

Zur Detektion des Zytokeratin K8 wurde die StreptAvidin-Biotin-Methode an Paraffinschnitten eingesetzt. Die Schnitte wurden entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert und mit PBS (3x 10 Min.) gewaschen. Die Blockierung der endogenen Peroxidasaktivität erfolgte durch kurze Behandlung mit 3% H₂O₂. Nach Waschen in PBS (3x 10 Min.) wurde der Primärantikörper für 30 Min. aufgetragen, gefolgt vom biotinylierten Sekundärantikörper (30 Min.) und vom StrepAvidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (30 Min.) Zwischen diesen Schritten wurde der Schnitt jeweils 3x 10 Min. in PBS gewaschen. Die Färbereaktion wurde durch 3,3'-Diaminobenzidin; 0,02% H₂O₂ hervorgerufen. Die Schnitte wurden anschließend dehydriert, mit Histomount eingedeckt und getrocknet.

2.5.4 Immunzytochemische Analyse

Der Nachweis von Connexinen und GLUT3 an TS-Zellen erfolgte mittels indirekter Immunzytochemie. TS-Zellen wurden auf Deckgläschen bis zur Konfluenz kultiviert. Nach kurzem Waschen mit Moscona wurden die Zellen für 5 Min. durch Zugabe von Methanol/Aceton (1:1) fixiert und danach 2x 5 Min. mit PBS gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte durch PBS/BSA (0,1% BSA) für 15 Min. Anschließend wurde der Primärantikörper, in PBS/BSA verdünnt, für 45 Min. aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/BSA wurde ein entsprechender Sekundärantikörper für 45 Min. aufgetragen. Nachdem die Präparate 3x mit PBS/BSA gewaschen und 2x kurz mit *A. bidest* gespült wurden, erfolgte die Eindeckelung mit Vectashield. Die Auswertung erfolgte mit einem Axiophot Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen).

2.6 Gene-Array-Analyse

Ein Gene-Array bietet die Möglichkeit für mehrere tausend Transkripte simultan eine Gen-Expressionsanalyse durchzuführen. Jedes Transkript wird durch mehrere Oligonukleotide (*probe sets*) auf der Chipoberfläche repräsentiert. Die Intensität der Signale eines *probe sets*, die bei der Hybridisierung mit einer markierten cRNA auftreten, wird dabei als Schlüssel zur Messung der Expression genutzt. Die Gene-Array-Analysen wurden im Zusammenarbeit mit PD Dr. Klein-Hitpass am Affymetrix cDNA-Array-Zentrum (Institut für Zellbiologie) des Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Verwendet wurde der Mouse Genome U74Av2 Array (Artikel Nr. 900343) von Affymetrix (USA) mit jeweils ca. 6000 bekannten Genen und ESTs.

2.6.1 Probenaufarbeitung

Aus 90% konfluenten TS-Zellkulturen wurde die Gesamt-RNA unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) isoliert, wobei ein DNaseI-Verdau auf der Säule durchgeführt wurde. Durch eine Natriumacetat-Fällung wurde die RNA-Konzentration auf etwa 1,5 µg/µl eingestellt. Für die cDNA-Einzelstrang-Synthese wurden 9 µl (13,5) der Gesamt-RNA mit 1 µl einer Mischung aus drei polyadenylierten Kontroll-RNAs und 1 µl 0,1 M T7-Oligo(dt)₂₄ Primer für 10 Min. bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Es wurden 4 µl 5x Erststrangpuffer, 2 µl 0,1 M DTT, sowie 1 µl 10 mM

dNTPs zugegeben und der Ansatz für 2 Min. bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl Superscript II Reverse Transkriptase (100 U/µl, Invitrogen) wurde der Ansatz für 1 h bei 42°C inkubiert. Die Zweitstrang-Synthese erfolgte nach Zugabe von 30 µl 5x Zweitstrangpuffer, 91 µl RNase-freies Wasser, 3 µl 10 mM dNTPs, 4 µl (40 U) *E. coli* DNA-Polymerase I (Invitrogen), 1 µl *E. coli* DNA-Ligase (12 U/µl, TaKaRa) und 1 µl RNaseH (2U/µl, TaKaRa) für 15 Min. bei 16°C. Durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA wurde die Reaktion gestoppt, die dsDNA mit Phenol/Chloroform extrahiert und die wässrige Phase durch eine ‚phase lock gel separation‘ getrennt. Nach der Präzipitation wurde die cDNA in 12 µl RNase freiem Wasser aufgenommen.

Für die Synthese biotinylierter cRNA wurden 5 µl der dsDNA unter Verwendung des ‚BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit‘ in der *in vitro*-Transkription eingesetzt und die markierte cRNA anschließend mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Fragmentierung der cRNA, die Hybridisierung mit dem cDNA-Array, Waschen, Färben und Scannen des Array erfolgte nach Angaben von Affymetrix.

2.6.2 Absolute und vergleichende Analyse

Für die Image-Analyse des Arrays wurde die Microarray Suite 5.0 von Affymetrix verwendet. In der absoluten Analyse wurde aus dem Abbild des hybridisierten Arrays (*image*) das Signal für jedes *probe sets* auf der Chipoberfläche errechnet. Des weiteren wurde ein Wahrscheinlichkeitswert (*detection p-value*) für das Vorhandensein eines Transkripts und der dazugehörige *detection Call* berechnet, der angibt, ob ein Transkript vorhanden (*present*), grenzwertig (*marginal*) oder nicht vorhanden (*absent*) war.

In der vergleichenden Analyse wurden die jeweiligen *probe sets* zweier Arrays miteinander verglichen. Für die Filterprozesse wurde das Affymetrix Data Mining Tool 3.0 benutzt. Die Arrays wurden zunächst auf die *target* Intensität von 1000 global skaliert. Algorithmen berechneten dann einen Wahrscheinlichkeitswert, den sogenannten *change-p-value*, der die Änderung in der Gen-Expressionsstärke zweier *probe sets* widerspiegelt. Des weiteren wurde für jedes *probe-set* ein diskreter *change call* berechnet, der angibt, ob die Expressionsstärke erhöht (*increased*), grenzwertig erhöht (*marginal increased*), nicht verändert (*no change*), erniedrigt (*decreased*) oder grenzwertig erniedrigt (*marginal decreased*) ist. Ein weiterer Algorithmus produzierte

einen quantitativen Schätzwert für die Änderung der Genexpression, den sogenannten *signal log ratio*.

Als Filter wurde der benutzerdefinierter *cut-off* einer 2,5fachen Regulation und ein *change-p-value* von 0.999 zugrunde gelegt

2.6.3 Statistische Analyse

Der Mann-Whitney-Test wurde benutzt, um zu analysieren, ob ein Unterschied in der Expressionsstärke eines bestimmten Transkripts zwischen zwei experimentellen Gruppen statistisch signifikant war. Dabei wurde ausgehend von den Signalstärken der *probe sets* aus der absoluten Analyse ein Mittelwert für die experimentellen Gruppen (heterozygote bzw. homozygote *Cx31*-defiziente TS-Zellen) ermittelt und ein Wahrscheinlichkeitswert (*p-value*) für die Änderung in der Expression berechnet. Der benutzerdefinierte *cut-off* von 2,5 wurde zur Berechnung einer *change-direction* für jedes *probe-set* verwendet: erhöht (*up*), erniedrigt (*down*) oder nicht verändert (*none*). Der MW-change zeigte das quantitative Maß der Änderung in der Expression eines Gens zwischen den beiden experimentellen Gruppen an.

2.6.4 Hierarchisches Clustering

Das Clustering aller durchgeführten Arrays erfolgte mit der Software Spotfire DecisionSite 7.0. Dabei wurden die Gene aufgrund der Ähnlichkeit in ihrer Expression in verschiedene Cluster eingeteilt. Bei dieser Analyse wurden nur die Gene einbezogen, die in der absoluten Analyse als vorhanden (*present*) identifiziert wurden. Des weiteren wurden ein Gen nur dann einbezogen, wenn es in mindestens drei Arrays pro experimenteller Gruppe (heterozygote bzw. homozygote *Cx31*-defiziente TS-Zellen) vorhanden war.

3 Ergebnisse

3.1 Die Cx43-Knockout Plazenta

Die Cx43-Knockout Maus stirbt postnatal aufgrund einer Fehlbildung am Herzen während oder in den ersten Stunden nach der Geburt (Reaume *et al.*, 1995). In der Publikation wurde beschrieben, dass bei einer der beiden generierten Mauslinien bei der Verpaarung von Cx43^{+/-} Tieren eine verminderten Anzahl von Knockout Embryonen zwischen Tag 16 *pc* und der Geburt beobachtet wurde. Die Ursache für diesen Befund, der bisher nicht weiter untersucht wurde, ist unklar. Um zu analysieren, ob es sich dabei um einen möglichen Defekt in der Plazentaentwicklung oder deren Funktion handelt, wurde die Morphologie von Cx43-Knockout Plazenten zwischen den Tagen 13,5 und 17,5 *pc* untersucht. Die in dieser Arbeit verwendete Cx43-defiziente Mauslinie wurde über einen Zeitraum von 5 Jahren kontinuierlich in den Stamm C57BL/6J eingekreuzt, während die von Reaume *et al.* (1995) publizierte Linie einen gemischten 129/C57BL Hintergrund besaß. Wie aus Tabelle 3.2 hervorgeht, war die Anzahl der Cx43-Knockout Embryonen über den gesamten betrachteten Zeitraum um 50% reduziert. Dabei lag die Verschiebung im Genotypenverhältnis schon an Tag 13,5 *pc* vor. An Tag 13,5 *pc* konnten insgesamt 5 und an Tag 15,5 *pc* zwei resorbierte Embryonen beobachtet werden, deren Genotyp nicht mehr bestimmt werden konnte.

Tab. 3.2. Genotypenverhältnisse der Embryonen aus Cx43^{+/-} Verpaarungen.

Stadium	Anzahl Analysiert	Genotyp		
		WT	HZ	KO
13,5 <i>dpc</i>	24	8	14	2
15,5 <i>dpc</i>	29	9	16	4
17,5 <i>dpc</i>	17	5	10	2
Summe	70	22	40	8
Anteil	100%	31,4%	57,1%	11,5%

Die histologische Auswertung (Abb. 3.2) ergab keine Unterschiede im Aufbau zwischen Cx43-Knockout und Wildtyp Plazenten an den untersuchten Tagen (Tag 15,5 und 17,5 *pc* sind nicht dargestellt). Das Labyrinth und der Spongiotrophoblast waren normal entwickelt und Trophoblast-Riesenzellen waren an der Grenze zur

maternalen Dezidua in beiden Genotypen erkennbar. Cx43 ist für die Organisation und Funktion der reifen Plazenta zwischen den Tagen 13,5 und 15,5 *pc* der Embryonalentwicklung also nicht essentiell.

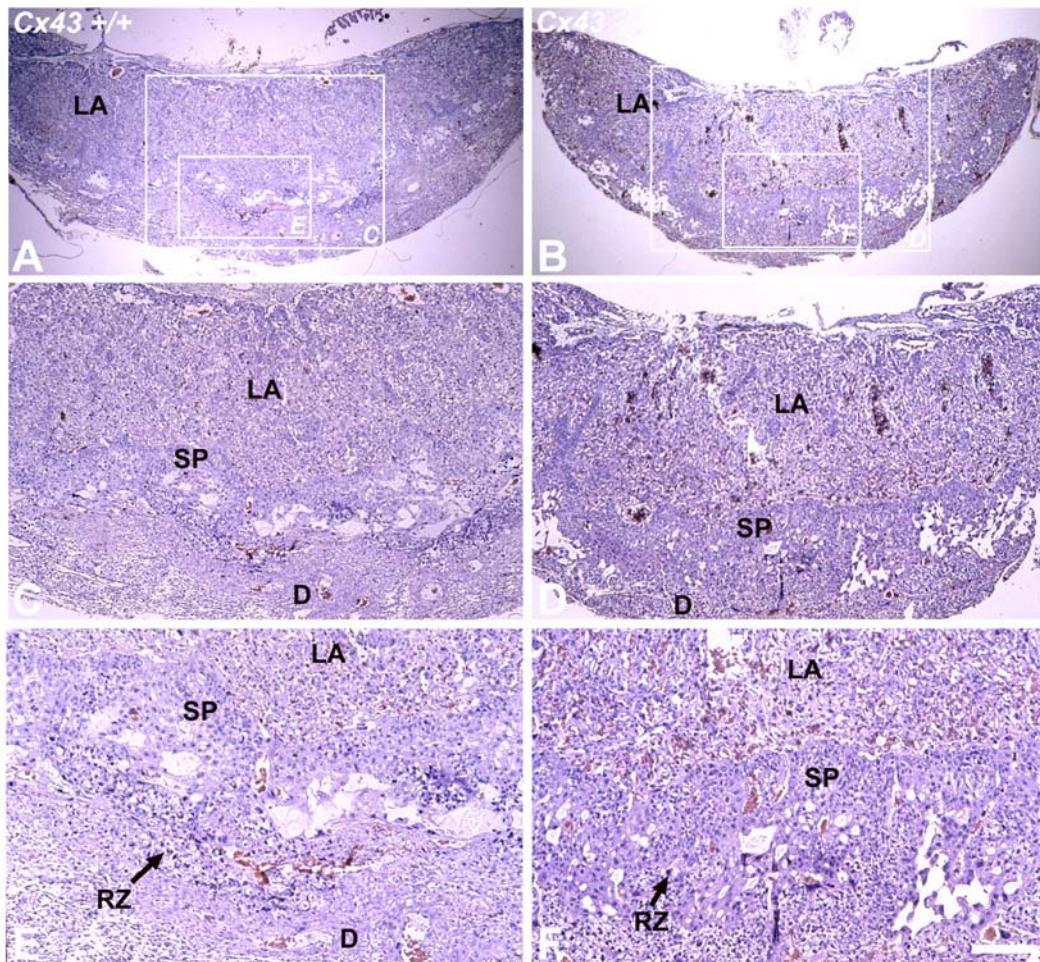


Abb. 3.2. Histologische Analyse von Wildtyp und $Cx43^{-/-}$ Plazenten. HE-gefärbte Schnitte von WT (A, C, E) und $Cx43^{-/-}$ Plazenten (B, D, F) an Tag 13,5 *pc*. (A) und (B) zeigen Übersichten. (C) – (F) zeigen, wie angegeben, höhere Vergrößerungen der Rechtecke in (A) und (B). Ein normal entwickeltes Labyrinth und ein kompakter Spongiotrophoblast sind in beiden Genotypen zu erkennen. LA, Labyrinth; SP, Spongiotrophoblast; RZ, Riesenzelle; D, Dezidua. Balken: 940 μm in (A, B); 470 μm in (C, D); 235 μm in (E, F).

3.2 Die Cx31/Cx43-Doppelknockout Maus

Die homozygote Inaktivierung des Cx31-Gens in der Maus verursacht eine transiente plazentare Dysmorphogenese, die den Tod von 60% der Embryonen zwischen den Tagen 10,5 und 13,5 *pc* zur Folge hat (Plum *et al.*, 2001). Die Autoren diskutierten, dass die Regenerierung der überlebenden Plazenten durch die Induktion von Cx43-Kanälen im Spongiotrophoblasten nach Tag 10,5 *pc* begründet sein könnte. Um zu analysieren, ob der Cx43-Kanal den Verlust des Cx31-Kanals kompensieren kann, wurde die Cx31/Cx43-Doppelknockout Maus durch Kreuzung der beiden Einzelstämme generiert. Diese Mauslinie sollte entsprechend der Hypothese keine überlebenden Cx31/Cx43-Doppelknockout Tiere zwischen den Tagen 10,5 und 13,5 *dpc* hervorbringen.

Zur Erzeugung von Cx31/Cx43-Doppelknockout Embryonen wurden standardmäßig Cx31^{-/-}/Cx43^{+/-} Männchen mit Cx31^{+/-}/Cx43^{+/-} Weibchen verpaart. Da beide Einzelstämme keine mendelsche Verteilung der Nachkommen aufweisen, wurde die Analyse rein qualitativ durchgeführt. Da in der Cx31-knockout Maus die Embryonen ab Tag 10,5 *pc* absterben, wurde beginnend mit Tag 11,5 *pc* untersucht, ob überlebende Cx31/Cx43-Doppelknockout Tiere vorhanden waren. Es zeigte sich (Tab. 3.1), dass im Zeitraum von Tag 11,5 bis einschließlich 15,5 *pc* vitale Cx31/Cx43-Doppelknockout Embryonen gefunden werden konnten.

Tab. 3.1. Genotypen der Embryonen aus Verpaarungen von Cx31^{-/-}/Cx43^{+/-} Männchen mit Cx31^{+/-}/Cx43^{+/-} Weibchen.

Stadium	Anzahl Analysiert	Genotyp					
		31HZ			31KO		
		43 WT	43HZ	43KO	43WT	43HZ	43KO
11,5 <i>dpc</i>	7	2	3	-	-	-	<u>2</u>
12,5 <i>dpc</i>	5	2	-	1	-	1	<u>1</u>
13,5 <i>dpc</i>	6	1	2	-	-	2	<u>1</u>
14,5 <i>dpc</i>	7	3	1	2	-	-	<u>1</u>
15,5 <i>dpc</i>	14	-	6	2	2	3	<u>1</u>
16,5 <i>dpc</i>	5	1	3	-	1	-	-
17,5 <i>dpc</i>	18	4	7	5	-	2	-

Damit ist der Zeitraum in dem die Cx31-Knockout Embryonen absterben (10,5 bis 13,5 *dpc*) abgedeckt. Das Gewicht der Cx31^{-/-}/Cx43^{-/-} Plazenta an Tag 13,5 *pc* entsprach mit 45 mg dem der Cx31^{-/-}/Cx43^{+/-} Plazenten (45 bzw. 50 mg) am gleichen Tag. Die Histologie (Abb. 3.1) zeigte keine Unterschiede zwischen beiden Plazenten. In beiden Fällen war das Labyrinth gleichermaßen entwickelt und es zeigte sich ein

extrem reduzierter Spongiotrophoblast, wie er für eine $Cx31^{-/-}$ Plazenta charakteristisch ist (Plum *et al.*, 2001). Der zusätzliche Verlust von $Cx43$ führt also nicht zu einer Verhinderung der Regeneration von $Cx31$ -Knockout Plazenten und damit zum Tod der Embryonen. Die Induktion von $Cx43$ im Spongiotrophoblasten nach Tag 10,5 *pc* kann damit den Verlust von $Cx31$ nicht kompensieren.

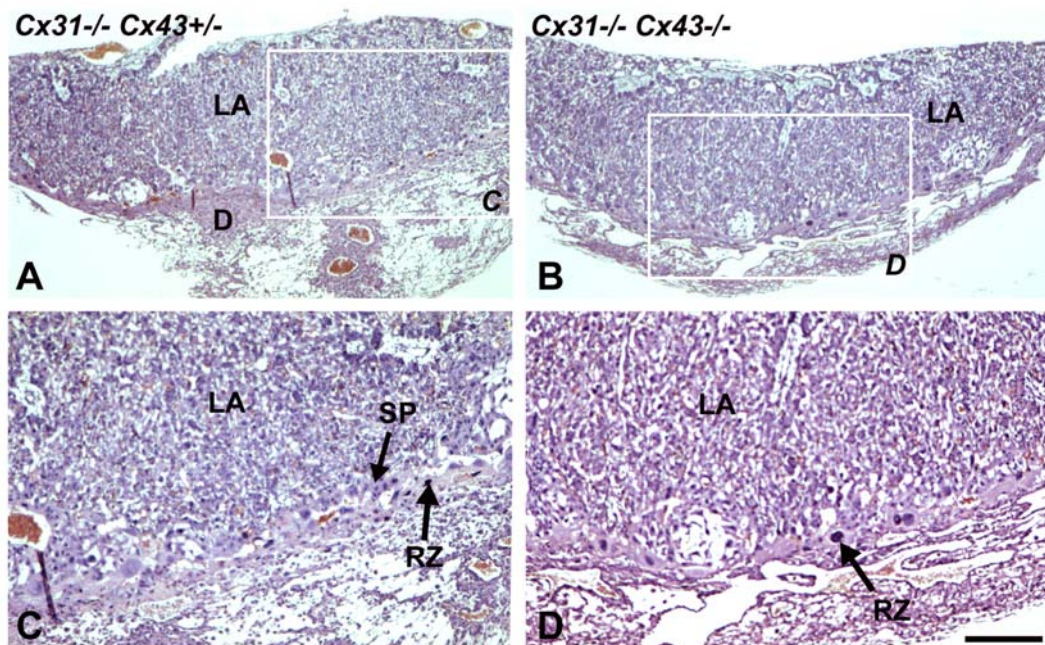


Abb. 3.1. Histologische Analyse von $Cx31^{-/-}/Cx43^{+/-}$ und $Cx31^{-/-}/Cx43^{-/-}$ Plazenten. HE-gefärbte Schnitte von $Cx31^{-/-}/Cx43^{+/-}$ (A, C) und $Cx31^{-/-}/Cx43^{-/-}$ (B, D) Plazenten an Tag 13,5 *dpc*. (A) und (B) zeigen Übersichten. (C) und (D) zeigen, wie angegeben, höhere Vergrößerungen der Rechtecke in (A) und (B). Es sind keine morphologischen Unterschiede zwischen beiden Plazenten zu erkennen. LA, Labyrinth; SP, Spongiotrophoblast; RZ, Riesenzelle; D, Dezidua. Balken: 240 μm in (C, D); 480 μm in (A, B).

3.3 Generierung von Trophoblast-Stammzellen

Trophoblast-Stammzellen sind das derzeit am besten geeignete *in vitro* Modell zur Analyse von Differenzierungsvorgängen während der Plazentaentwicklung der Maus. Das Ziel dieser Arbeit bestand zunächst in der Generierung von Wildtyp TS-Zellen und der Charakterisierung ihres Connexin-Expressionsmusters. Dadurch sollte festgestellt werden, ob TS-Zellen auch als Modell zur Funktionsanalyse der Connexine in der Trophoblastdifferenzierung der Maus dienen können. Die Generierung von TS-Zellen wurde in Anlehnung an das von Tanaka *et al.* (1998)

beschriebene Verfahren durchgeführt, wobei einige Modifikationen vorgenommen wurden.

Die in dieser Arbeit verwendeten TS-Zelllinien wurden ausschließlich aus 3.5 *dpc* Blastozysten hergestellt (Abb. 3.3). Anders als bei Tanaka *et al.* (1998) wurde die Generierung in Anwesenheit von 75% Feeder-konditioniertem TS-Medium (gegenüber 70%) durchgeführt, da ein geringerer Anteil zu einer erhöhten Rate von spontaner Differenzierung und damit dem Verlust der gesamten Kultur führte. Die Verwendung von gelatinisierten Kulturplatten erwies sich als nicht erforderlich. Nach dem

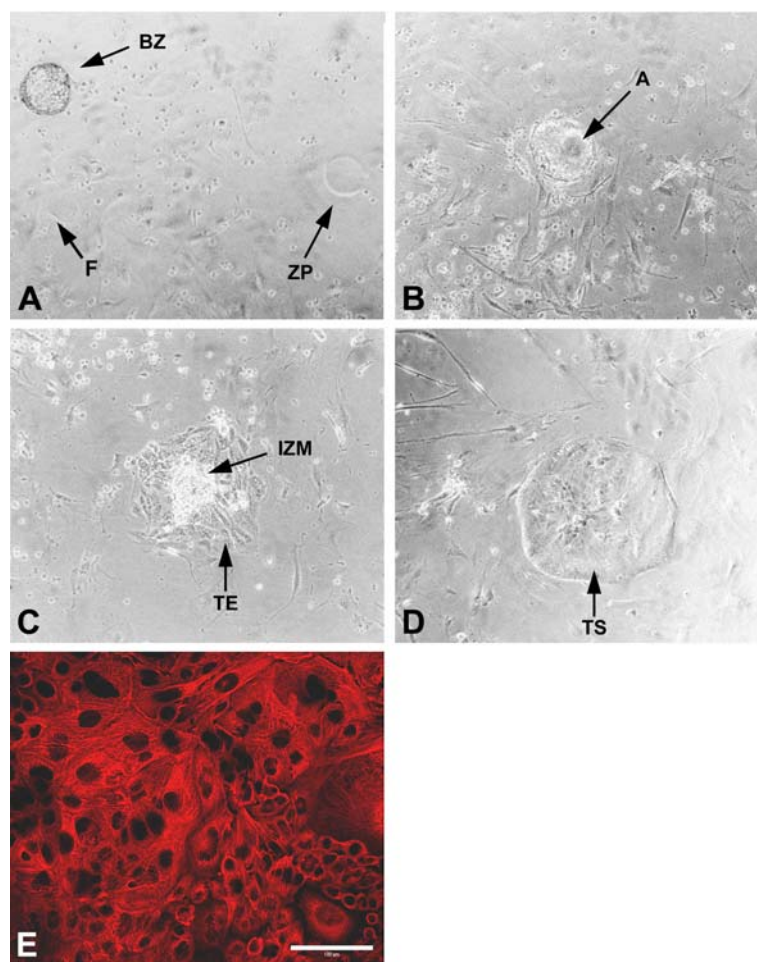


Abb. 3.3. Generierung von Trophoblast-Stammzellen. A-D Phasenkontrastaufnahme charakteristischer Kulturstadien. (A) Eine 3.5 *dpc* Blastozyste (BZ) wurde in FK-TS-Medium auf vorplattierte Feeder-Zellen (F) gesetzt. 24 h nach Plattierung streifte die Blastozyste die *zona pellucida* (ZP) ab und adhärte an die Kulturschale (B). An Tag 3 (C) bildete sich ein Trophektoderm (TE)-Auswuchs, dem die Zellen der inneren Zellmasse (IZM) aufsaßen. In diesem Stadium wurden die Zellen disaggregiert. Aufgrund von FGF4 im Medium blieb das Stammzellpotential der Zellen des Trophektoderms erhalten, während die der inneren Zellmasse zugrunde gingen. (D) Nach etwa 6 Tagen waren erste TS-Zell-Kolonien (TS) zu erkennen. (E) Laserscanaufnahme einer indirekten immunzytochemischen Detektion des Trophoblast-Markers Zytokeratin 8 (CK8) in undifferenzierten WT TS-Zellen. A, Adhäsionspunkt. Balken in: A-D 180 µm; E 100 µm.

Anwachsen von TS-Zell-Kolonien ab dem 6. Tag wurden keine einzelnen Kolonien isoliert, sondern die gesamte Kultur bei Erreichen einer entsprechenden Dichte 1:1 in eine neue Kulturschale mit vorplattierten Feeder-Zellen passagiert. Des weiteren wurden alle TS-Zelllinien erst ab der 10. Passage ohne Feeder-Zellen kultiviert. Dies erwies sich als optimal, um eine mögliche spontane Differenzierung der gesamten Kultur bei niedrigeren Passagen zu umgehen. Unter den beschriebenen Bedingungen wurde ein ca. 90%iger Erfolg in der Generierung von TS-Zelllinien aus einer einzelnen Blastozyste erzielt. Der Maus Trophoblast-Marker Zytokeratin 8 (Tamai *et al.*, 2000) wurde zum Nachweis einer homogenen TS-Zellkultur und zur Identifizierung von TS-Zellen nach Injektionen in Nacktmäuse eingesetzt (Abb. 3.3E).

3.4 Wildtyp TS-Zellen

3.4.1 Analyse der Connexin-Expression auf Transkriptebene

Die Expression verschiedener Connexin-Isoformen wurde zunächst an undifferenzierten Wildtyp TS-Zellen auf mRNA-Ebene untersucht. In einer RT-PCR wurden alle Isoformen getestet, deren Expression in Präimplantationsembryonen auf Transkriptebene beschrieben worden ist: *Cx30*, *Cx30.3*, *Cx31*, *Cx31.1*, *Cx36*, *Cx40*, *Cx43*, *Cx45* und *Cx57* (Houghton *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 1996). *Cx26*, das

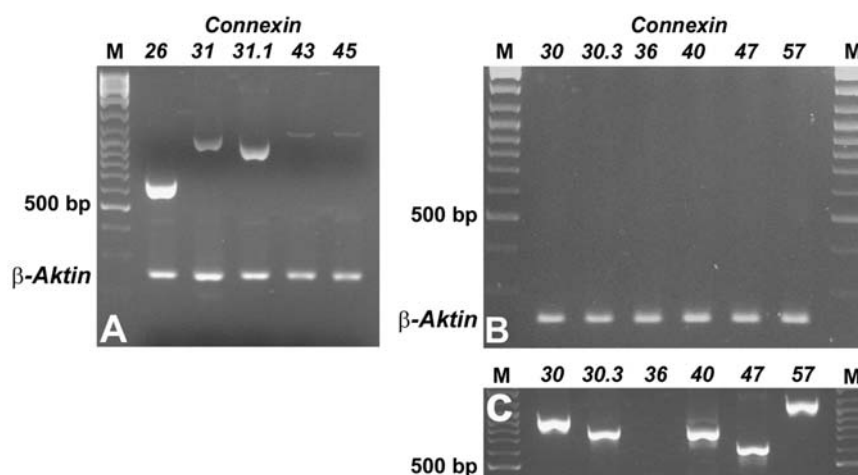


Abb. 3.4. RT-PCR-Analyse von Connexin-Transkripten in undifferenzierten Wildtyp TS-Zellen. Dargestellt ist die Auftrennung der PCR-Produkte in einer Agarose-Gelelektrophorese. **(A)** Connexin-Isoformen, deren mRNA durch Verwendung spezifische Primer in einer ersten PCR-Reaktion (26 Zyklen) detektiert werden konnte. **(B)** Connexine, für die unter den gleichen Bedingungen kein PCR-Produkt detektiert wurde. Die Amplifikation von β -Aktin zeigte als interne Kontrolle das Funktionieren der PCR an. **(C)** Nested PCR der in (B) gezeigten Ansätze (durchgeführt mit einem zweiten Primerpaar, 33 Zyklen). M, 1 kb Leiter.

funktionelle Kanäle im Synzytiotrophoblasten der Plazenta bildet und Cx47 ein kürzlich neu kloniertes murines Connexin (Teubner *et al.*, 2001) wurden ebenfalls untersucht. Wenn die entsprechenden Sequenzeinträge in der NCBI-Datenbank vorhanden waren, wurden intronüberspannende Primer konstruiert, um ein falsch positives Signal durch mögliche Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschließen. Zur Kontrolle wurden jedem Ansatz intronüberspannende, β -Aktin-spezifische Primer zugesetzt. Durch die RT-PCR (Abb. 3.4) konnten bis auf Cx36 alle getesteten Connexine an undifferenzierten Wildtyp TS-Zellen nachgewiesen werden. Die Transkripte von 5 Isoformen (Cx26, Cx31, Cx31.1, Cx43 und Cx45) wurden in der ersten PCR direkt detektiert und die weiteren 5 Isoformen konnte durch eine *nested* PCR nachgewiesen werden. Cx36, welches als hauptsächlich in Retina und Gehirn exprimiert beschrieben wurde (Al-Ubaidi *et al.*, 2000) und auch auf mRNA-Ebene in Blastozysten gefunden wurde (Houghton *et al.*, 2002), ist in undifferenzierten TS-Zellen nicht exprimiert. Demnach könnten 10 verschiedene Connexine auch auf Proteinebene exprimiert werden und an der Bildung von interzellulären Kanälen zwischen undifferenzierten TS-Zellen beteiligt sein.

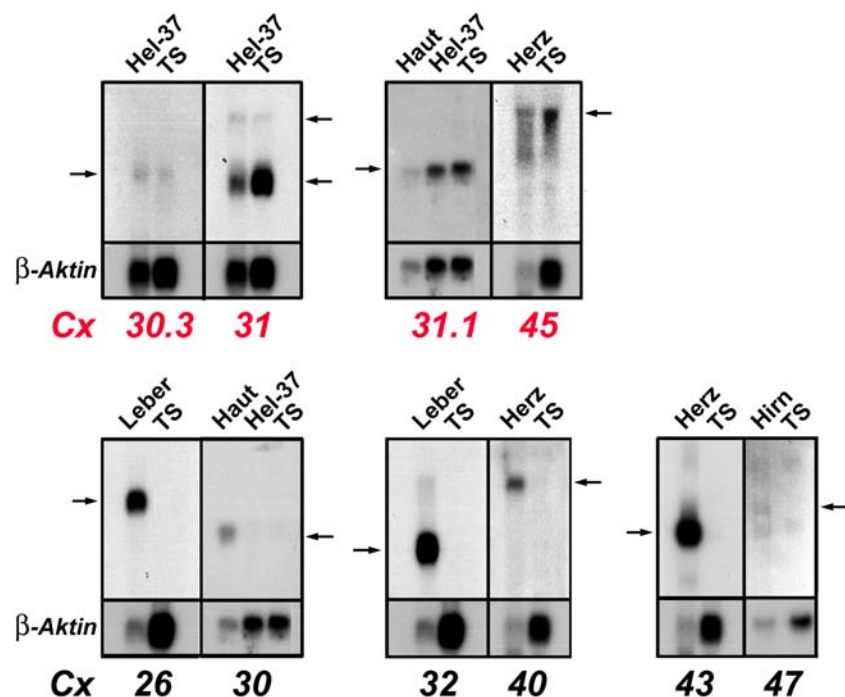
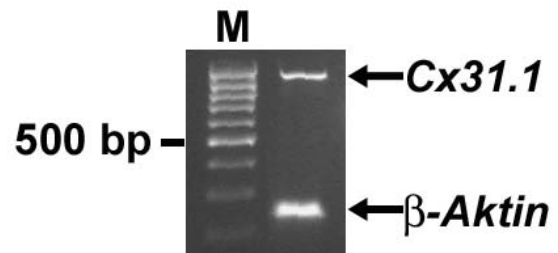


Abb. 3.5. Northern Blot-Analyse der Connexin-Expression in undifferenzierten Wildtyp TS-Zellen. Aufgetragen wurden 5 μ g Total-RNA aus undifferenzierten WT TS-Zellen, sowie eine gleiche Menge RNA aus einem entsprechenden Gewebe als Positivkontrolle. Die Membranen wurden mit Sonden aus der kodierenden Region des jeweiligen Connexins hybridisiert, anschliessend gestrippt und mit einer β -Aktin-Sonde rehybridisiert. Die spezifischen Connexin-Signale sind durch Pfeile gekennzeichnet. In rot dargestellt sind die Connexin-Isoformen, deren Transkripte im Northern Blot nachgewiesen werden konnten. Hel-37, Maus Keratinozyten-Zelllinie.

Von Präimplantationsembryonen ist bekannt, dass nicht alle Connexin-Transkripte, die durch RT-PCR detektiert werden, zur Expression funktioneller Kanäle führen (Houghton *et al.*, 2002). Um die Menge der vorhandenen Connexin-mRNA zu quantifizieren, wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt. Die Hybridisierung mit spezifischen Sonden ergab nur für *Cx30.3*, *Cx31*, *Cx31.1* und *Cx45* ein positives Signal (Abb. 3.5). Insbesondere *Cx31* und *Cx31.1* zeigten eine deutliche Expression in undifferenzierten TS-Zellen. Das Ergebnis der Northern Blot-Analyse ließ auf ein eingeschränkteres Connexin-Expressionsmuster schließen, als es die RT-PCR implizierte.

Da *Cx31.1* im Northern Blot ein starkes Hybridisierungssignal in TS-Zellen zeigte, aber eine Expressionsanalyse in der Plazenta noch nicht beschrieben war, wurde die Expression von *Cx31.1* mittels RT-PCR an einer 10,5 *dpc* Plazenta untersucht. In der RT-PCR konnte die Expression von *Cx31.1* nachgewiesen werden (Abb. 3.6).

Abb. 3.6. RT-PCR Nachweis von *Cx31.1* in der 10,5 *dpc* Plazenta. Gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Ansatzes mit β -Aktin als interne Kontrolle. Erwartete Größe des *Cx31.1*-Amplikons: 978 bp. M, Marker.



3.4.2 Regulation der Connexin-Expression in differenzierenden TS-Zellen

Cx26, *Cx31* und *Cx43* bilden funktionelle Kanäle während der Trophoblastdifferenzierung der Maus (Plum *et al.*, 2001). Die Expression von *Cx31.1* konnte mittels RT-PCR in TS-Zellen als auch in der Plazenta nachgewiesen werden. Daher wurde die Expression von *Cx26*, *Cx31*, *Cx31.1* und *Cx43* in der Differenzierung von TS-Zellen durch eine Northern Blot-Analyse untersucht (Abb. 3.7A). Durch den Entzug von Feeder-konditioniertem Medium, FGF4 und Heparin aus der Kultur kann die Differenzierung von TS-Zellen entlang der Trophoblastzelllinie induziert werden. Es ist bekannt, dass TS-Zellen zu Spongiotrophoblast und Riesenzellen differenzieren können (Tanaka *et al.*, 1998). Daher wurde der Differenzierungsverlauf anhand

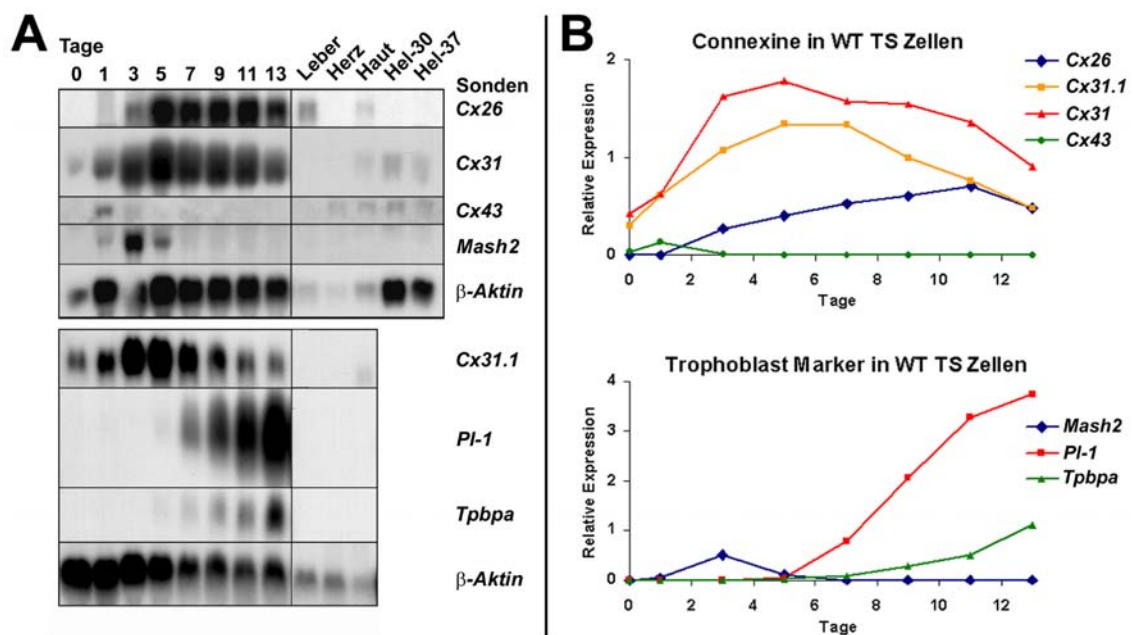


Abb. 3.7. Expression von Connexinen und Trophoblast-Markergenen während der Differenzierung von WT TS-Zellen. (A) Northern Blot-Hybridisierung von Gesamt-RNA einer WT TS-Zelllinie an verschiedenen Tagen der Differenzierung mit Sonden gegen *Cx26*, *Cx31*, *Cx31.1*, *Cx43*, *Mash2*, *PI-1*, *Tpbpa* und β -Aktin. Total-RNA aus Leber, Herz, Haut, sowie den Keratinozyten-Zelllinien Hel-30 und Hel-37 diente als Positivkontrolle. Es wurden zwei Blots mit der RNA aus der selben Präparation eingesetzt. (B) Densitometrische Auswertung der in (A) gezeigten Autoradiographien. Die Signale wurden gegen das entsprechende β -Aktin Signal abgeglichen.

folgender plazentarer Markergene verfolgt: *Mash2*, exprimiert im Ektoplazentarkonus und im Spongiotrophoblasten, *Tpbpa*, charakteristisch für den Spongiotrophoblasten und *PI-1* einem Riesenzellmarker.

Cx31 und *Cx31.1* wurden über den gesamten Differenzierungsverlauf der TS-Zellen von 13 Tagen exprimiert. Die in der densitometrischen Analyse (Abb. 3.7B) erkennbare Zunahme in der mRNA-Menge beider Isoformen korrelierte dabei mit einer Zunahme in der Zelldichte der Kultur (Abb. 3.8), die zu einer weitverbreiteten Bildung von Zell-Zellkontakten und damit der Bildung von potentiellen Gap Junctions führte. Die Expression von *Cx26*, dem spezifischen Connexin für den Synzytiotrophoblasten der Plazenta, wurde an Tag 3 der Differenzierung induziert. Dies war genau der Zeitpunkt, an dem die Expression von *Mash2* ihr Maximum erreichte. *Cx26* Transkripte waren über den gesamten Differenzierungsverlauf vorhanden. *Tpbpa* sowie *PI-1* wurden beide an Tag 5 induziert, gleichzeitig mit der Repression von *Mash2*, was den kompletten Verlust von Stammzellpotential in der Kultur anzeigte. Im Folgenden stieg die Expression von *PI-1* stark an, was der Beobachtung einer enormen Anzahl von Trophoblast-Riesenzellen in der Kultur ab

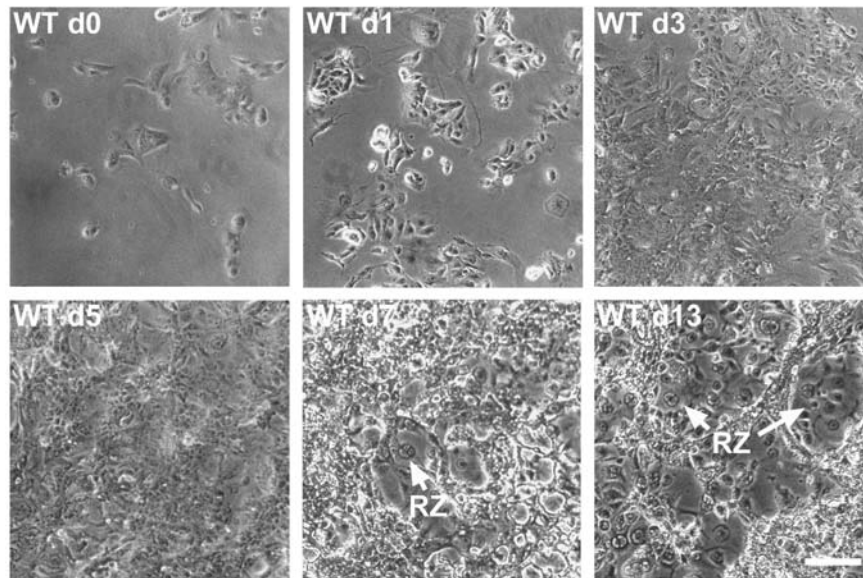


Abb. 3.8. Phasenkontrastaufnahme einer Wildtyp TS-Zellkultur an verschiedenen Tagen (d) der Differenzierung. Nach d3 erreicht die Kultur Konfluenz. RZ, Riesenzellen; Balken: 100 μ m.

Tag 7 (Abb. 3.8) konsistent war. In der Plazenta der Maus wird die Expression von Cx43 nach Tag 10.5 *pc* im Spongiotrophoblasten induziert und es ist die spezifische Isoform für Trophoblast-Riesenzellen (Plum *et al.*, 2001). Cx43 Transkripte konnten in differenzierenden Wildtyp TS-Zellen nur am Tag 1 bis 3 detektiert werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass die Northern Blot-Analyse die Summe aller entstehenden Trophoblastzelltypen in der differenzierenden TS-Zell-Kultur widerspiegelte, konnte von einer zeitlichen Regulation der Connexin-Expression ausgegangen während der Differenzierung von TS-Zellen ausgegangen werden, die der Situation in der Plazenta vergleichbar ist.

3.4.3 Immunmarkierung von Connexinen in Trophoblast-Stammzellen

Es wurde getestet, ob die auf mRNA-Ebene in TS-Zellen gefundenen Connexin-Isoformen auch auf Proteinebene exprimiert werden. Dazu wurden immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen Cx26, Cx30, Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43 und Cx45. In undifferenzierten TS-Zellen konnte ausschließlich Cx31 detektiert werden (Abb. 9). Cx31 wurde in nahezu allen Zellen exprimiert; nur die spontan differenzierten Zellen am Rande distinkter Kolonien (Tanaka *et al.*, 1998) wiesen keine Immunmarkierung auf. Spontan differenzierte Zellen unterscheiden sich durch eine erhöhte Zell- und Nukleusgröße von undifferenzierten TS-Zellen. Cx43 war in undifferenzierten TS-

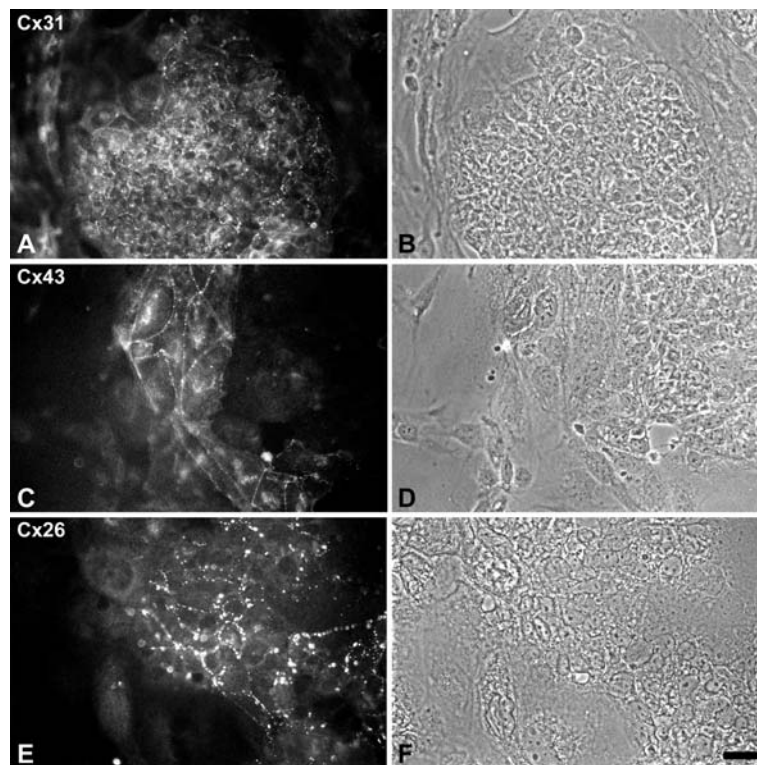


Abb. 3.9. Immunzytochemische Detektion von Connexinen in Wilstyp TS-Zellen. (A, C, E) Immunfluoreszenzaufnahmen mit (B, D, F) korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen. (A, B) Cx31 in undifferenzierten TS-Zellen, (C, D) Cx43 in spontan differenzierten Zellen am Rande eine TS-Zell-Kolonie. (E, F) Cx26 an Tag 5 der Differenzierung. Balken: 50 μm .

Zellen nicht exprimiert. Spontan differenzierte Zellen hingegen, die sich durch von undifferenzierten TS-Zellen abweichende Morphologie aufwiesen, exprimierten Cx43. Cx26 konnte ab Tag 5 der Differenzierung in Gap Junction Kanälen nachgewiesen werden. An Tag 4 wurde Cx26 nur vereinzelt intrazellulär detektiert. Auch die Expression von Cx26 beschränkte sich auf einzelne Subpopulationen in der Kultur. Die Anwendung spezifischen Antikörper gegen Cx30, Cx30.3, Cx32, Cx37, Cx40, Cx45 zeigte an undifferenzierten oder differenzierenden TS-Zellen keine spezifischen intrazellulären oder membranständigen Signale. Gegen Cx30.3 und Cx31.1 sind zur Zeit kein funktionierender Antikörper erhältlich, daher kann über die Translation dieser Transkripte zu Proteinen keine Aussage gemacht werden.

Die Regulation von Cx26, Cx31 und Cx43 konnte somit auch auf Proteinebene bestätigt und die Lokalisation dieser Proteine in Gap Junctions an der Membran nachgewiesen werden.

3.4.4 TS-Zellen bilden hämorrhagische Tumore in Nacktmäusen

Trophoblast-Riesenzellen übernehmen in der Plazenta die Aufgabe in das maternale Gewebe zu invadieren und die maternalen Arterien des Uterus zu modifizieren (Cross *et al.*, 2002). Das Nacktmausmodell bietet die Möglichkeit das Invasionsverhalten von Zellen *in vivo* zu untersuchen. Von der humanen Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 ist bekannt das sie, in athymische Nacktmäuse injiziert, zur Bildung von hämorrhagischen Tumoren führt (Grümmer *et al.*, 1999). Um das Invasionspotential der TS-Zellen zu analysieren, wurden undifferenzierte Wildtyp TS-Zellen subkutan in die Flanken von männlichen Nacktmäusen injiziert. Die TS Zellen bildeten kleine, solide Tumore bis zu 1 cm im Durchmesser (Abb. 3.10A, B), wenn 10^7 TS-Zellen pro Flanke injiziert wurden. Keine Tumorbildung konnte beobachtet werden, wenn weniger Zellen injiziert worden sind. Die Tumore erreichten ihre maximale Größe 7 Tage nach Injektion und wurden innerhalb der nächsten 3 Tage resorbiert, d.h. es handelt sich um eine transiente Tumorbildung (Daten nicht gezeigt). Makroskopisch waren um die soliden Tumore herum ausgeweitete, hämorrhagische Läsionen zu erkennen (Abb. 10B). Die histologische Analyse zeigte große, blutgefüllte Lakunen innerhalb der Tumormasse (Abb. 3.10C). In den Tumoren konnten eröffnete Blutgefäße der Haut detektiert werden, die die Ursache der Lakunenbildung waren (Abb. 3.10D). Die Färbung mit Zytokeratin 8, einem Marker für Trophoblastzellen der Maus erwies die injizierten TS-Zellen als Ursprung der Tumormasse (Abb. 3.7G). Die Trophoblastzellen wiesen eine Anordnung auf, die Ähnlichkeiten zum Spongiotrophoblasten und der daraus differenzierenden Riesenzellschicht der reifen Plazenta besaß (Abb. 10E). In der Nacktmaus zeigen damit die injizierten TS-Zellen proliferative Aktivität, die zur transienten Tumorbildung führte und eine Differenzierung zu Trophoblast-Riesenzellen (Abb. 3.10F). Diese zeigten wie *in vivo* eine invasive und modifizierende Kapazität. In den Versuchen konnte keine Invasion von Trophoblastzellen durch die Muskelzellschicht der Haut festgestellt werden. Erste Langzeitversuche ergaben über einen Zeitraum von 3 Monaten an zwei Tieren keine Hinweise auf eine metastasierende Kapazität der injizierten TS-Zellen.

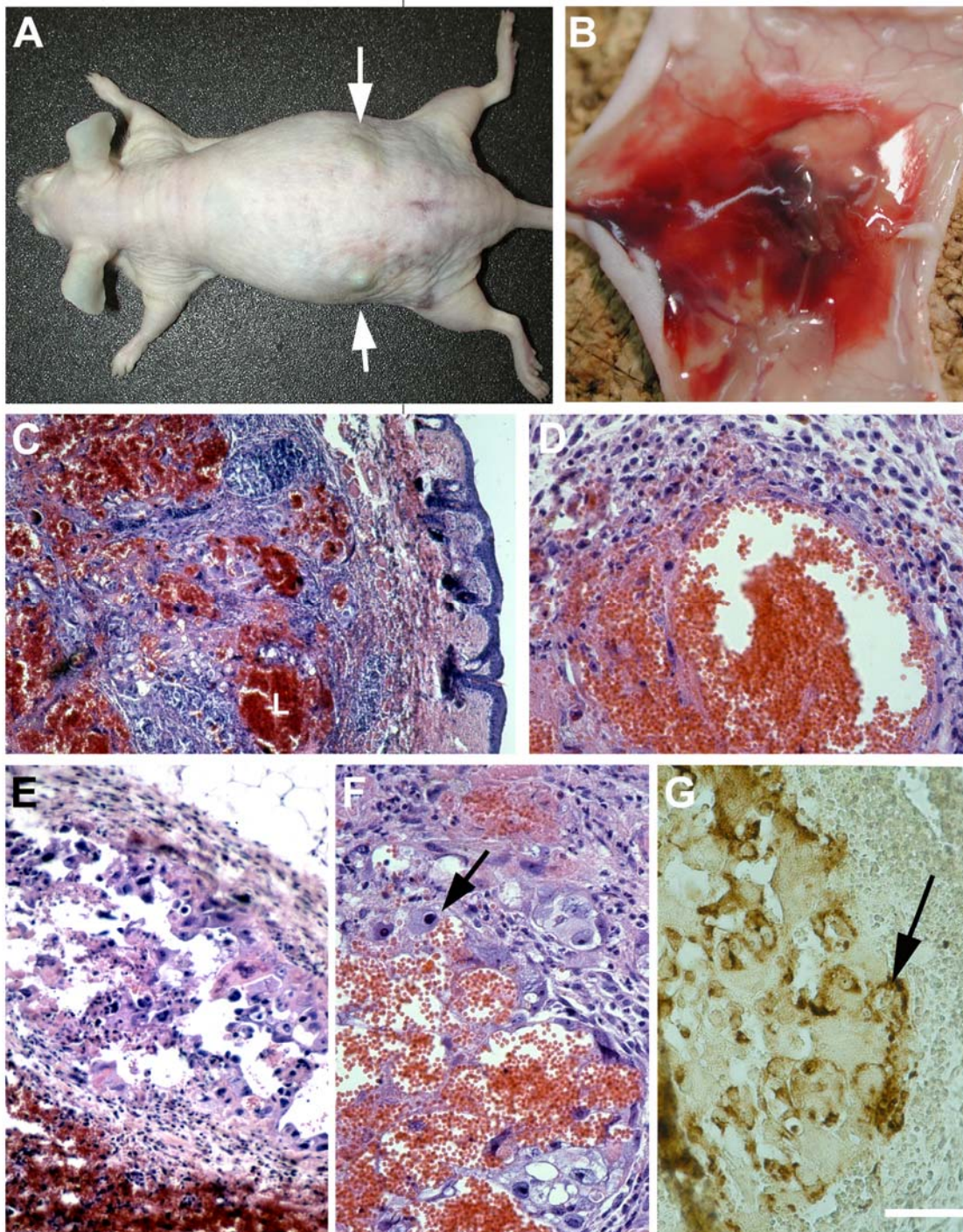


Abb. 3.10. TS-Zellen bilden hämorrhagische Tumore in Nacktmäusen. Morphologische Analyse 7 Tage nach subkutaner Injektion von 10^7 TS-Zellen pro Flanke. C-F HE-Färbung (A) Tumorbildung an den Injektionsstellen (B) Makroskopische Erscheinung eines subkutanen TS-Zell Tumors mit umgebender hämorrhagischer Läsion. (C) Schnitt durch einen Tumor mit blutgefüllten Lakunen (L). (D) Eröffnetes Blutgefäß der Haut. (E) Organisation der TS-Zellen in der Haut. (F) Trophoblast-Riesenzellen (Pfeil) an einer Lakune. (G) Zytokeratin 8 Färbung der Tumorzellen (Pfeil). Balken in A: 2 cm, B: 0,6 cm, C: 400 μ m, D-G: 200 μ m.

3.5 Cx31-defiziente Trophoblast-Stammzellen

Da sich das Modell der TS-Zellen zur Analyse der Funktion von Connexinen als geeignet erwies, wurden im Folgenden Cx31-defiziente TS-Zelllinien generiert. Um den Einfluss des genetischen Hintergrunds so gering als möglich zu halten, wurden für die Blastozystengewinnung Cx31^{+/-} Weibchen aus einem Wurf mit dem selben Cx31^{-/-} Männchen verpaart. Aus dieser Verpaarung resultierten jeweils 50% heterozygote und homozygote Cx31-defiziente Blastozysten. Da die Cx31^{+/-} Maus im Phänotyp keinerlei Unterschiede zur Wildtyp Kontrolle aufwies (Plum *et al.*, 2001), konnte die Cx31^{+/-} TS-Zelllinie als Kontrolle eingesetzt werden. Die aus individuellen Blastozysten generierten Cx31-defizienten TS-Zelllinien wurden mittels PCR genotypisiert und jeweils 4 heterozygote und homozygote (Abb. 3.11) für die weiteren Untersuchungen verwendet.

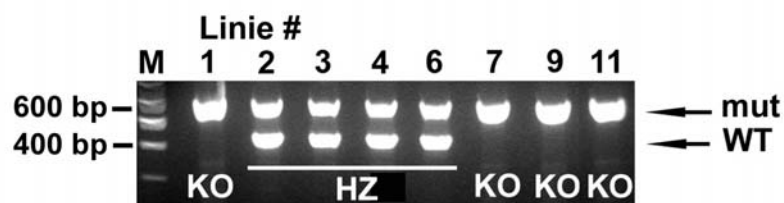


Abb. 3.11. Genotypisierung der generierten Cx31-defizienten TS-Zelllinien. Die Detektion des Wildtyp (WT) und des mutierten (mut) Gens in der aus TS-Zellen isolierten DNA erfolgte mittels PCR. Primer spezifisch für die kodierende Region des Cx31-Gens bzw. des *lacZ*-Reportergens wurden mit einem, stromaufwärts im Cx31-Intron liegenden, Ankerprimer kombiniert. Dargestellt ist die Auftrennung der PCR-Produkte in einer Agarose-Gelelektrophorese. HZ, heterozygote (Cx31^{+/-}) TS-Zelllinien; KO, Knockout (Cx31^{-/-}) TS-Zelllinien; M, Marker.

3.5.1 Expressionsanalyse von Connexinen und Trophoblast Markern in Cx31-defizienten TS-Zelllinien

Die Expression von Cx26, Cx31, Cx31.1 und Cx43 sowie die der Markergene *Mash2*, *Tpbpa* und *Pl-1* wurde im Differenzierungsverlauf der Cx31^{+/-} und Cx31^{-/-} TS-Zelllinien analysiert. Die Cx31^{+/-} TS-Zelllinien zeigten das gleiche Expressionsmuster wie die Wildtyp TS-Zelllinie (vergleiche Abb. 3.12A mit Abb. 3.7). Exemplarisch ist hier die Northern Blot-Analyse für die heterozygote Zelllinie #6 dargestellt. *Pl-1* Transkripte waren in jeder RNA Präparation aufgrund spontaner Differenzierung vorhanden, aber der starke Anstieg erfolgte ab Tag 7 der Differenzierung entsprechend der Wildtyp Kontrolle.

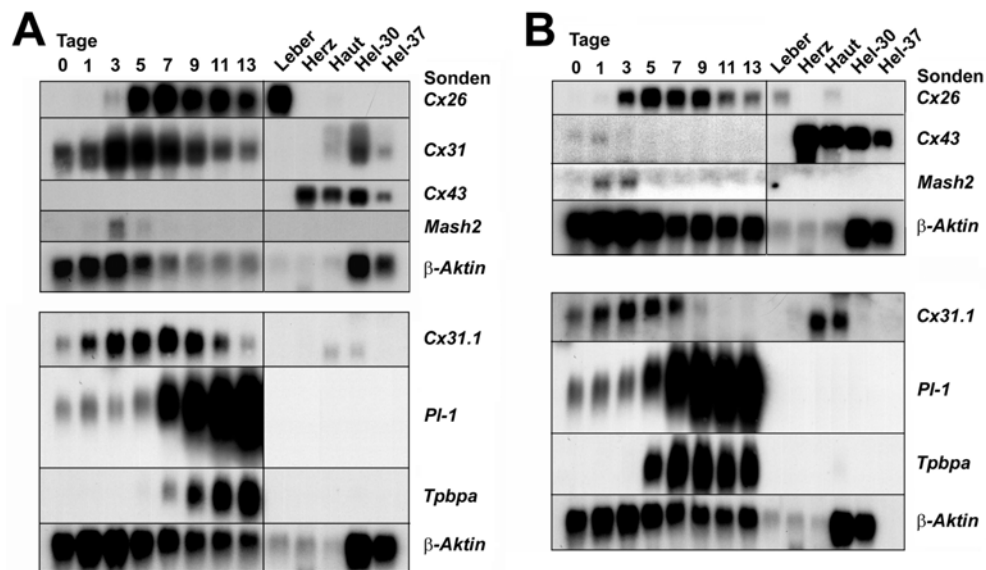


Abb. 3.12. Vergleichende Analyse der Expression von Connexinen und Trophoblast-Markern in der Differenzierung $Cx31$ -defizienter TS-Zelllinien. (A) Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA der $Cx31^{+/-}$ TS-Zelllinie #6 an verschiedenen Tagen der Differenzierung mit verschiedenen Sonden. Total-RNA aus Leber, Herz, Haut, sowie den Keratinozyten-Zelllinien Hel-30 und Hel-37 diente als Positivkontrolle. Es wurden zwei Blots mit der RNA aus derselben Präparation eingesetzt. (B) Entsprechend (A) mit Gesamt-RNA der $Cx31^{-/-}$ TS-Zelllinie #11. (C) Densitometrische Auswertung der Autoradiographien aller untersuchten heterozygoten (HZ) und homozygoten (KO) $Cx31$ -defizienten TS-Zelllinien. Die Signale wurden gegen das entsprechende β -Aktin Signal abgeglichen. Dargestellt sind die Einzelkurven für jede Sonde in einem Diagramm zusammen mit dem berechneten Mittelwert und der Standardabweichung. Links jeweils das Diagramm für die $Cx31^{+/-}$, rechts für die $Cx31^{-/-}$ TS-Zelllinien. Abbildung Teil (C) nächste Seite →

Die $Cx31^{-/-}$ TS-Zelllinien (als Beispiel sind die Northern Blot-Hybridisierungen für die Linie #11 gezeigt) wiesen ein zeitlich verändertes Expressionsmuster auf. *Mash2* wurde zwei Tage früher, an Tag 1 der Differenzierung induziert und wurde nach Tag 5 schneller reprimiert. Die Expression von *Tpbpa* erfolgte ab Tag 5 (Tag 7 in heterozygoten Linien) der Differenzierung. Der starke Anstieg der *Pl-1* Transkripte erfolgte ebenfalls zwei Tage früher im Vergleich zu den heterozygoten TS-Zelllinien. Entsprechend zu diesen Beobachtungen konnten *Cx26*-Transkripte in $Cx31^{-/-}$ TS-Zelllinien an Tag 3 der Differenzierung in größerem Umfang nachgewiesen werden als in der heterozygoten Vergleichsgruppe.

Die Signale aus den Northern Blot-Hybridisierungen der einzelnen Klone wurde densitometrisch ausgewertet und ein Mittelwert aus den überlagerten Kurven gebildet.

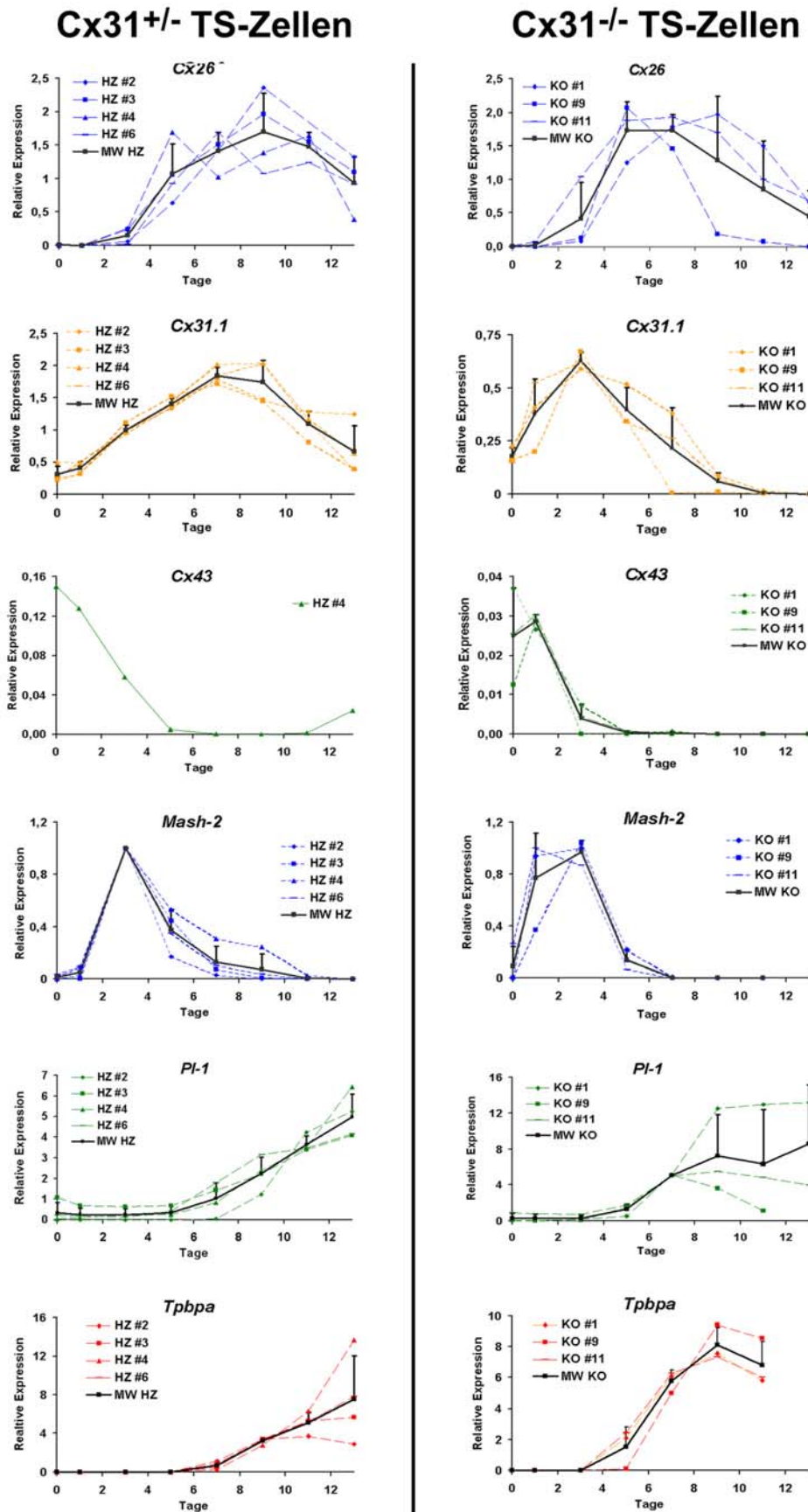


Abb. 3.12C. Legende auf der vorhergehenden Seite.

Diese Analyse ergab für die Knockout TS-Zellen eine umfassende Verschiebung im Expressionsprofil aller untersuchten Transkripte hin zu einer früher einsetzenden Differenzierung. Die Transkripte für *Cx43* konnten nur in einer heterozygoten TS-Zelllinie, aber in allen untersuchten Knockout Linien detektiert werden. Möglicherweise versagt die Sensitivität des Northern Blots bei diesem Markergen. Der Verlust des *Cx31*-Kanals resultiert also in einem beschleunigten Differenzierungsprozess von TS-Zellen, angezeigt durch die 2 Tage früher einsetzende Expression ausgewählter Trophoblast-Marker.

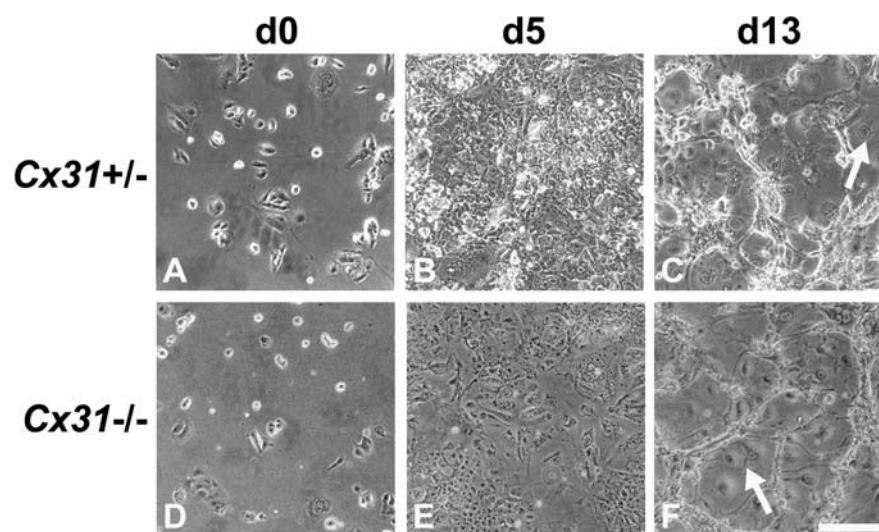


Abb. 3.13. Morphologie von differenzierenden *Cx31*-defizienten TS-Zellkulturen zu verschiedenen Kulturzeiten. Phasenkontrastaufnahmen an verschiedenen Tagen (d) der Differenzierung am Beispiel der *Cx31*^{+/-} TS-Zelllinie #6 und der *Cx31*^{-/-} TS-Zelllinie #11. Die *Cx31*^{-/-} TS-Zelllinie zeigt an Tag 5 eine reduzierte Gesamtzahl von Zellen und an Tag 5 eine erhöhte Anzahl von Trophoblast-Riesenzellen im jeweiligen Vergleich zur *Cx31*^{+/-} TS-Zelllinie. Pfeile, Trophoblast-Riesenzellen. Balken: 100 µm.

3.5.2 Proliferationsverhalten von *Cx31*-defizienten TS-Zelllinien

Der veränderte Differenzierungsprozess der *Cx31*^{-/-} TS-Zellen konnte auch morphologisch an den Kulturen beobachtet werden (Abb. 3.13). In der *Cx31*^{-/-} TS-Zellkultur konnte ab Tag 5 der Differenzierung eine geringere Anzahl von Zellen im Vergleich zur *Cx31*^{+/-} TS-Zellkultur detektiert werden. Ab Tag 7 der Differenzierung war des weiteren eine stärkere Bildung von Riesenzellen in der *Cx31*^{-/-} TS-Zellkultur zu erkennen. Diese Beobachtungen korrelieren mit der im Laufe der Differenzierung schneller abnehmenden Connexin Expression der *Cx31*^{-/-} TS-Zelllinien.

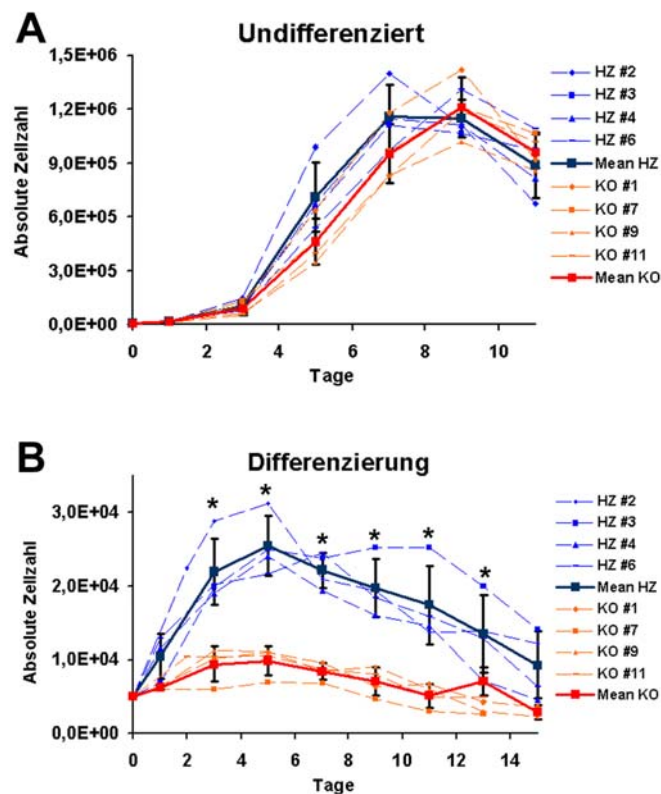


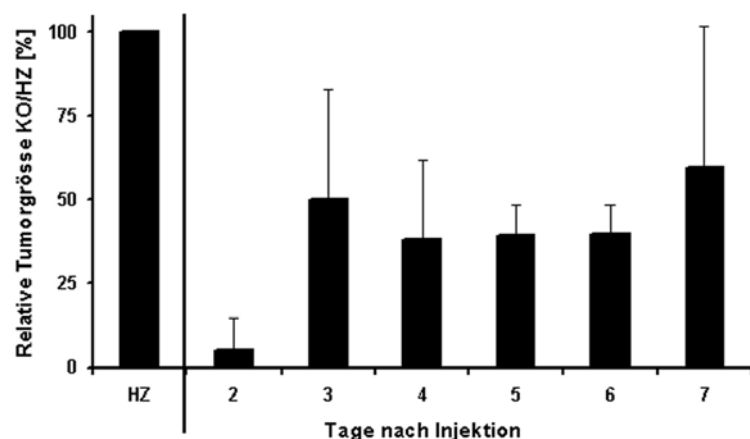
Abb. 3.14. Proliferation von Cx31-defizienten TS-Zelllinien. Dargestellt ist die gemessene absolute Zellzahl der proliferierenden TS-Zelllinien im undifferenzierenden Zustand (A) sowie unter differenzierenden Bedingungen (B). Für die Gruppe der heterozygoten (HZ) und knockout (KO) TS-Zelllinien wurde jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Zellzahlen die an einzelnen Tagen signifikant voneinander abweichen sind gekennzeichnet (*).

Aufgrund der morphologischen Hinweise, dass in den differenzierenden $Cx31^{-/-}$ Kulturen eine geringere Anzahl von Zellen wuchsen, wurden Wachstumskurven der $Cx31$ -defizienten TS-Zelllinien erstellt. Dazu wurde eine definierte Menge der Zellen unter Stammzellbedingungen bzw. unter differenzierenden Bedingungen ausplattiert und die Gesamtzellzahl der Kultur alle 48 h über einen Zeitraum von 11 bzw. 15 Tagen ermittelt. Für jeden Messtag wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und die Werte für die heterozygoten bzw. homozygoten $Cx31$ -defizienten TS-Zelllinien gemittelt. Das Ergebnis (Abb. 3.14) zeigte das es im undifferenzierten Zustand keinen signifikanten Unterschied im Proliferationsverhalten der $Cx31^{+/-}$ und $Cx31^{-/-}$ TS-Zelllinien gab. Ab Tag 9 erreichten beide Kulturen die Konfluenz und gingen in die Absterbphase über. In der Differenzierung zeigte sich ein Unterschied im Proliferationsverhalten der TS-Zelllinien. Die $Cx31^{+/-}$ TS-Zellen wiesen bis zum Tag 5 der Differenzierung eine Zunahme in der Gesamtzellzahl auf, die anschließend kontinuierlich abnahm. Im Gegensatz dazu zeigten die $Cx31^{-/-}$ TS-Zellen mit Einsetzen der Differenzierung ein statistisch signifikant reduziertes Proliferationsverhalten. Im Mittel konnte keine Verdopplung in der Gesamtzellzahl der $Cx31^{-/-}$ TS-Zellen detektiert werden. Diese Experimente bestätigten also, dass während der Differenzierung von $Cx31^{-/-}$ TS-Zelllinien weniger Zellen beobachtet wurden.

3.5.3 Tumorbildende Kapazität Cx31-defizienter TS-Zellen

Die Unterschiede in Proliferation und Riesenzellbildung der Cx31-defizienten TS-Zellen wurde auch im Nacktmausmodell untersucht. Exemplarisch wurde die Knockout TS-Zelllinie #1 in die rechte und die heterozygote TS-Zelllinie #2 in die linke Flanke der selben Maus injiziert, um individuelle Unterschiede zwischen den Tieren zu berücksichtigen. Beide TS-Zelllinien bildeten entsprechend den Wildtyp TS-Zellen kleine, transiente Tumore, die ihre maximale Größe nach 7 Tagen erreichten (Abb. 3.16A, B). Dabei war eine hohe Varianz in der Tumorgöße zwischen den Tieren zu beobachten. Das Tumorwachstum erfolgte nach Injektion von Cx31^{-/-} TS-Zellen langsamer und die Tumore erreichten nie die Größe der Cx31^{+/-} TS-Zell-Tumore. In Abb. 3.15 ist das Ergebnis von 4 parallel durchgeführten Experimenten zusammengefasst. Die Größe des Tumors aus heterozygoten TS-Zellen wurde als Referenz genommen und die Größe des jeweiligen Tumors aus homozygoten TS-Zellen der selben Maus dazu ins Verhältnis gesetzt. Anschließend wurden die relativen Tumorgößen gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Die Tumore aus Cx31^{-/-} TS-Zellen wiesen im Mittel etwa 50% der Größe eines Tumors aus Cx31^{+/-} TS-Zellen auf.

Abb. 3.15. Reduzierte Tumorbildung der Cx31^{-/-} TS-Zellen. Cx31^{+/-} TS-Zellen wurden in die linke und Cx31^{-/-} TS-Zellen in die rechte Flanke einer Nacktmaus injiziert und das Tumorwachstum über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. Die Größe des Cx31^{-/-} Tumors wurde zur Größe des Cx31^{+/-} Tumors (HZ=100%) der selben Maus ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert von 4 Experimenten.



Die histologische Analyse zeigte, dass die Tumormasse aus TS-Zellen hervorgegangen ist (Abb. 3.16C, D). Die Abbildung 11C zeigt ein Blutgefäß, um das herum sich Trophoblastzellen angeordnet haben. Dieses lässt darauf schließen, dass die Lakunen Folge der Arrodierung von Blutgefäße der Haut durch die aus TS-Zellen

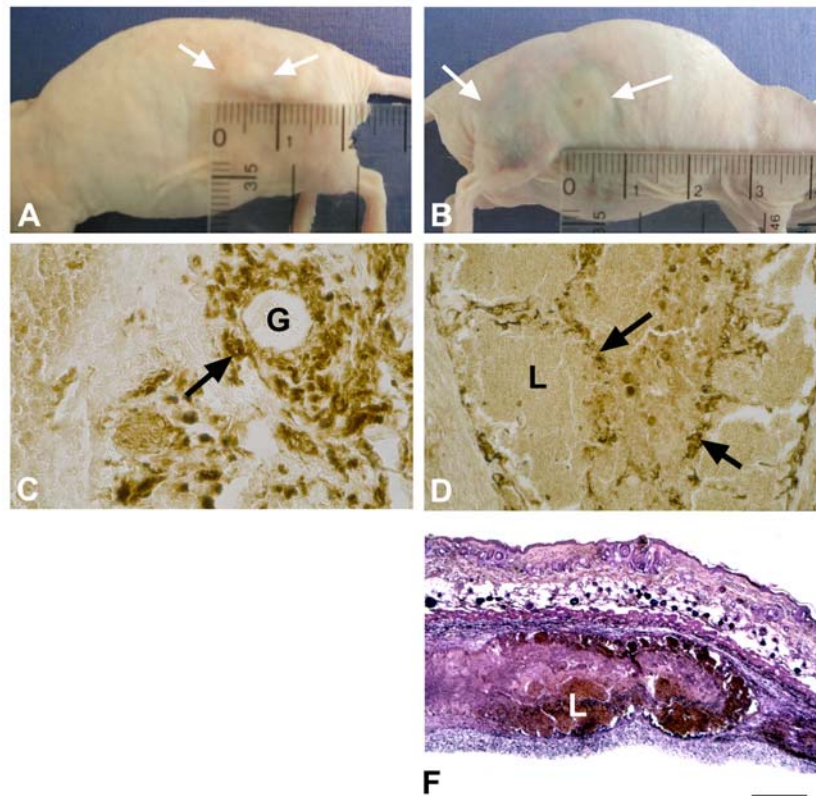


Abb. 3.16. Injektion *Cx31*-defizienter TS-Zellen in das Nacktmausmodell. Morphologische Analyse 7 Tage nach Injektion von 10^7 heterozygoten TS-Zellen in die linke Flanke und 10^7 homozygoten TS-Zellen in die rechte Flanke der selben Nacktmaus. **(A)** Solider TS-Zell Tumor aus heterozygoten TS-Zellen. **(B)** Ausgedehnte hämorrhagische Läsion (Pfeil) um die Injektionsstelle der homozygoten TS-Zellen. Immunhistochemische Detektion von Zytokeratin 8 in **(C)** heterozygoten und **(D)** homozygoten Tumoren identifiziert TS-Zellen (Pfeile) als Tumorzellen. **(F)** HE-gefärbter Technovit-Schnitt eines Tumors aus homozygoten TS-Zellen. G, Gefäß; L, Lakune. Maßstab in C und D: 200 µm; F: 1 mm.

differenzierten Riesenzellen entstanden sind. Des weiteren zeigte die Histologie, dass die *Cx31*^{-/-} TS-Zelltumore weitaus flacher waren und größere blutgefüllte Lakunen aufwiesen, als die Wildtyp Kontrolle (vergleiche Abb. 3.16F mit Abb. 3.10E).

Nach 7 Tagen konnte rund um die Injektionsstelle der *Cx31*^{-/-} TS-Zellen ein 2,5 cm im Durchmesser messender Hof aus hämorrhagischen Läsionen beobachtet werden. Dieser Hof trat nach Injektion *Cx31*^{+/-} TS-Zellen erst mit Beginn der Resorption nach Tag 7 auf und war weniger stark ausgeprägt. Die vergleichsweise stärkere Hofbildung nach Injektion von *Cx31*^{-/-} TS-Zellen kann mit der zuvor festgestellten schneller ablaufenden Differenzierung zu Trophoblast-Riesenzellen erklärt werden, die bis zur Resorption weiter in das umliegende Gewebe invadieren und im größeren Umfang Blutgefäße der Haut arrodieren konnten.

3.6 Cx26-defiziente Trophoblast-Stammzellen

10 Blastozysten, aus der Verpaarung zweier heterozygoter Cx26-defizienter Tiere, wurden zur Generierung von TS-Zelllinien eingesetzt. Daraus resultierten jeweils eine Cx26^{+/+} und Cx26^{-/-} sowie 6 Cx26^{+/-} TS-Zelllinien (Abb. 3.17).

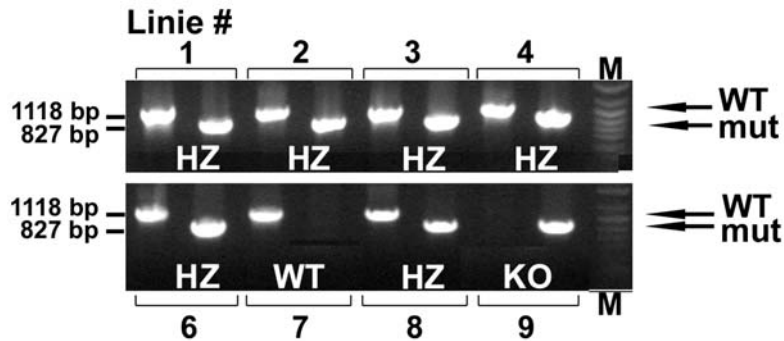


Abb. 3.17. Genotypisierung der generierten Cx26-defizienten TS-Zelllinien. Die Detektion des Wildtyp (WT) und des mutierten (mut) Gens in der aus TS-Zellen isolierten DNA erfolgte mittels PCR. Primer spezifisch für die kodierende Region des Cx26-Gens bzw. des *neo^R*-Gens wurden mit einem, stromabwärts in der 3'-UTR liegenden, Ankerprimer kombiniert. Dargestellt ist die Auftrennung der PCR-Produkte in einer Agarose-Gelelektrophorese. HZ, Cx26^{+/-} TS-Zelllinie; KO, Cx31^{-/-} TS-Zelllinie; WT, Wildtyp TS-Zelllinie; M, Marker.

Das Differenzierungsverhalten der Cx26-Knockout TS-Zelllinie #9 wurde anhand der Connexine und Trophoblast-Markergene untersucht (Abb. 3.18), um zu eruieren zu welchen Veränderungen der Verlust des Cx26-Kanals führt. Das Ergebnis zeigte, dass die Expression von *Mash2* und *Tpbpa* der Wildtyp Kontrolle (Abschnitt 3.4.2) entsprach. Der sprunghafte Anstieg in der Expression von *Pl-1* setzte im Vergleich zum Wildtyp (Tag 7) schon an Tag 5 der Differenzierung ein. Außerdem zeigte die schwache *Pl-1* Expression an den Tagen 0 bis 3 der Differenzierung an, dass einige Zellen spontan zu Riesenzellen differenziert sind. Die Expressionsverlauf von *Cx31* und *Cx31.1* ähnelte dem der Wildtyp Kontrolle, nur erfolgte bei der Cx26^{-/-} TS-Zelllinie eine stärkere Reprimierung der Transkription nach Tag 7 der Differenzierung. *Cx43* konnte auch in dieser Zelllinie nicht detektiert werden.

Die Cx26^{-/-} TS-Zelllinie #9 zeigte im Zeitfenster von Tag 1 bis 4 der Differenzierung also keine Unterschiede zur Wildtyp Kontrolle. Möglicherweise erfolgt nach Tag 7 der Differenzierung eine stärkere Bildung von Riesenzellen. Da der Cx26^{-/-} Klon keine weiteren interessanten Differenzierungswege zeigte, wurde er im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

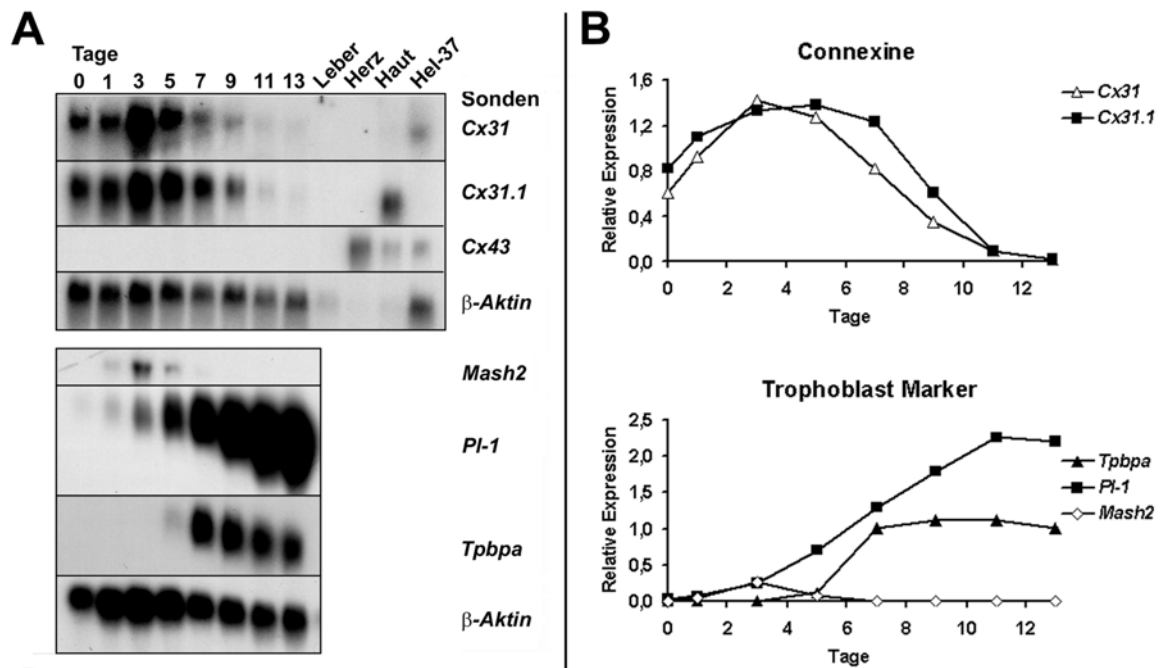


Abb. 3.18. Expression von Connexinen und Trophoblast-Markergenen während der Differenzierung der $Cx26^{-/-}$ TS-Zelllinie #9. (A) Northern Blot-Hybridisierung von Gesamt-RNA einer Wildtyp TS-Zelllinie an verschiedenen Tagen der Differenzierung mit Sonden gegen *Cx31*, *Cx31.1*, *Cx43*, *Mash2*, *Pl-1*, *Tpbpa* und β -Aktin. Total-RNA aus Leber, Herz, Haut, sowie der Keratinozyten-Zelllinien Hel-37 diente als Positivkontrolle. Es wurden zwei Blots mit der RNA aus der selben Präparation eingesetzt. (B) Densitometrische Auswertung der in (A) gezeigten Autoradiographien. Die Signale wurden gegen das entsprechende β -Aktin Signal abgeglichen.

3.7 *Cx43*-defiziente Trophoblast-Stammzellen

Zur Generierung von *Cx43*-defizienten TS-Zelllinien wurden Blastozysten aus verschiedenen Verpaarungen eingesetzt. Insgesamt konnten fünf $Cx43^{+/+}$ (Wildtyp), zwei $Cx43^{+/-}$ und drei $Cx43^{-/-}$ TS-Zelllinien generiert werden (Abb. 3.19).

In Abbildung 3.20 ist die Analyse des Differenzierungsverlaufs einer $Cx43^{+/+}$ TS-Zelllinie im Vergleich zu einer $Cx43^{-/-}$ TS-Zelllinie angegeben. Beide Linien wiesen eine identische Induktion der Expression von *Cx26* (Tag 5), *Pl-1* (Tag 5-7) und *Tpbpa* (Tag 7) in der Differenzierung auf. Das Maximum der *Mash2*-Expression lag in beiden Fällen an Tag 3 der Differenzierung. Damit führt der Verlust des *Cx43* nicht zu einer Änderung des zeitlichen Expressionsmusters der untersuchten Markergene. Die Werte für die relative Expression aus der densitometrischen Analyse wurden in Abbildung 3.20 nicht normalisiert; daher ergeben sich Unterschiede in den Signalstärken der einzelnen Transkripte zwischen den beiden untersuchten TS-

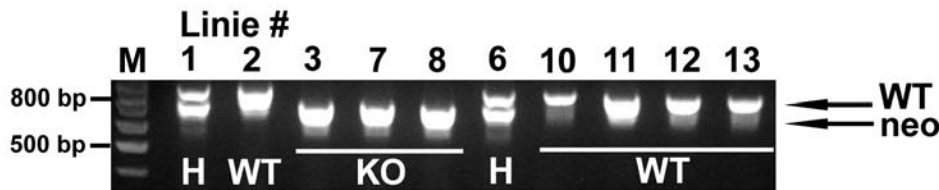


Abb. 3.19. Genotypisierung der generierten *Cx43*-defizienten TS-Zelllinien. Die Detektion des Wildtyp (WT) und des mutierten (mut) Gens in der aus TS-Zellen isolierten DNA erfolgte mittels PCR. Primer spezifisch für die kodierende Region des *Cx43*-Gens bzw. des *neo^R*-Gens wurden mit einem, stromabwärts in der 3'-UTR liegenden, Ankerprimer kombiniert. Dargestellt ist die Auftrennung der PCR-Produkte in einer Agarose-Gelelektrophorese. HZ, *Cx43*^{-/-} TS-Zelllinie; KO, *Cx43*^{-/-} TS-Zelllinie; WT, *Cx43*^{+/+} TS-Zelllinie; M, Marker.

Zelllinien. Auch bei der *Cx43*^{+/+} TS-Zelllinie #12 konnten *Cx43*-Transkripte im Northern Blot nicht detektiert werden.

Die *Cx43*^{+/+} TS-Zelllinie #10 zeigte das Expressionsmuster TS-Zelllinie #10 (Daten nicht gezeigt). Die *Cx43*-Knockout TS-Zelllinie #7 hingegen ergab eine Verschiebung der Marker in Richtung einer schneller ablaufenden Differenzierung von 2-4 Tagen. Angemerkt sei, dass alle *Cx43*-Knockout TS-Zelllinien eine extreme Tendenz zur spontanen Differenzierung der gesamten Kultur besaßen. Es ist noch zu klären, ob die auffallende Abweichung der *Cx43*^{-/-} TS-Zelllinie #7 eine spezifische Folge der Inaktivierung des *Cx43*-Gens ist, oder ob es sich um eine mögliche pathologische Veränderung der Zelllinie handelt.

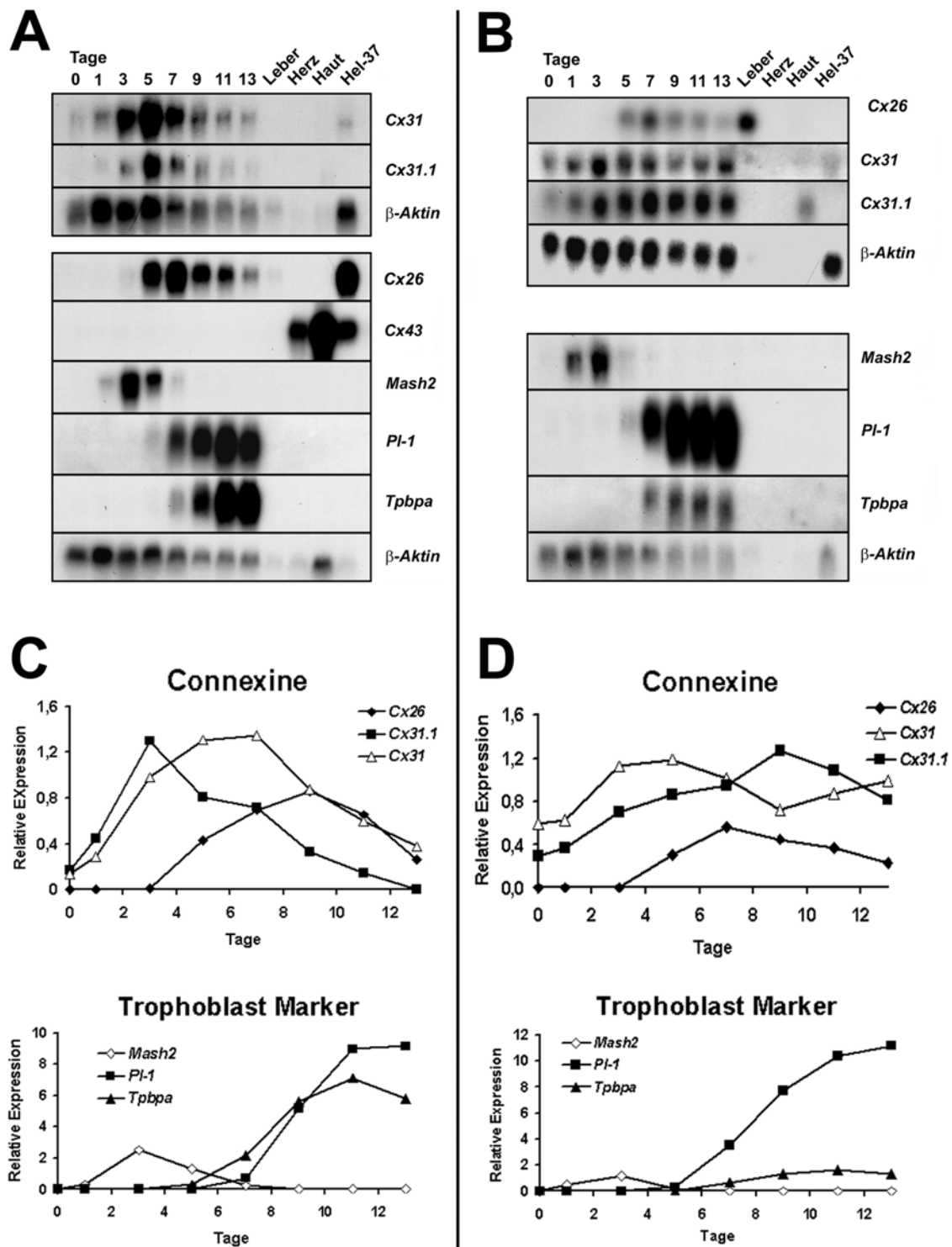


Abb. 3.20. Vergleichende Analyse der Expression von Connexinen und Trophoblast-Markern in der Differenzierung Cx43-defizienter TS-Zelllinien. (A) Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA der Cx43^{+/+} TS-Zelllinie #12 an verschiedenen Tagen der Differenzierung mit verschiedenen Sonden. Total-RNA aus Leber, Herz, Haut, sowie der Keratinozyten-Zelllinien HeLa-37 diente als Positivkontrolle. Es wurden zwei Blots mit der RNA aus der selben Präparation eingetzt. **(B)** Entsprechend (A) mit Gesamt-RNA der Cx43^{-/-} TS-Zelllinie #3. **(C)** Densitometrische Auswertung der Autoradiographien aus (A). **(D)** Densitometrische Auswertung der Autoradiographien aus (B). Die Signale wurden gegen das entsprechende β -Aktin Signal abgeglichen.

3.7.1 Proliferationsverhalten von Cx43-defizienten TS-Zelllinien

Das Proliferationsverhalten von jeweils zwei $Cx43^{+/+}$ und $Cx43^{-/-}$ TS-Zelllinien wurde im undifferenzierten Zustand als auch während der Differenzierung untersucht (Abb. 3.21). Im undifferenzierten Zustand zeigten die $Cx43^{-/-}$ Knockout TS-Zelllinien im Vergleich zu den $Cx43^{+/+}$ TS-Zelllinien die Tendenz zu einer leicht reduzierten proliferativen Aktivität. Dieser Befund ist aber aufgrund der geringen Fallzahlen statistisch nicht abgesichert. Die beiden neo^R -Kassetten im Genom der $Cx43^{-/-}$ TS-Zelllinien könnten einen Einfluss auf die Zellphysiologie besitzen (Kwan, 2002) und diesen Unterschied bedingen. In der Differenzierung waren keine Unterschiede im Proliferationsverhalten der TS-Zelllinien zu erkennen. Sowohl Wildtyp als auch Cx43-Knockout TS-Zelllinien zeigten in der Differenzierung eine Phase proliferativer Aktivität. Damit entsprachen $Cx43^{+/+}$ und $Cx43^{-/-}$ TS-Zelllinien den $Cx31^{+/+}$ TS-Zelllinien (Abschnitt 3.5.2). Der Verlust des Cx43-Kanals führt also nicht zu einer Änderung im Proliferationsverhalten von TS-Zellen.

Aus den Ergebnissen mit den $Cx43^{-/-}$ TS-Zelllinien geht hervor, dass zu einer abgesicherten Aussage noch mehr Linien generiert und untersucht werden sollten. Daher wurden im Folgenden die Cx31-defizienten TS-Zelllinien fokussiert betrachtet.

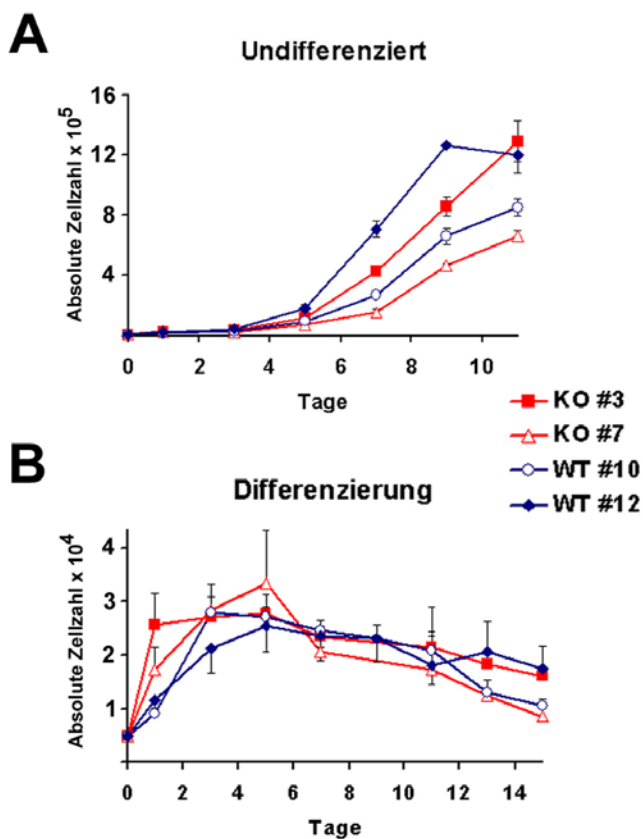


Abb. 3.21. Proliferation von Cx43-defizienten TS-Zelllinien. Dargestellt ist die gemessene absolute Zellzahl der proliferierenden TS-Zelllinien im undifferenzierenden Zustand (A) sowie unter differenzierenden Bedingungen (B). Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen und die Standardabweichung.

3.8 Vergleichende Gene-Array Analysen Cx31-defizienter TS-Zelllinien

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der vergleichenden Gene-Array-Analyse der generierten heterozygoten und homozygoten Cx31-defizienten TS-Zelllinien. Dadurch sollten Kandidatengene ermittelt werden, die durch den Verlust von Cx31 in ihrem Expressionsprofil verändert sind und einen möglichen molekularen Erklärungsansatz für die zuvor beschriebene Fehldifferenzierung in der Cx31-defizienten Trophoblastzelllinie darstellen könnten. In Abbildung 3.22 ist die in dieser Arbeit eingesetzte Strategie der Gene-Array-Analysen dargestellt. Für jede einzelne der Cx31-defizienten TS-Zelllinien wurde eine Gene-Array-Hybridisierung sowohl im undifferenzierten Zustand als auch an Tag 4 der Differenzierung durchgeführt. Die Cx31^{-/-} TS-Zelllinie #7 ist nicht mehr angewachsen und konnte daher nicht im differenzierten Zustand untersucht werden. Zunächst wurden die Array Daten vom undifferenzierten Zustand miteinander verglichen, wobei jede homozygote TS-Zelllinie mit jeder heterozygoten TS-Zelllinien verglichen wurde. Die 16 Einzelvergleiche erlaubten Aussagen über individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen TS-Zelllinien. Des weiteren wurde ein entsprechender Vergleich an Tag 4 der Differenzierung durchgeführt.

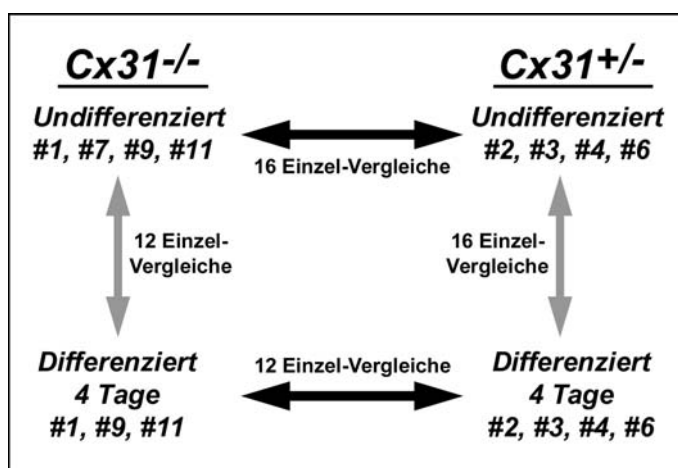


Abb. 3.22. Gene-Array-Strategie zur Identifizierung von Genen, die durch den Verlust von Cx31 in ihrer Expression verändert sind. Hetero- und homozygote Cx31-defiziente TS-Zelllinien wurden jeweils im undifferenzierten Zustand und an Tag 4 der Differenzierung miteinander verglichen (schwarze Pfeile). Daraus resultierten 16 Einzelvergleiche bzw. 12 Einzelvergleiche, deren Ergebnisse hier dargestellt sind. Die Vergleiche innerhalb der beiden genetisch unterschiedlichen Gruppen (graue Pfeile) wurden durchgeführt, um Aussagen über die Expression einzelner Gene während der Differenzierung machen zu können.

Der eingesetzte Array enthält etwa 6000 bekannten murine Gene und etwa 6000 murine ESTs, die durch verschiedene Oligonukleotide auf der Oberfläche repräsentiert wurden. Aus den hybridisierten Arrays wurde in der absoluten Analyse durch eine Software und unter Verwendung spezifischer Algorithmen ermittelt, ob ein

entsprechendes Transkript in den TS-Zellen vorhanden (present), nicht vorhanden (absent) oder grenzwertig (marginal) war. Im Mittel wurden in undifferenzierten TS-Zellen 6155 (± 179) Transkripte als vorhanden detektiert und 6018 (± 182) als nicht vorhanden. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen der Gruppe der hetero- und homozygoten Cx31-defizienten TS-Zelllinien. In TS-Zellen an Tag 4 der Differenzierung konnten im Mittel 5943 (± 168) Transkripte als vorhanden und 6253 (± 172) als nicht vorhanden detektiert werden, wobei ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen (heterozygote bzw. homozygote Cx31-defiziente TS-Zelllinien) vorhanden war.

Auf dem Gene-Array befanden sich ‚probe-sets‘ für 14 verschiedene Connexine. Tabelle 3.3 zeigt das Ergebnis der Absoluten Analyse für diese Isoformen. Von den 14 Connexin-Isoformen wurden Cx26, Cx31, Cx31.1 und Cx43-Transkripte in TS-Zellen exprimiert. Cx43, das mit zwei verschiedenen ‚probe-sets‘ auf dem Array repräsentiert war, zeigte in der absoluten Analyse variierende Ergebnisse. Cx40 Transkripte konnten in jeweils einer undifferenzierten Cx31^{+/-} und Cx31^{-/-} TS-Zelllinie detektiert werden.

Tab. 3.3: Detektion von Cx-spezifischen Transkripten in Cx31-defizienten TS-Zellen mittels Gene-Array-Hybridisierung. Angegeben ist für den undifferenzierten und differenzierenden Zustand die Anzahl der HZ bzw. KO Linien, in denen ein Transkript als vorhanden (P, present), nicht vorhanden (A, absent) oder grenzwertig (M, marginal) detektiert wurde.

Gen	Datenbank Nummer	Undifferenziert		Differenzierung Tag 4	
		Cx31 HZ (n=4)	Cx31 KO (n=4)	Cx31 HZ (n=4)	Cx31 KO (n=3)
Cx26	M81445	4 P	3 P	4 P	3 P
Cx30	Z70023	4 A	4 A	4 A	3 A
Cx30.3	M91443	4 A	4 A	4 A	3 A
Cx31	X63099	4 P	-	4 P	-
Cx31.1	M91236	4 P	4 P	4 P	3 P
Cx32	X84215	4 A	4 A	4 A	3 A
Cx36	AF016190	4 A	4 A	4 A	3 A
Cx37	X57971	4 A	4 A	4 A	3 A
Cx40	X61675	1 P / 3 A	1 P / 2 A / 1M	4 A	3 A
Cx43 (1)	M63801	3 P / 1 A	4 P	3 P / 1 A	1 P / 2 A
Cx43 (2)	M62801	2 P / 2 A	2 P / 1 A / 1M	2 P / 2 A	1 P / 2 A
Cx45	X63100	4 A	4 A	4 A	3 A
Cx46	U44955	4 A	4 A	4 A	3 A
Cx50	M91234	4 A	4 A	4 A	3 A
Cx57	AJ010741	4 A	4 A	4 A	3 A
Mash2	U77628	4 A	4 A	4 P	3 P
PI-1	M35662	2 P / 2 A	4 P	3 P / 1 A	3 P
Tpba	X17071	4 A	4 A	4 A	4 A

Der Trophoblast-Marker *Mash2* konnte (entsprechend den Northern Blot-Analysen) nicht in undifferenzierten TS-Zellen, sondern nur an Tag 4 der Differenzierung detektiert werden. *Tpbpa*, das in TS-Zellen an Tag 7 (*Cx31*^{+/-} und Wildtyp) bzw. Tag 5 (*Cx31*^{-/-}) der Differenzierung induziert wird, war dementsprechend im Array an Tag 4 noch nicht exprimiert. In einzelnen heterozygoten und in allen homozygoten *Cx31*-defizienten TS-Zelllinien konnten *Pl-1* Transkripte nachgewiesen werden. Die Daten aus den Gene-Arrays bestätigten die zuvor gemachten Untersuchungen zur Expressionsanalyse der Connexine

3.8.1 Hierarchisches Clustering

Um zu ermitteln, welche Gruppen sich aufgrund des Expressionsmusters innerhalb der untersuchten TS-Zelllinien bilden, wurde ein hierarchisches Clustering durchgeführt. In diesem Analyseverfahren wurden die Gene aufgrund der Ähnlichkeiten in ihrem Expressionsmuster in verschiedene Gruppen (Cluster) eingeordnet. Dabei wurden nur diejenigen Gene einbezogen, die in mindestens drei TS-Zelllinien beider experimentellen Gruppen (*Cx31*^{+/-} sowie *Cx31*^{-/-} TS-Zelllinien vorhanden (present) waren). Dieses Kriterium erfüllten insgesamt 6918 Gene. In Abb. 3.23 ist das Ergebnis der Cluster-Analyse dargestellt. Wie erwartet ist zu erkennen, dass es eine Gruppe von Genen gibt, deren Expression charakteristisch für den undifferenzierten Zustand waren, sowie eine Gruppe von Genen, die vorwiegend in der Differenzierung exprimiert wurden.

Das Clustering der TS-Zelllinien zeigte, dass alle undifferenzierten TS-Zelllinien in einer Gruppe und alle differenzierten TS-Zelllinien in einer gesonderten Gruppe zusammengefasst wurden. Innerhalb der Gruppe der undifferenzierten TS-Zelllinien existierte keine weitere Ordnungsstruktur. Dahingegen bildeten innerhalb der Gruppe der differenzierten TS-Zelllinien die *Cx31*^{-/-} TS-Zelllinien eine Subgruppe, die den *Cx31*^{+/-} TS-Zelllinien gegenüberstanden. Nur die heterozygote Zelllinie #4 zeigte eine nähere Verwandtschaft zu den Knockout TS-Zelllinien als zu den anderen heterozygoten TS-Zelllinien, wurde aber von den homozygoten TS-Zelllinien hierarchisch abgegrenzt. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust des *Cx31* an Tag 4 der Differenzierung, zu einer signifikanten Änderung des Expressionsmusters führt, während er in undifferenzierten TS-Zellen keine für das Clusterverfahren hinreichende Unterschiede hervorrief.

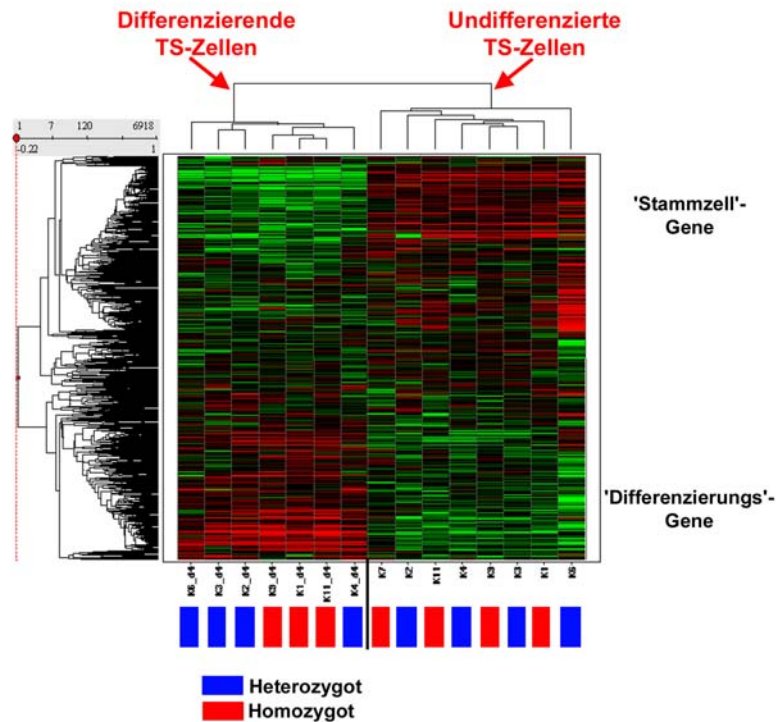


Abb. 3.23. Hierarchisches Clustering. Die in TS-Zellen exprimierte Gene wurden aufgrund der Ähnlichkeiten in ihrem Expressionsmuster in Cluster eingeordnet. Einbezogen wurden nur die Gene, die in mindestens 3 heterozygoten sowie 3 homozygoten Cx31-defizienten TS-Zelllinien vorhanden (present) waren. Die Signale der einzelnen Gene wurden auf den Median aller Arrays normalisiert. Das hellste rot zeigt das 2,5fache und das hellste grün das 0,4fache des Median an. Schwarze Balken entsprechen dem Median. Das Dendrogramm gibt die Verwandtschaft der einzelnen TS-Zelllinien an. Aufgrund der Expression von spezifischen (Stammzell-) Genen wurden die undifferenzierten TS-Zelllinien den differenzierenden gegenübergestellt, die ihrerseits durch die Expression spezifischer (Differenzierungs-) Gene charakterisiert sind.

3.8.2 Vergleichende Analyse

Zur Identifizierung von Genen, die durch den Verlust des Cx31-Kanals in ihrer Expression verändert waren, wurden die Daten der Arrays für die Cx31^{-/-} TS-Zelllinien denen der Cx31^{+/-} TS-Zelllinien gegenübergestellt. In der vergleichenden Analyse wurden die *probe sets* zweier Arrays miteinander verglichen und durch spezifische Algorithmen ermittelt, ob und mit welchem Faktor die Expression eines Gens erhöht, oder erniedrigt war. Für die weiteren Auswertungen wurden nur die Gene betrachtet, die in der vergleichenden Analyse mindestens eine 2,5fach erhöhte oder erniedrigte Expression zeigten und deren Regulation einem Wahrscheinlichkeitswert (*change p-value*) von 0,001 für hoch-, bzw. 0,999 für herunterregulierte Gene standhielten. Des Weiteren wurde der Mann-Whitney Test als statistische Analyse eingesetzt. Dieser Test ermittelt, ob die Änderung in der Signalstärke eines Gens zwischen den zwei

experimentellen Gruppen (homozygote und heterozygote *Cx31*-defiziente TS-Zelllinie bzw. differenzierte gegen undifferenzierte TS-Zellen) statistisch signifikant waren und berechnet aus den Daten einen quantitativen Wert für das Maß der Regulation.

Vergleicht man *Cx31*^{-/-} mit *Cx31*^{+/-} TS-Zellen im undifferenzierten Zustand, so war nach Anwendung der Filterkriterien im Mittel die Expression von 62 (±30) Genen erhöht, die von 338 (±221) Genen erniedrig. Von einer Regulation waren in den 16 Einzelvergleichen insgesamt 3495 verschiedene Gene betroffen. Am Tag 4 der Differenzierung erwiesen sich 177 (±80) Gene als erhöht und 76 (±24) Gene als erniedrigt. Insgesamt waren 1313 Gene in 12 Einzelvergleichen reguliert.

3.8.3 Regulation der Connexine und Trophoblastmarker während der Differenzierung

In Tab. 3.4 sind die Daten aus der vergleichenden Analyse für die vier in TS-Zellen exprimierten Connexine dargestellt. Angegeben sind alle Regulationen, die die Filterkriterien erfüllten und in mindestens der Hälfte der Einzelvergleiche auftraten. Bei *Cx31*^{+/-} TS-Zellen konnte am Tag 4 der Differenzierung, verglichen mit dem undifferenzierten Zustand, in allen Einzelvergleichen eine Zunahme in der Expression von *Cx26*, *Cx31* und *Cx31.1* detektiert werden, die nach dem Mann-Whitney-Test statistische signifikant war. *Cx43* wurde lediglich in der Hälfte der Einzelvergleiche herunterreguliert. Dieses Ergebnis entspricht den durch die Northern Blot Analyse gemachten Beobachtungen (vergleiche Abschnitt 3.5.1). In der Differenzierung von *Cx31*-Knockout TS-Zellen wurde ebenfalls in allen Einzelvergleichen eine deutliche Erhöhung der *Cx26*-Expression festgestellt, während *Cx43* wiederum nur in Einzelfällen herunterreguliert wurde. Es konnten allerdings keine Regulation von *Cx31.1* detektiert werden.

Für die Trophoblast-Marker ergab die vergleichende Analyse, dass die *Cx31*^{-/-} im Vergleich zu den *Cx31*^{+/-} TS-Zellen eine Erhöhung der *Pl-1*-Expression aufwiesen, was auf eine höhere Rate von spontaner Differenzierung schließen lässt. Entsprechend den Ergebnissen der Northern Blot-Analysen kann *Mash2* nur in der Differenzierung der heterozygoten TS-Zelllinien detektiert werden, da die Expression bei den homozygoten TS-Zellen um zwei Tage vorverschoben (Tag 1 statt Tag 3) ist und die Expression am Tag 4 bereits wieder abnahm. *Tpbpa* wird in TS-Zellen erst nach Tag 4 exprimiert und weist daher keine Regulation auf.

Tab. 3.4 Regulation der Expression von Connexinen und Trophoblast-Markergenen in undifferenzierten und differenzierenden *Cx31*-defizienten TS-Zellen. Dargestellt ist das jeweilige Ergebnis aus den 4 vergleichenden Analysen für die Regulation der Connexine und Trophoblast-Markergene. Angegeben sind nur die Regulationen, die in mindestens der Hälfte der 12 bzw. 16 Einzelvergleiche (wie angezeigt, vordere Zahl) eine Regulation aufwiesen. Das Ausmaß der Erhöhung (+) oder Erniedrigung (-) ist als Mittel angegeben. Hellgrau unterlegt sind Regulationen, die im Mann-Whitney-Test statistisch signifikant waren.

A Connexine						
Gen	Datenbank Nummer	Undifferenziert KO vs. HZ	Differenziert KO vs. HZ	KO diff. vs. KO undiff.	HZ Diff. Tag 4 vs. HZ undiff.	
<i>Cx26</i>	M81445	-	7/12 +4,5	12/12 +20,1	16/16 +18,2	
<i>Cx31</i>	X63099	-	-	-	16/16 +3,5	
<i>Cx31.1</i>	M91236	7/16 +2,1	7/12 +4,5	-	16/16 +3,5	
<i>Cx43</i>	M63801	-	-	6/12 -4,6	7/16 -6,4	
B Trophoblast-Markergene						
Gen	Datenbank Nummer	Undifferenziert KO vs. HZ	Differenziert KO vs. HZ	KO diff. vs. KO undiff.	HZ Diff. Tag 4 vs. HZ undiff.	
<i>Mash2</i>	U77628	-	-	-	12/16 +2,74	
<i>Pl-1</i>	M35662	10/16 +3,8	6/12 +2,2	-	-	
<i>Tpbpa</i>	X17071	-	-	-	-	

3.8.4 Identifizierung regulierter Gene

Um individuelle Unterschiede zwischen den generierten TS-Zelllinien zu berücksichtigen, wurden die Einzelvergleiche der Arrays als Grundlage zur Identifizierung von Genen verwendet, die in ihrer Expression durch den Verlust von *Cx31* verändert sind. In der folgenden Analyse wurden nur die Gene einbezogen, die in mindestens der Hälfte der Einzelvergleiche (d.h. 8 von 16 im undifferenzierten Zustand und 6 von 12 im differenzierten Zustand) eine Regulation zeigten. Im Anhang A2 sind die Gene und ESTs dargestellt, die diese Bedingungen erfüllten. Der Vergleich von *Cx31*^{-/-} mit *Cx31*^{+/-} TS-Zellen im undifferenzierten Zustand ergab eine Regulation von 43 Genen, die die genannten Bedingungen erfüllten. Von diesen zeigten 28 Gene eine Erniedrigung und 15 eine Erhöhung der Expression. An Tag 4 der Differenzierung waren entsprechend 84 Gene reguliert, von denen 17 erniedrigt und 67 erhöht waren. Durch Datenbankvergleiche wurde ermittelt, ob regulierte ESTs Teil eines bekannten Gens waren. Für alle identifizierten Gene wurde durch Literaturrecherchen eine Funktion ermittelt und die Gene nach Kargul *et al.* (2001) in verschiedene funktionelle Klassen eingeordnet. In Abbildung 3.24 ist das Ergebnis der Klassifikation dargestellt. Keines der regulierten Gene gehörte zu den Klassen Apoptose, DNA-Replikation oder Hitzeschock/Stress. Betrachtet man die Gruppen der herunterregulierten Gene, so sind 6 der 28 Gene, die im undifferenzierten Zustand in

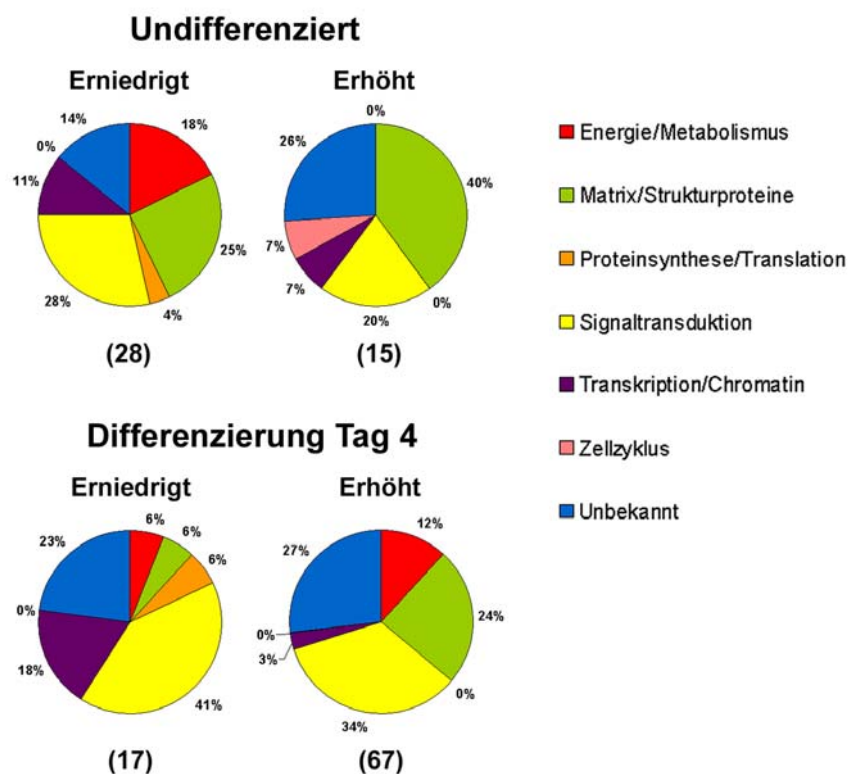


Abb. 3.24. Funktionelle Klassifikation regulierter Gene. Dargestellt sind die regulierten Gene aus dem Vergleich von homozygoten mit heterozygoten *Cx31*-defizienten TS-Zelllinien im undifferenzierten Zustand bzw. an Tag 4 der Differenzierung. Die Gene wurden anhand ihrer Funktion in Klassen eingeteilt, die entsprechend der Legende farbig markiert sind. Die Anzahl der als regulierten Gene ist in Klammern angezeigt. Die Klasse ‚Unbekannt‘ beinhaltet Gene, für die keine Funktion ermittelt werden konnte, sowie nicht charakterisierte EST-Sequenzen.

Cx31^{-/-} TS-Zellen reguliert waren, auch an Tag 4 der Differenzierung unter den 17 herunterregulierten Genen zu finden. Bei den hochregulierten Genen gibt es 8 Gene die in beiden Gruppen auftraten. Nur das Gen H19 war in allen Einzelvergleichen des undifferenzierten Zustandes in *Cx31*^{-/-} TS-Zellen herunterreguliert. Im differenzierten Zustand war *Cx31.1* in allen *Cx31*^{-/-} TS-Zellen herunterreguliert. Die in Abschnitt 3.5.1 durchgeführten Northern Blot-Analysen zeigten aber, dass aufgrund der schneller Differenzierung der *Cx31*-Knockout TS-Zellen eine vorzeitige Repression der *Cx31.1*-Expression stattfand. Daher ist dieses Gene-Array Ergebnis (Tag 4 der Differenzierung) wahrscheinlich kein spezifischer Effekt des Verlusts von *Cx31*.

Im undifferenzierten Zustand konnte kein Gen detektiert werden, das in *Cx31*^{-/-} TS-Zellen in allen Einzelvergleichen hochreguliert war. Im differenzierten Zustand war die Expression eines ESTs (AW123574) deutlich erhöht, für den keine bekannte oder homologe Sequenz ermittelt werden konnte. In Tabelle 3.5 sind die Regulationen

derjenigen Gene angegeben, die in Kapitel 4 dieser Arbeit diskutiert werden. In Anhang 7.2 befinden sich nähere Informationen.

Tab. 3.5 Regulation ausgewählter Gene. Dargestellt sind die Daten für die in dieser Arbeit diskutierten Gene. Angegeben ist, in wie vielen der Einzelvergleiche (12 im undifferenzierten Zustand bzw. 16 an Tag 4 der Differenzierung) eine Regulation erfolgte (vordere Zahl). Das Ausmaß der Erhöhung (+) oder Erniedrigung (-) ist als Mittel aus den Einzelvergleichen angegeben. Hellgrau unterlegt sind Regulationen, die im Mann-Whitney-Test statistisch signifikant waren. n.r., nicht reguliert.

Gen	Datenbank Nummer	Undifferenziert KO vs. HZ	Differenziert KO vs. HZ
<i>H19</i>	X58196	16/16 -49,9	6/12 -38,7
<i>Glut3</i>	M75135	14/16 -7,2	8/12 -6,7
<i>Glut3 (EST)</i>	AI854156	13/16 -4,4	8/12 -4,6
<i>p57^{kip2}</i>	U22399	8/16 +3,3	n.r.
<i>Zac1 (set 1)</i>	X95504	n.r.	11/12 +24,3
<i>Zac1 (set 2)</i>	X95503	n.r.	8 /12 +4,6
<i>c-fos</i>	V00727	8/12 +3,8	n.r.

3.8.5 Differentielle Expression des Glucose Transporters 3 (*GLUT3*) in *Cx31*-defizienten TS-Zellen

Bei den herunterregulierten Genen haben wir uns zunächst auf die Glukose-Transporter Isoform 3 (*Glut3*) fokussiert. Dieser war auf dem Array mit einem definierten *probe set* vertreten (Datenbanknummer: M75135). Daneben erwies sich ein regulierter EST (Datenbanknummer AI854156) ebenfalls als *Glut3*-spezifische Sequenz. *Glut3* war sowohl im undifferenzierten (13 bzw. 14 von 16 Einzelvergleichen) als auch im differenzierten Zustand (8 von 12 Einzelvergleichen) herunterreguliert. Die Expression von *Glut3* in *Cx31*^{-/-} TS-Zellen war gegenüber den *Cx31*^{+/-} TS-Zellen im Schnitt etwa 5,5fach erniedrigt.

Zur Verifizierung der Array-Ergebnisse wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt (Abb. 3.25). Darin wurde die Expression von *Glut3* in *Cx31*-defizienten TS-Zellen im undifferenzierten Zustand sowie an Tag 4 der Differenzierung untersucht. Nur in den *Cx31*^{+/-} TS-Zellen aber nicht in den *Cx31*^{-/-} TS-Zellen konnte im undifferenzierten Zustand ein *Glut3*-spezifisches Produkt detektiert werden. Dagegen konnte in den *Cx31*^{-/-} TS-Zelllinien unter den gleichen PCR-Bedingungen kein Signal nachgewiesen werden. An Tag 4 der Differenzierung konnte weder in undifferenzierten noch in den differenzierten *Cx31*-defizienten TS-Zellen eine *Glut3*-spezifisches Produkt amplifiziert werden. Dies zeigt, dass *Glut3* im normalen Differenzierungsablauf von *Cx31*^{+/-} TS-Zellen herunterreguliert wird. *Cx31*^{-/-} TS-Zellen

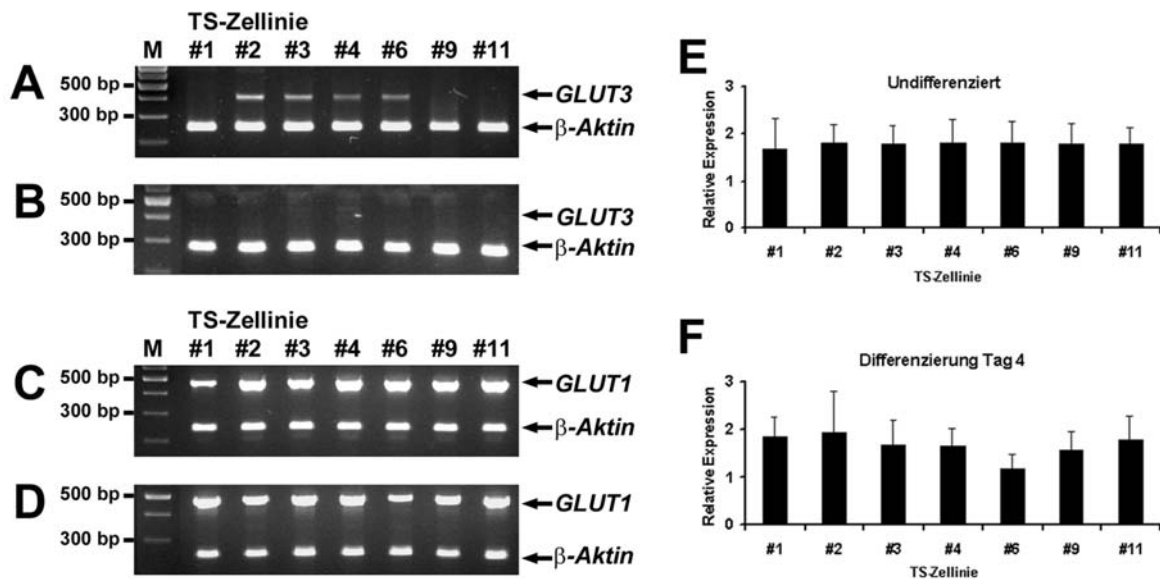


Abb 3.25. Semiquantitative RT-PCR-Analyse der *Glut1* und *Glut3* Expression in *Cx31*-defizienten TS-Zellen. RNA aus undifferenzierten TS-Zellen (A, C) und TS-Zellen an Tag 4 der Differenzierung (B, C) wurde revers transkribiert. Gleiche Mengen cDNA wurden in einer spezifischen PCR zum Nachweis von *Glut3* (A, B) bzw. *Glut1* (C, D) eingesetzt. β -Aktin diente als interner Standard. (E) Densitometrische Auswertung von C (n=3). (F) Densitometrische Auswertung von (D) (n=3). M, Marker. #1, #9, #11: *Cx31*^{-/-} TS-Zelllinien; #2, #3, #4, #6: *Cx31*^{+/-} TS-Zelllinien.

wiesen aber schon im undifferenzierten Zustand eine Repression der *Glut3*-Expression auf. Diese war aber nicht vollständig, da eine PCR mit 35 Zyklen auch bei den differenzierten hetero- und homozygoten *Cx31*-defizienten TS-Zellen zu einer Detektion des *Glut3*-spezifischen PCR-Produkts führte (nicht dargestellt).

Des Weiteren wurde die semiquantitative RT-PCR auch mit *Glut1*-spezifischen Primern durchgeführt. Es zeigte sich, dass homo- und heterozygote *Cx31*-defiziente TS-Zelllinien *Glut1* sowohl im undifferenzierten Zustand als auch an Tag 4 der Differenzierung exprimierten. Die densitometrische Analyse ergab keinen Unterschied in der *Glut1*-Expression zwischen den verschiedenen TS-Zell-Genotypen.

3.8.6 Immunzytochemischer Nachweis von GLUT3 an differenzierenden *Cx31*-defizienten TS-Zellen

Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers wurde die Expression von GLUT3 auf Proteinebene an *Cx31*-defizienten TS-Zellen im undifferenzierten Zustand, sowie während der Differenzierung untersucht (Abb. 3.26). *Cx31*^{+/-} TS-Zellen zeigten im undifferenzierten Zustand eine homogene Expression von GLUT3. Das membranständige Signal konnte in allen Stammzellen detektiert werden. An Tag 1

und Tag 2 der Differenzierung konnten in der Immunzytochemie keine Veränderung in der Expression festgestellt werden. Ab Tag 3 hingegen war eine deutliche Repression der GLUT3-Expression erkennbar, die in den darauffolgenden Tagen kontinuierlich abnahm. Ab Tag 5 der Differenzierung konnte in den Kulturen keine GLUT3 Markierung mehr festgestellt werden. Ein deutlich verändertes Expressionsmuster zeigten die $Cx31^{-/-}$ TS-Zellen. Bei diesen konnte schon im undifferenzierten Zustand eine nahezu keine GLUT3-Expression festgestellt werden. Nur einige wenige Cluster von Zellen wiesen noch eine GLUT3-Markierung an der Membran auf. Die GLUT3-Expression der undifferenzierten $Cx31^{-/-}$ TS-Zellen war der einer differenzierenden $Cx31^{+/-}$ TS-Zellkultur an Tag 3 der Differenzierung vergleichbar. Dieses Ergebnis bestätigt zum einen, dass GLUT3 während der Differenzierung von TS-Zellen herunterreguliert wird, zum anderen führt der Verlust von $Cx31$ zu einer zeitlich verfrühten Repression von GLUT3 in $Cx31^{-/-}$ TS-Zellen.

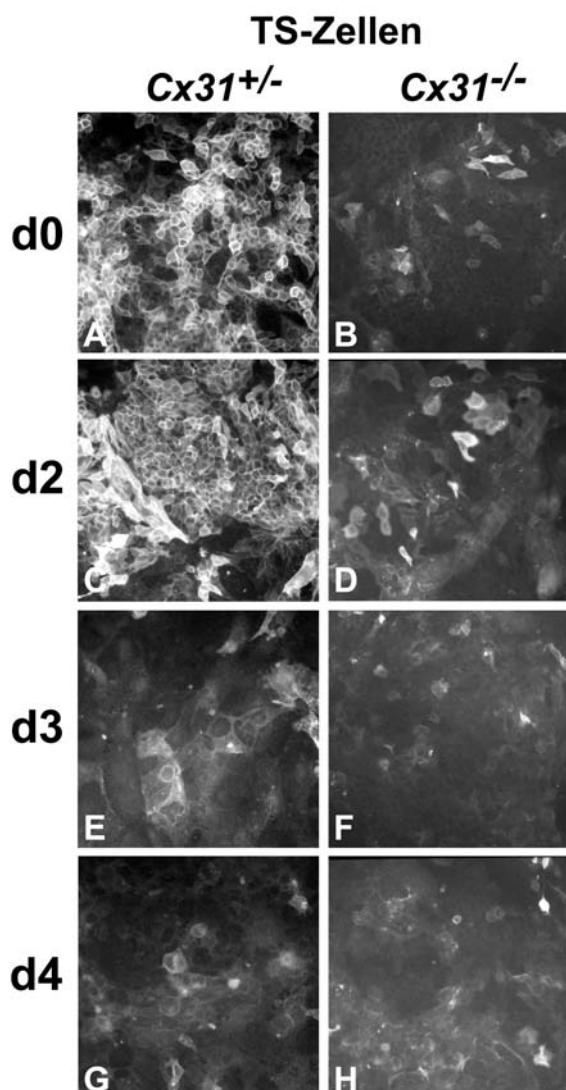


Abb. 3.26. Differentielle Expression des Glukosetransporters GLUT3 in $Cx31$ -defizienten TS-Zellen. Dargestellt ist der immunzytochemische Nachweis von GLUT3 an $Cx31^{+/-}$ (A, C, G, E) und $Cx31^{-/-}$ (B, D, F, H) TS-Zellen an verschiedenen Tagen (d0-d4) der Differenzierung. GLUT3 wird während der Differenzierung von TS-Zellen herunterreguliert. $Cx31^{-/-}$ TS-Zellen weisen an d0 und d2 eine vorzeitige Repression der GLUT3 Expression auf.

4 Diskussion

Die Expression von Connexinen während der Plazentaentwicklung der Maus unterliegt einer präzisen räumlichen und zeitlichen Regulation. Cx31 ist das charakteristische Connexin in der frühen Trophoblastzelllinie. Die verschiedenen Zellpopulationen bei der Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie sind ebenfalls durch die Expression spezifischer Connexine charakterisiert. Der Synzytiotrophoblast des Labyrinths exprimiert Cx26, der Spongiotrophoblast zunächst Cx31 und, mit fortschreitender Differenzierung, auch Cx43. Trophoblast-Riesenzellen zeigen die ausschließliche Expression von Cx43. Die Inaktivierung des Cx31-Gens in der Maus führt zu einer transienten, plazentaren Dymorphogenese, die den Tod von 60% der Embryonen zwischen den Tagen 10,5 und 13,5 *pc* zur Folge hat (Plum *et al.*, 2001). Dieser Phänotyp der Cx31-Knockout Plazenta basiert auf einer Fehldifferenzierung von Stammzellen, die einerseits zu einem reduzierten Labyrinth und Spongiotrophoblasten, andererseits zu einer erhöhten Anzahl von Riesenzellen führt (Plum *et al.*, 2001).

4.1 Cx43 kann den Verlust von Cx31 in überlebenden Knockout Plazenten nicht kompensieren

60% der Cx31-Knockout Embryonen sterben *in utero* zwischen den Tagen 10,5 und 13,5 *pc* aufgrund der transienten plazentaren Dymorphogenese. Bei 40% kommt es zu einer Regeneration der plazentaren Entwicklung und Funktion, die zu einem Überleben der Embryonen führt. In der Plazenta wird die Expression von Cx43 nach Tag 10,5 *pc* im Spongiotrophoblasten induziert. Die Koexpression mit Cx31 ließ vermuten, der Cx43-Kanal den Verlust des Cx31-Kanals kompensieren kann, was zu einem Wiedereinsetzen der Differenzierungsprozesse führt (Plum *et al.*, 2001). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde in dieser Arbeit durch Kreuzung der beiden Einzelstämme die Cx31/Cx43-Doppelknockout Maus generiert.

Die Plazenta von Cx43-Knockout Mäusen wurde bisher nicht untersucht, aber eine verminderte Anzahl von Cx43-Knockout Tieren zwischen den Tagen 16-18 *pc* wurde beschrieben (Reaume *et al.*, 1995). Die Analyse der Cx31/Cx43-Doppelknockout Maus setzte daher zunächst die morphologische Analyse der Cx43-Knockout Plazenta voraus. Die Untersuchung der Cx43-Knockout Embryonen bestätigte, dass das Ungleichgewicht in der mendelschen Verteilung der Nachkommen schon an Tag

13,5 *pc* vorlagt, aber es konnten keine morphologischen Befunde für eine plazentare Fehlentwicklung oder Funktion gefunden werden. Insbesondere die Trophoblast-Riesenzellen entsprachen der Wildtyp Kontrolle. Cx43 ist daher für die Entwicklung der Plazenta nach Tag 13.5 *pc* nicht essentiell. Die verminderte Anzahl von Cx43-Knockout Embryonen muss eine andere Ursache besitzen.

Die Analyse der Cx31/Cx43-Doppelknockout Mauslinie zeigte, dass im Zeitraum von Tag 11,5 bis 15,5 *pc* vitale Doppelknockout Embryonen gefunden werden konnten, die sich makroskopisch nicht von den Geschwister-Embryonen (Cx31^{+/-}/Cx43^{+/-}) unterschieden. Die Plazenta der Cx31/Cx43-Doppelknockout Embryonen entsprach in Gewicht und Morphologie einer Cx31-Knockout Plazenta am selben Tag. Die Induktion von Cx43 im Spongiotrophoblasten kann daher nicht für die Regeneration der Cx31-Knockout Plazenten verantwortlich sein. Der Cx31- und der Cx43-Kanal müssen daher, obwohl sie koexprimiert sind, unterschiedliche Funktionen besitzen.

Die Analyse der Cx31/Cx43-Doppelknockout Maus bewies, dass die zusätzliche Inaktivierung des Cx43-Gens nicht zu einem sich von der Cx31-Knockout Maus unterscheidenden plazentaren Phänotypen führt. Die Induktion von Cx43 im Spongiotrophoblasten der Cx31-Knockout Plazenta kann daher nicht für deren Regeneration und damit für das Überleben von 40% der Embryonen verantwortlich sein. Wahrscheinlicher ist, dass Cx31.1 die Funktion von Cx31 in der Plazenta partiell kompensieren kann. Cx31 folglich ist spielt eine entscheidende und spezifische Rolle bei der Erhaltung des Stammzellpotentials in der frühen Trophoblastzelllinie der Maus.

4.2 Das Modell der Trophoblast-Stammzellen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Trophoblast-Stammzellen ein geeignetes *in vitro* Modell zur Analyse der Funktion von Connexinen in der Trophoblastentwicklung der Maus sind. Das Connexin-Expressionsmuster von TS-Zellen entspricht dem des Trophoblasten *in vivo*. Im undifferenzierten, proliferativen Zustand sind TS-Zellen wie der frühe Trophoblast durch die spezifische Bildung von Cx31-Kanälen gekennzeichnet. Die Transkription von Cx31.1 konnte als weitere Isoform in der Plazenta und in TS-Zellen beschrieben werden. Während der Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie zeigen TS-Zellen das koordinierte Connexin-Expressionsmuster des Trophoblasten. Cx43 wird während der Bildung von Riesenzellen exprimiert und die Induktion von Cx26 indiziert die potentielle Bildung

von Synzytiotrophoblast. In Nacktmäuse injizierte TS-Zellen führen zur Bildung hämorrhagischer Tumore, was die invasive Kapazität und die Möglichkeit der TS-Zellen die Wirtsgefäße zu arrodieren verdeutlicht.

Cx26-, Cx31- bzw. Cx43-defiziente TS-Zelllinien konnten aus den Blastozysten der entsprechenden Knockout Mauslinien generiert werden. Die Analyse des Differenzierungsverlaufs der Knockout TS-Zelllinien ergab, dass der Verlust des Cx31-Kanals zu einer beschleunigten Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie führt, die mit dem Verlust der proliferativen Aktivität korreliert. Die bei der Analyse der Cx31-Knockout Plazenta gemachten morphologischen Befunde konnten damit an TS-Zellen auf molekularer und physiologischer Ebene bestätigt werden. Die vergleichende Gene-Array-Analyse Cx31-defizienter TS-Zelllinien ergab, dass der Verlust von Cx31 bereits im undifferenzierten Stammzellzustand zu einem endogenen Shift in Richtung Differenzierung zu Riesenzellen führt, was durch die veränderte Regulation des Glukosetransporters GLUT3 gezeigt werden konnte.

4.3 Das Connexin-Expressionsmuster von Wildtyp TS-Zellen

Die Analyse des Connexin-Expressionsmusters von undifferenzierten TS-Zellen zeigte, dass mindestens 10 verschiedene Isoformen transkribiert werden. 8 dieser Isoformen (Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx40, Cx43, Cx45, Cx57) werden auch in der Blastozyste exprimiert (Houghton *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 1996). Dieser Befund steht im Einklang mit der Tatsache, dass TS-Zellen aus 3,5 *dpc* Blastozysten generiert wurden und die genetischen Marker des Trophektoderms sowie des extraembryonalen Ektoderms aufweisen (Tanaka *et al.*, 1998). Cx36, das in der Literatur als vorwiegend in Neuronen exprimiert beschrieben (Al-Ubaidi *et al.*, 2000) und auf Transkriptebeine in der Blastozyste gefunden wurde (Houghton *et al.*, 2002), ist nicht in undifferenzierten TS-Zellen exprimiert. Möglicherweise ist die Expression von Cx36 in der Blastozyste auf die innere Zellmasse beschränkt und fehlt im Trophektoderm. Des Weiteren konnte die Transkription von Cx47, einem kürzlich neu klonierten Connexin (Teubner *et al.*, 2001) in TS-Zellen nachgewiesen werden. Da von der Blastozyste (Houghton *et al.*, 2002) als auch von der Retina (Guldenagel *et al.*, 2000) bekannt ist, dass nicht alle transkribierten Connexine auch translatiert werden, muss letztendlich immer der Nachweis von Connexinen auf Proteinebene erfolgen.

Der entscheidende Unterschied in der Connexin-Expression von TS-Zellen im Vergleich zur Blastozyste liegt in der Umsetzung zu Proteinen und deren Einbau in Gap Junctions. Während im Trophektoderm der Blastozyste bisher 5 Connexine in Gap Junction-Plaques beschrieben wurden (Cx31, 31.1, 40, 43, 45; Houghton *et al.*, 2001; Reuss *et al.*, 1996), konnte, unter Verwendung der gleichen spezifischen Antikörper, nur Cx31 in undifferenzierten TS-Zellen detektiert werden. Vorhergehende Arbeiten am Blastozysten-Auswuchsmodell zeigten, dass es mit der Implantation zu einer Segregation der Connexin-Expression zwischen Embryo und der Trophoblastzelllinie kommt (Dahl *et al.*, 1996). Während Cx43-Kanäle nur im Embryo gebildet werden, ist Cx31 im extraembryonalen Gewebe exprimiert. Da Cx31 ausschließlich homomere Connexone und homotypische Gap Junctions bildet, d.h. keine funktionellen Kanäle mit anderen Connexinen bildet (Elfgang *et al.*, 1995), kommt es dadurch zu einer Abgrenzung der Zellen des Trophoblasten gegenüber den anderen embryonalen und extraembryonalen Geweben (Dahl *et al.*, 1996; Lo und Gilula, 1979). Entsprechende Daten wurden auch für die Ratte publiziert (Reuss *et al.*, 1996; Reuss *et al.*, 1997). Das Connexin-Expressionsmuster verdeutlicht, dass TS-Zellen nicht die Kapazität des Trophektoderms besitzen, sondern bereits einen Schritt weiter in der Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie stehen, in dem die Kompartimentalisierung der Connexine auf Proteinebene bereits stattgefunden hat. Eine kürzlich publizierte Arbeit zeigte, dass nur das extraembryonale Ektoderm und das Chorionektoderm das Potential besitzen TS-Zellen hervorzubringen (Uy *et al.*, 2002). TS-Zellen weisen demnach die korrekte Regulation der Connexin-Expression entsprechend der frühen Trophoblastzelllinie auf.

Die Quantifizierung der Transkriptmengen durch die Northern Blot-Analyse zeigte in undifferenzierten TS-Zellen eine starke Expression von Cx31 und Cx31.1 sowie eine schwache Expression von Cx30.3 und Cx45. Die schwachen Signale für Cx30.3 und Cx45 könnten Folge einer noch nicht vollständigen Reprimierung der Transkription dieser Gene während der Segregation in der TS-Zelllinie sein. Auf Proteinebene konnte Cx45 nicht detektiert werden. Da für Cx30.3, Cx31.1 und Cx47 zur Zeit keine Antikörper zur Verfügung stehen, kann über die Translation dieser Transkripte und den potentiellen Einbau der Proteine in Gap Junctions keine Aussage gemacht werden.

Das starke Northern Blot-Signal für Cx31.1 in TS-Zellen und der Nachweis von Cx31.1-spezifischen Transkripten in der 10,5 dpc Plazenta lässt vermuten, dass

Cx31.1 auch funktionelle Kanäle im Trophoblasten der Maus bildet. Die Cx31.1-Knockout Maus, die kürzlich generiert worden ist, zeigt nach ersten Ergebnissen eine um ca. 50% reduzierte Anzahl von homozygoten Cx31.1-defizienten Nachkommen (K. Willecke, unveröffentlichte Daten). Möglicherweise liegt ein plazentarer Defekt ähnlich dem der Cx31-Knockout Maus vor. Des Weiteren zeigten erste Untersuchungen der Cx31.1-Knockout Maus, dass die Expression von Cx31 in der Haut deutlich reduziert ist, die genaue Phänotyp-Analyse steht aber noch aus. Cx31 und Cx31.1 sind mit Cx30.3 in der Haut koexprimiert und innerhalb der Connexin-Multigenfamilie weisen diese Connexine die größte Ähnlichkeit in der Aminosäure-Sequenz zueinander auf (Hennemann *et al.*, 1992). Diese strukturelle Ähnlichkeit und die nahe genomische Lokalisation der drei Gene auf Maus Chromosom 4 lässt auf Gemeinsamkeiten in der Regulation und Funktion dieser Connexine schließen (Hennemann *et al.*, 1992). Möglicherweise besitzen Cx31 und Cx31.1 auch im Trophoblasten überlappende Funktionen.

4.4 TS-Zellen zeigen eine koordinierte Expression von Connexinen während der Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie

Cx26, Cx31 und Cx43 bilden Kanäle im differenzierenden Trophoblasten der Maus (Reuss *et al.*, 1996). Daher wurde die Expression dieser Isoformen und die von Cx31.1 während der Differenzierung von TS-Zellen entlang der Trophoblastzelllinie untersucht. TS-Zellen können durch den Entzug von FGF4, Heparin und konditioniertem Medium entlang der Trophoblastzelllinie zu Spongiotrophoblast und Riesenzellen differenziert werden (Tanaka *et al.*, 1998). Der Differenzierungsverlauf wurde daher anhand der Markergene *Mash2*, *Tpbpa* und *Pl-1* verfolgt. Diese zeigten ein Expressionsmuster, das dem vorheriger Arbeiten entsprach (Yan *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 1998). *Mash2*, der Marker für den proliferierenden, diploiden Trophoblasten des Ektoplazentarkonus und seines Derivates, dem Spongiotrophoblasten wies an Tag 3 ein Maximum in der Expression auf. Die anschließende Abnahme in der *Mash2*-Expression zeigte den Verlust des Stammzellpotentials der Kultur an. Ab Tag 5 der Differenzierung konnte die Bildung von Spongiotrophoblast und Riesenzellen anhand der Marker *Tpbpa* bzw. *Pl-1* beobachtet werden.

Cx31 wird in allen undifferenzierten TS-Zellen exprimiert. In der Differenzierung wird die Expression von Cx31 zunächst durch die Bildung von Zell/Zell-Kontakten und

damit potentieller Gap Junctions verstärkt. In der Plazenta ist Cx31 charakteristisch für alle Subpopulationen des Trophoblasten mit Ausnahme der Riesenzellen (Plum *et al.*, 2001). Im Verlauf der Differenzierung nimmt die Expression von Cx31 leicht ab, was mit der zunehmenden Bildung von Riesenzellen, die kein Cx31 exprimieren einhergeht. Der nahezu identische Expressionsverlauf von Cx31.1 ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Cx31.1 mit Cx31 in TS-Zellen und möglicherweise auch in der Plazenta koexprimiert ist, was aber noch zu beweisen ist. An Tag 3 der Differenzierung wird die Expression von Cx26 in TS-Zellen induziert und ab Tag 5 sind funktionelle Cx26-Kanäle in Subpopulationen der Kultur zu erkennen. In der Plazenta ist der Cx26-Kanal zwischen den Synzytiotrophoblast-Schichten des Labyrinths exprimiert (Gabriel *et al.*, 1998; Pauken *et al.*, 1995; Risek und Gilula, 1991). Der Zeitpunkt der Induktion von Cx26 in TS-Zellen fällt genau mit dem Maximum der *Mash2*-Expression zusammen. Das Labyrinth der Plazenta entwickelt sich zwischen dem Chorion und dem Ektoplazentarkonus, der daraufhin zum Spongiotrophoblasten differenziert (Hemberger *et al.*, 2001). Dieser Prozess beginnt, wenn das allantoide Mesoderm an die basale Oberfläche des Chorions adhärirt (Cross, 2000). Zu diesem Zeitpunkt exprimieren der Ektoplazentarkonus und das Chorion *Mash2* (Guillemot *et al.*, 1994). Die Expression von Cx26 ist ein Hinweis auf die endogene Differenzierungsmöglichkeit zu Synzytiotrophoblast in einer differenzierenden TS-Zellkultur. Da in diesem *in vitro* System keine embryonalen oder maternalen Komponenten vorhanden sind, die einen induzierenden oder regulierenden Mechanismus darstellen könnten, ist die potentielle Fähigkeit von TS-Zellen zu Synzytiotrophoblast zu differenzieren ein interessanter Ansatzpunkt zur Untersuchung der Mechanismen, die zur Labyrinthbildung führen.

Ab Tag 10,5 *pc* wird im Spongiotrophoblasten der Maus die Expression von Cx43 induziert. Cx43 ist zunächst mit Cx31 koexprimiert, aber im Verlauf der Differenzierung zu Riesenzellen wird Cx31 reprimiert und Cx43 ist dann die spezifische Isoform für Riesenzellen (Plum *et al.*, 2001). Zur Analyse der Cx43-Expression in differenzierenden TS-Zellen erwies sich der Northern Blot als nicht ausreichend sensitiv genug. Cx43-Transkripte konnten nur in einzelnen TS-Zelllinien detektiert werden. Ein ebenfalls uneinheitliches Ergebnis für Cx43 zeigten die Gene-Array Analysen, deren Sensitivität dem eines Northern Blots vergleichbar ist. Die semiquantitative RT-PCR könnte für die Regulation dieses Connexins deutlichere Resultate liefern. In undifferenzierten TS-Zell-Kolonien ist Cx43 auf Proteinebene

nicht exprimiert. In einigen Zellen konnte allerdings Cx43 auch im undifferenzierten Zustand detektiert werden. Diesen Zellen wiesen eine deutlich abweichende Morphologie im Vergleich zu den TS-Zellen auf und ihre Lage am Rand von TS-Kolonien sind diese als spontan differenzierte Zellen zu bezeichnen (Tanaka *et al.* 1998, Yan *et al.*, 2001). Da Zellen mit dieser Morphologie auch einen Verlust der Cx31-Expression zeigen, kann vermutet werden, dass es sich um die identische Zellpopulation handelt.

Eine der Plazenta entsprechende Regulation der Cx43-Expression in TS-Zellen konnte nur bei der Differenzierung der Cx31^{+/-} TS-Zelllinie #4 beobachtet werden, bei der nach Tag 11 die Expression von Cx43 einsetzte. In der Plazenta wird die Expression von Cx43 im Spongiotrophoblasten nach Tag 10.5 *pc* induziert und korreliert mit der zunehmenden Differenzierung des der Spongiotrophoblastzellen zu Riesenzellen (Plum *et al.* 2001). Im Laufe der Differenzierung zu Riesenzellen nimmt die Schichtdicke des Spongiotrophoblasten kontinuierlich ab. Der Wechsel in der Connexin-Expression von Cx31 zu Cx43 markiert in TS-Zellen als auch in der Plazenta einen Differenzierungsstatus, der mit dem Verlust der Stammzellpotentials verbunden ist.

TS-Zellen weisen demnach ein Connexin-Expressionsmuster auf, das dem der Plazenta vergleichbar ist. Alle bisher im Trophoblasten beschriebenen Connexin Isoformen werden in der Differenzierung zeitlich reguliert exprimiert. Die genaue Zuordnung der Connexin-Isoformen zu definierten Populationen in einer differenzierenden TS-Zellkultur ist Gegenstand derzeitiger Arbeiten.

4.5 TS-Zellen zeigen die invasive Kapazität des Trophoblasten

Nach Injektion in athymische Nacktmäuse bilden TS-Zellen transiente, hämorrhagische Tumore bis zu einem Zentimeter im Durchmesser. Die TS-Zellen erlangen Zugang zu den Blutgefäßen in der Haut der Wirtsmouse, was mit der Bildung von blutgefüllten Lakunen sichtbar wird. Es ist bekannt, dass Tumore bis zu einem Durchmesser von 2 mm den Gas- und Nährstoffaustausch durch Diffusion bewältigen können, während größere Tumore in ihrem Wachstum abhängig von der Entwicklung einer Blutzufuhr sind (Folkman und Cotran, 1976). In der Plazenta der Maus kann ab Tag 12.5 *pc* die Invasion von Trophoblastzellen in die Spiralarterien der proximalen Dezidua beobachtet werden, wo diese das Endothel der Blutgefäße ersetzen. Dieser Prozess ist notwendig zur Errichtung einer vaskulären Verbindung zwischen diesen

Arterien und des durch Trophoblast ausgefüllten Zentralkanals der Plazenta (Adamson *et al.*, 2002). Die in die Nacktmaus injizierten TS-Zellen zeigten ebenfalls ein Ersetzen des Endothels durch Trophoblastzellen und eine Eröffnung der Blutgefäße. Nach Injektion wiesen die TS-Zellen eine Phase proliferativer Aktivität auf, die zur Bildung der Tumorzellmasse führte. Gleichzeitig, aufgrund des Fehlens von FGF4 und Faktoren des Fibroblasten-konditionierten Mediums, die zur Erhaltung des Stammzellpotentials essentiell sind, setzt die Differenzierung zu Riesenzellen ein, die in den blutgefüllten Lakunen detektiert werden konnten. Trophoblast-Riesenzellen besitzen eine Funktion bei der Transition von Endothel ausgekleideten Arterien zu Trophoblast ausgekleideten Sinusoiden in der Plazenta (Adamson *et al.*, 2002). Die Riesenzellen der Plazenta bilden die angiogenetischen Faktoren VEGF (Achen *et al.*, 1997) und Proliferin (Jackson *et al.*, 1994) sowie die potentiellen vasodilatatorischen Faktoren Adrenomedullin und NO, die bei Modulation der maternalen Arterien eine Rolle spielen (Cross *et al.*, 2002).

Auch ektopisch auftretende Trophoblast-Riesenzellen führen zu hemochorialem Blutfluss. So differenzieren *Parp*-defiziente ES-Zellen, aufgrund der Inaktivierung des Gens, nach Injektion in Nacktmäuse zu multinukleären Trophoblast-Riesenzellen, die zur Bildung von hämorrhagischen Teratomen führen (Nozaki *et al.*, 1999). Beim Menschen ersetzt der invasive Zytotrophoblast das Endothel der maternalen Spiralarterien (Zhou *et al.*, 1997). Auch die humane maligne Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 führt nach Injektion in die Nacktmaus zur Bildung hämorrhagischer Tumore, bei denen das Endothel der Arterien durch die Riesenzellen des Tumors ersetzt wird (Grümmer *et al.*, 1999). Im Gegensatz zur Zelllinie Jeg3 bilden TS-Zellen deutlich kleinere und transiente Tumore. Die fortschreitende Differenzierung der TS-Zellen zu Trophoblast-Riesenzellen führt zu einem Verlust der proliferativen Aktivität und die noch vorhandene unspezifische Immunantwort der Wirtsmaus, führte zur Resorption der TS-Zellen. Entgegen der malignen Zelllinie Jeg3 (Gellhaus, 2003) konnte bei TS-Zellen bisher keine Invasion in die Muskelschicht beobachtet werden. Erste Langzeitversuche über einen Zeitraum von 3 Monaten zeigten außerdem keine Hinweise auf ein metastasierendes Potential der TS-Zellen. Dieses zeigt, dass die aus TS-Zellen differenzierten Zellpopulationen das natürliche Potential des Trophoblasten beibehalten: sie werden postmitotisch, bevor sie invadieren.

4.6 Connexin defiziente TS-Zellen

In dieser Arbeit konnten *Cx26*-, *Cx31*- bzw. *Cx43*-Knockout TS-Zelllinien aus den Blastozysten der entsprechenden Mauslinien generiert werden. Wie schon der Phänotyp der Knockout Mäuse zeigte (Gabriel *et al.*, 1998; Plum *et al.*, 2001; Guillemot *et al.*, 1995), ist die Expression jedes einzelnen dieser Connexine nicht essentiell für die Frühentwicklung der Embryonen. *Cx26*-Kanäle sind im Trophektoderm der Maus Blastozysten nicht exprimiert (Houghton *et al.*, 2002) und in der Trophoblastzelllinie wird die Expression erst mit der Differenzierung des Synzytiotrophoblasten induziert (Pauken *et al.*, 1995). Daher ist die Inaktivierung von *Cx26* für die Generierung von TS-Zellen ohne Folgen. Entsprechendes gilt für *Cx43*, das in undifferenzierten TS-Zellen ebenfalls nicht translatiert wird.

Um zu analysieren, zu welchen physiologischen Veränderungen der Verlust von *Cx26*, *Cx31*, bzw. *Cx43* in TS-Zellen führt, wurden jeweils mehrere Connexin-defiziente TS-Zelllinien parallel generiert und untersucht.

Der Fokus dieser Arbeit bestand in der Analyse der *Cx31*-defizienten TS-Zelllinien. Damit der Einfluss des individuellen genetischen Hintergrunds der Embryonen so gering wie möglich ist, wurden zur Gewinnung der *Cx31*-defizienten Blastozysten Weibchen aus einem Wurf mit dem selben Männchen verpaart. Als Kontrolle für die *Cx31*-Knockout TS-Zellen wurde die heterozygote TS-Zelllinie genutzt. Da die *Cx31*^{+/-} Mäuse keinen Unterschied zur Wildtyp Kontrolle aufwiesen (Plum *et al.*, 2001) war dieses Vorgehen möglich. Die heterozygoten *Cx31*-defizienten TS-Zellen enthielten des weiteren eines der Targeting Konstrukte, das zur Inaktivierung der kodierenden Region des *Cx31*-Gens eingesetzt wurde. Das *lacZ* Reporter gen und die Neomycin-Resistenzkassette könnten theoretisch Einflüsse auf die Zellphysiologie besitzen (Kwan *et al.*, 2002).

Die Analyse des Differenzierungsverlaufes der Connexin defizienten TS-Zelllinien zeigte, dass der Verlust von *Cx26* bzw. *Cx43* zu keinen Veränderungen in der zeitlich koordinierten Expression der Trophoblastmarker *Mash2*, *Tpbpa* und *Pl-1* sowie der untersuchten Connexine führte. Die Inaktivierung von *Cx26* in der Maus führt zu einem plazentaren Phänotyp, der den Tod der Embryonen an Tag 9.5 *pc* zur Folge hat. Dieser Defekt basiert aber auf einem reduzierten feto-maternalen Nährstofftransport und nicht auf einer Fehldifferenzierung des Synzytiotrophoblasten (Gabriel *et al.*, 1998). Inwiefern der Verlust des *Cx26*-Gens die Bildung der *Cx26*-

exprimierenden Subpopulation in der differenzierenden TS-Kultur beeinflusst, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cx43 für die Entwicklung der Plazenta nicht essentiell ist. Das Proliferationsverhalten der generierten $Cx43^{-/-}$ TS-Zelllinien bestätigte diese Aussage. Die Analyse des Differenzierungsverhaltens einer $Cx43$ -Knockout TS-Zelllinien ergab, dass diese keine Unterschiede zum Wildtyp aufwies. Die Untersuchung weitere Zelllinien ist zur statistischen Abklärung der Ergebnisse allerdings notwendig. Auffallend war, dass die $Cx43^{-/-}$ TS-Zelllinien häufig eine spontane Differenzierung der gesamten Kultur zeigten. Möglicherweise besitzen die beiden neo^R -Kassetten einen Einfluss auf die Zellphysiologie. Derzeit werden Knockout Mäuse so generiert, dass die Resistenzkassette nach Etablierung der Mauslinie entfernt werden kann, um derartige Einflüsse zu verhindern (Kwan *et al.*, 2002).

4.7 Cx31 ist für die koordinierte Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie und die Erhaltung des proliferativen Stammzellpotentials verantwortlich

Die Expression von Cx31-Kanälen konnte an undifferenzierten TS-Zellen konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Neben $Cx31$ -exprimieren TS-Zellen auch $Cx31.1$. Wahrscheinlich kann die Expression von $Cx31.1$ den Verlust von Cx31 in den Knockout TS-Zellen als auch in der Maus insoweit kompensieren, dass die grundlegende Kommunikation über Gap Junctions, die für die Homöostase einer Zelle notwendig ist (Willecke *et al.*, 2002) gewährleistet ist.

Die Untersuchung des Genexpressionsmusters der $Cx31^{+/-}$ TS-Zelllinien in der Differenzierung bestätigte, dass kein Unterschied zum Wildtyp vorhanden war. Die $Cx31^{-/-}$ TS-Zellen hingegen zeigten einen deutlich veränderten Phänotyp. Anhand der untersuchten Markergene und der Connexine konnte gezeigt werden, dass die TS-Zellen ein um etwa zwei Tage verschobenes Expressionsmuster in Richtung einer beschleunigten Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie aufwiesen. Dabei kann aufgrund der Veränderung in der $Mash2$ -Expression in $Cx31^{-/-}$ TS-Zellen (Tag 1) im Vergleich zu $Cx31^{+/-}$ TS-Zellen (Tag 3) von einer Fehlregulation zu Beginn der Differenzierung ausgegangen werden. Die nachfolgende Verschiebungen in der Expression von $Cx26$, $Tpbpa$ und $PI-1$ sind Folge dieser frühen Fehlregulation.

Der beschleunigte Differenzierungsprozess war auch morphologisch anhand einer schnelleren Bildung von Riesenzellen in der *Cx31*^{-/-} Kultur sichtbar. Darüber hinaus verloren die *Cx31*^{-/-} TS-Zellen mit Einsetzen der Differenzierung sehr schnell ihre proliferative Aktivität. Diese Befunde erklären auch das Verhalten von *Cx31*-defizienten TS-Zellen nach Injektion in das Nacktmausmodell. Die *Cx31*^{-/-} TS-Zellen nehmen aufgrund der schnelleren Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie früher ein migrierendes Verhalten ein, was zur Invasion und Eröffnung von Blutgefäßen führt. Die reduzierte Tumorgroße im Vergleich zu den *Cx31*^{+/-} TS-Zellen erklärt sich durch das reduzierte Proliferationsverhalten der *Cx31*^{-/-} TS-Zellen.

Die auf morphologischer Basis an der *Cx31*-Knockout Plazenta erstellte Hypothese, dass es durch den Verlust von *Cx31* zu einer Verschiebung im Verhältnis Proliferation und Differenzierung zu Riesenzellen zugunsten der Differenzierung kommt (Plum *et al.*, 2001), werden durch das TS-Zell-Modell bestätigt.

Von der Ratten Chorionkarzinomzelllinie Rcho-1 ist bekannt, dass Retinsäure die Differenzierung zu Riesenzellen fördert, die mit einer vollständigen und irreversiblen Repression der *Cx31*-Expression korreliert (Grümmer *et al.*, 1996). Yan *et al.* (2001) konnten zeigen, dass Retinsäure ebenfalls die Differenzierung von TS-Zellen zu Trophoblast-Riesenzellen fördert, während gleichzeitig die Bildung von Spongiotrophoblast inhibiert wird. Retinsäure ändert demnach also die Differenzierungsrichtung von TS-Zellen. Bei den *Cx31*^{-/-} TS-Zellen konnten keine Hinweise auf eine veränderte Bildung von *Tpbpa* oder *Cx26* gefunden werden. Der Verlust des *Cx31*-Kanals ändert folglich nicht die Differenzierungspotential der TS-Zellen, sondern die Geschwindigkeit des Differenzierungsprozesses.

4.8 Gene-Array-Analysen zu Identifizierung von Genen die in ihrer Expression durch den Verlust von *Cx31* verändert sind

Ein Gene Array bietet die Möglichkeit für mehrere tausend Gene simultan eine Expressionsanalyse durchzuführen. Die durch diese Methode gewonnenen Daten können mit denen anderer Arrays verglichen werden und erlauben so Aussagen über den Unterschied in der Expression von Gene zwischen verschiedenen Proben. Gene-Array-Analysen wurden in dieser Arbeit eingesetzt, um Gene zu identifizieren, deren Expression durch den Verlust von *Cx31* in TS-Zellen verändert sind. Dadurch sollten Hinweise erhalten werden, welche Stellung *Cx31* innerhalb der Signalkaskaden des

Trophoblasten einnimmt und welche Fehlregulation zum Phänotyp der *Cx31*-Knockout Maus führt.

Die generierten *Cx31*-defizienten TS-Zelllinien wurden zunächst im undifferenzierten Zustand miteinander verglichen, um zu ermitteln, ob bereits im proliferativen Stammzellzustand eine charakteristische Veränderung vorliegt. Ein weiterer Vergleich wurde an Tag 4 der Differenzierung durchgeführt. Dies ist in Wildtyp TS-Zellen der Zeitpunkt, an dem die Expression von *Mash2* reprimiert und die von *Cx26* induziert wird, also das Ende des Zeitfensters, in dem die durch den Verlust von *Cx31* bedingte Fehlregulation stattfinden muss.

Bei der Auswertung der Gene-Array-Daten wurden alle Gene einbezogen, die beim Vergleich der *Cx31*^{-/-} mit den *Cx31*^{+/-} TS-Zellen eine mindestens 2,5fache Erhöhung bzw. Erniedrigung der Expression aufwiesen. Um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, die aufgrund klonaler Unterschiede zwischen den TS-Zelllinien oder durch experimentelle Faktoren auftreten können, wurden des weiteren nur die Gene einbezogen, die in mindestens der Hälfte der Einzelvergleiche eine Regulation zeigten.

Die Clusteranalyse der *Cx31*-defizienten TS-Zelllinien ergab, dass im undifferenzierten Zustand keine hinreichenden Unterschiede zwischen *Cx31*^{+/-} und *Cx31*^{-/-} TS-Zellen vorliegen, die zur Bildung von distinkten Gruppen führen könnten. Erst in der Differenzierung weisen die *Cx31*^{-/-} TS-Zelllinien ein von der Kontrollgruppe (*Cx31*^{+/-} TS-Zelllinien) verändertes Expressionsmuster auf. Dieses wird auch dadurch verdeutlicht, dass im undifferenzierten Zustand insgesamt 43 Gene entsprechend den Filterkriterien reguliert waren, während an Tag 4 der Differenzierung 84 Gene eine unterschiedliche Expression zwischen *Cx31*^{-/-} und *Cx31*^{+/-} TS-Zellen aufwiesen.

Die regulierten Gene, die diese Bedingungen erfüllten wurden nach Kargul *et al.* (2001) anhand ihrer Funktion in verschiedene Klassen eingeteilt. Keines der Gene gehörte den Klassen Apoptose, Hitzeschock/Stress bzw. DNA-Synthese an und nur ein Zellzyklus-regulierendes Gen zeigte im undifferenzierten Zustand eine Erhöhung der Expression. Dieses war auffallend, da der Verlust von *Cx31* zu einer Verschiebung in Richtung Differenzierung und einer gleichzeitigen Reduktion der Proliferation von TS-Zellen führte.

Vier der Gene, die im undifferenzierten Zustand reguliert waren, sind an der Differenzierung von Riesenzellen beteiligt. *PI-1* und Proliferin (Lee *et al.*, 1988) sind definierte Riesenzellmarker. Der Transkriptionsfaktor c-fos, Bestandteil des AP-1

Komplexes, ist an der Regulation des *Pl-1* Gens beteiligt (Peters *et al.*, 2000). Des Weiteren zeigte $p57^{Kip2}$ (Hattori *et al.*, 2000) eine erhöhte Expression in *Cx31*^{-/-} TS-Zellen. Die Erhöhung von Riesenzellmarkern lässt darauf schließen, dass der Verlust von *Cx31* schon im undifferenzierten Zustand eine Verschiebung in Richtung Riesenzellen hervorruft. Ob diese auf einer größeren Rate an spontaner Differenzierung beruht oder Folge eines veränderten Differenzierungsprozesses ist, kann aufgrund dieser Daten nicht beantwortet werden.

4.9 GLUT3 ist ein Marker für undifferenzierte TS-Zellen

Der Glukosetransporter 3 (*Glut3*) zeigte in undifferenzierten *Cx31*^{-/-} TS-Zellen in den meisten Einzelvergleichen eine stark reduzierte Expression gegenüber der *Cx31*^{+/-} Kontrolle. An Tag 4 der Differenzierung bestand im Gene-Array ein geringerer Unterschied. Auf Transkript- sowie auf Proteinebene konnte gezeigt werden, dass *Glut3*/GLUT3 während der Differenzierung von TS-Zellen natürlich herunterreguliert wird. Die Expression von *Glut1* hingegen bleibt unbeeinflusst. Die *Cx31*-Knockout TS-Zellen zeigten eine zeitlich vorverlegte Repression der *Glut3*/GLUT3-Expression. Bereits im undifferenzierten Zustand war in *Cx31*^{-/-} TS-Zelllinien die Expression des Glukosetransporters 3 auf RNA und Proteinebene nahezu vollständig reprimiert.

In der humanen Plazenta wird die Expression von GLUT3 mit der Erhaltung von metabolischen Bedürfnissen der proliferierenden Trophoblastzellen in Zusammenhang gebracht (Clarson *et al.*, 1997). In der Differenzierung wurde auch dort auch eine Abnahme von *Glut3*-Transkripten beobachtet, während *Glut1* ebenfalls unverändert blieb (Clarson *et al.*, 1997). Bei der Maus ist die Expression von GLUT3 in den apikalen Membranen des Trophektoderms essentiell für die Formierung der Blastozyste. Dieser Prozess ist unabhängig von Glukose. Daher wird vermutet, dass GLUT3 eine Transporter-unabhängige Funktion in der Blastozystenentwicklung besitzt, die von der Bildung des Proteins abhängt (Pantaleon *et al.*, 1997). In der Plazenta der Maus ist GLUT3 im Synzytiotrophoblasten als auch in Spongiotrophoblasten exprimiert (Hahn *et al.*, 1999). Einen Unterschied gibt es in der Expression von *Glut1* und *Glut3* in frühen Postimplantationsembryonen der Maus. Während beide Transporter im Amnion und Chorion exprimiert werden, ist *Glut3* im Gegensatz zu *Glut1* durch *in situ* Hybridisierung nicht im Ektoplazentarkonus detektiert worden (Smith und Gridley, 1992). Dieses ist übereinstimmend mit den Befunden dieser Arbeit, dass GLUT3 in allen undifferenzierten *Cx31*^{+/-} Stammzellen,

die dem extraembryonalen Ektoderm entsprechen, exprimiert wird, während differenzierende TS-Zellen eine Repression von GLUT3 aufweisen. Interessant ist, dass die Repression von GLUT3 in $Cx31^{+/-}$ TS-Zellen an Tag 3 der Differenzierung erfolgt. Dies ist der Tag, an dem der Ektoplazentarkonus-Marker *Mash2* seine maximale Expression aufweist. GLUT3 scheint daher ein sehr sensitiver Marker für undifferenzierte TS-Zellen zu sein. Die veränderte Expression von GLUT3 in $Cx31^{-/-}$ TS-Zellen lässt darauf schließen, dass diese bereits in die Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie ein Stadium zwischen GLUT3 exprimierender Stammzelle und *Mash2* exprimierendem Ektoplazentarkonus eingenommen haben.

Weitere Arbeiten über das Expressionsmuster von GLUT3 zwischen den Tagen 3,5 und 10,5 *pc* existieren nicht für Maus oder Ratte. Aufgrund der Literaturdaten könnte für GLUT3 eine Rolle in der Erhaltung des Stammzellpotentials vorliegen. Die systematische Analyse von *Cx31*-Knockout Embryonen kann Aussagen darüber liefern, ob *in vivo* eine Fehlregulation des GLUT3-Transporters vorliegt, die die Fehlregulation an Tag 9,5 *pc* in der Trophoblastzelllinie, die zur placentaren Fehlentwicklung führt, erklären kann.

4.10 Gene, die durch den Verlust von *Cx31* in TS-Zellen fehlreguliert sind

Die Gene-Array-Analysen wurden durchgeführt, um Gene zu identifizieren, die durch den Verlust von *Cx31* in ihrer Expression in TS-Zellen verändert sind. Das generelle Problem bei der Analyse der Daten bestand darin, dass die Änderung im Differenzierungsverhalten der $Cx31^{-/-}$ TS-Zelllinien viele Gene als reguliert auswies, die nur als Folge der schnelleren Differenzierung zeitlich früher hoch bzw. herunterreguliert wurden. Die Trennung dieser Gene von denjenigen, die durch *Cx31* spezifisch verändert sind und damit eine Ursache für das veränderte Differenzierungsverhalten darstellen könnte ist schwierig und kann nur durch Überprüfung der Expression *in vivo* an der *Cx31*-Knockout Maus geschehen.

Unter den veränderten Markergenen für die Riesenzellbildung ist $p57^{Kip2}$ das einzige, dem eine Rolle in der Fehlregulation zukommen könnte, die durch den Verlust des *Cx31*-Kanals hervorgerufen wird. $p57^{Kip2}$ ist ein Zyklin-abhängiger Kinaseinhibitor, dessen periodische Expression für die Endoreduplikation in der Riesenzell-differenzierung notwendig ist. Die Induktion von $p57^{Kip2}$ am Ende der S-Phase des Zellzyklus verhindert das die Zelle in die Mitose übergeht. Die anschließende

Degradation des Proteins ist notwendig für den Übergang in die nächste S-Phase (Hattori *et al.*, 2000).

Die $p57^{Kip2}$ Knockout Maus zeigt Plazentomegalie, die durch eine Verdopplung der Größe von Labyrinth und Spongiotrophoblast gekennzeichnet ist (Takahashi *et al.*, 2000). $p57^{Kip2}$ ist also ein positiver Regulator der Riesenzellbildung. Die Signalwege von $p57^{Kip2}$ in der Trophoblastzelllinie sind noch unbekannt und es geht aus der Literatur nicht hervor, ob $p57^{Kip2}$ die Bildung von Riesenzellen initiieren oder regulatorisch steuern könnte (Hattori *et al.*, 2000). Eine durch die Inaktivierung des *Cx31*-Gens hervorgerufene Fehlregulation könnte die erhöhte Bereitschaft der TS-Zellen in Riesenzellen zu differenzieren verursachen. Die Überexpression von $p57^{Kip2}$ in TS-Zellen bzw. die spezifische Repression dieses Zellzyklusproteins könnten darüber interessante Auskünfte liefern.

Bei den Gene-Array-Ergebnissen fällt des weiteren auf, dass nur ein Gen in allen Einzelvergleichen eine signifikante Regulation zeigt. Dabei handelt es sich um *H19*, das in undifferenzierten $Cx31^{-/-}$ TS-Zellen eine 49fach erniedrigte Expression gegenüber den $Cx31^{+/-}$ TS-Zellen aufweist. An Tag 4 der Differenzierung zeigte *H19* nur noch in 6 Einzelvergleichen eine Regulation, da die Expression (analog zu GLUT3) in der Differenzierung herunterreguliert wurde. Das Gen *H19* bildet eine nicht translatierte RNA, die als Funktionsträger vermutet wird (Brannan *et al.*, 1990). *H19* ist durch Imprinting reguliert, d.h. die Gene des Allels werden in Abhängigkeit von der parentalen Herkunft exprimiert. Dabei zeigt *H19* eine maternale Expression (Bartolomei *et al.*, 1991). Der Genlocus liegt auf dem distalen Chromosom 7 in Nachbarschaft zu den ebenfalls durch Imprinting regulierten Genen *Igf2*, *Ins-2* und *Mash2* (Übersicht: Leighton *et al.*, 1996). *Mash2* wird wie *H19* maternal exprimiert, während *Igf2* und *Ins-2* paternal exprimiert werden. Die Inaktivierung von *H19* führt zu einem Verlust des Imprintings des paternalen *Igf2*-Gens und damit zu einer Überexpression von IGF-II. *H19* besitzt damit eine regulatorische Funktion in der Regulation des Imprinting-Status von *Igf2* und *Ins-2* und damit in der Expression dieser Gene (Leighton *et al.*, 1995).

In der Blastozyste sind beide Kopien des *H19*-Gens untermethyliert, erst nach der Implantation kommt es zur vollen Methylierung des paternalen Kopie, die in der Trophoblast-Zelllinie länger dauert als im Embryo (Sasaki *et al.*, 1995; Svensson *et al.*, 1998). Eine Reduktion der *H19*-Transkripte in $Cx31^{-/-}$ TS-Zellen könnte daher mit

einer abweichenden Methylierungsstatus einhergehen. Angemerkt sei, dass in *Cx31*^{-/-} TS-Zellen kein Unterschied in der Expression des *Igf2* Gens detektiert werden konnte. Welchen weiteren Einfluss *H19* auf die Trophoblastdifferenzierung haben könnte ist unbekannt. Neben *H19* sind durch den Verlust von *Cx31* auch andere durch Imprinting regulierte Gene in ihrer Expression verändert: *p57*^{Kip2} und der Transkriptionsfaktor *Zac1* (Smith *et al.*, 2002). Das Expressionsprofil von *Mash2*, ebenfalls durch Imprinting reguliert (Guillemot *et al.*, 1995) ist in *Cx31*^{-/-} TS-Zellen zeitlich verändert. Das Imprinting ist ein wichtiger Faktor für die Trophoblastdifferenzierung ist wird dadurch verdeutlicht, dass die meisten durch Imprinting regulierten Gene in der Plazenta exprimiert sind (Miozzo *et al.*, 2002). Der mögliche regulatorische Einfluss von *Cx31* auf die durch Imprinting regulierte Expression plazentarer Gene ist ein interessanter und neuer Ansatzpunkt in der Funktionsanalyse dieses Proteins.

Viele Knockout Mäuse von plazentar exprimierten Genen zeigen eine Fehldifferenzierung entlang der Trophoblastzelllinie. Die *Mash2*-Knockout Maus weist einen fehlenden Spongiotrophoblasten und ein reduziertes Labyrinth auf (Guillemot *et al.*, 1994). Die Analyse von Chimären ergab, dass *Mash2* nicht notwendig für die Entwicklung des labyrinthinen Trophoblasten oder der Riesenzellen ist, sondern zur Erhaltung des proliferativen, diploiden Trophoblasten des Ektoplazentarkonus und des Spongiotrophoblasts verantwortlich ist (Tanaka *et al.*, 1997). Eine Zusammenspiel von *Cx31* und *Mash2* innerhalb der gleichen Signalkaskade wurde diskutiert (Plum *et al.*, 2001).

Die Regulation der *Cx31*-Expression durch *Mash2* scheint unwahrscheinlich, da im undifferenzierten TS-Zellen, *Mash2* nicht exprimiert ist und die Induktion von *Mash2* keinen Einfluss auf die Expression des *Cx31*-Gens zu haben scheint. Möglich ist, dass *Cx31* über unbekannte Signalwege die Expression von *Mash2* reguliert, was mit der verfrühten Induktion in der Differenzierung von TS-Zellen konform wäre.

Während *Mash2* für die Integrität des Ektoplazentarkonus und des Spongiotrophoblasten verantwortlich ist, indem es die Wirkung des Transkriptionsfaktors *Hand1* unterdrückt, der die Riesenzellbildung fördert (Scott *et al.*, 2000), wurde *Cx31* auch für den Erhalt der Stammzellen in der Chorionplatte, die maßgeblich an der Fehlbildung des Labyrinths beteiligt ist, verantwortlich gemacht (Plum *et al.*, 2001). Für *Cx31* kann daher eine grundlegendere Aufgabe bei der

Erhaltung des Stammzellpotentials in der frühen Trophoblastzelllinie und im Spongiotrophoblasten angenommen werden.

Es stellt sich die Frage, ob der Verlust eines plazentar exprimierten Gens in TS-Zellen grundsätzlich zu einer erhöhten Differenzierung zu Riesenzellen führt. Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen der Connexin defizienten TS-Zelllinien zeigen, dass der Verlust jedes dieser Connexine in TS-Zellen zu spezifische Phänotypen führen muss. Nur der Verlust des Cx31-Kanals führt zu einer zeitlich schneller ablaufenden Differenzierung, die mit dem Verlust der proliferativen Aktivität verbunden ist. Der Verlust von Cx26 und Cx43 beeinflusst nach ersten Ergebnissen nicht die Geschwindigkeit des Differenzierungsprozesses und auch nicht das, nur an Cx43^{-/-} TS-Zellen untersuchte, Proliferationsverhalten.

Interessante Ergebnisse lieferten die Arbeiten an SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3), einem Repressor der durch Bindung an Zytokin-Rezeptoren deren Signaltransduktion verhindert (Krebs *et al.*, 2000). Die Socs3-Knockout Maus weist einen reduzierten Spongiotrophoblasten, ein deformiertes Labyrinth und eine erhöhte Anzahl von Riesenzellen auf, was demonstriert, dass SOCS3 die Riesenzellbildung inhibiert (Roberts *et al.*, 2001). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Socs3-defiziente TS-Zellen ebenfalls schneller zu Riesenzellen differenzieren (Takahashi *et al.*, 2003). Die zusätzliche Inaktivierung des LIF-Rezeptors, der die Riesenzellbildung fördert, rettet aber den letalen Socs3-Phänotyp der Maus (Takahashi *et al.*, 2003). Dieses zeigt, dass der LIF-Rezeptor und SOCS3 in eine Signalkaskade eingebunden sein müssen und antagonistische Funktionen besitzen. Im Trophoblasten bzw. in TS-Zellen besteht folglich ein Gleichgewicht zwischen Genen, die auf der einen Seite die Differenzierung fördern und Genen, die auf der anderen Seite diesem Prozess entgegenwirken.

Welche Rolle spielt Cx31 in diesem System? Über spezifische Funktionen von Cx31 in anderen murinen Geweben ist bisher wenig bekannt. So wird Cx31 im embryonalen Rautenhirn an den Tagen 8 bis 11 *pc* in den Rhombomeren r3 und r5 exprimiert, wobei die Expression durch den Transkriptionsfaktor *Krox2* induziert wird (Jungbluth *et al.*, 2002). Für Cx31 wird auch im embryonalen Nervensystem eine Subkompartimentierung von Zellen diskutiert (Jungbluth *et al.*, 2002). Später in der Entwicklung wird Cx31 in der Extremitätenknospe (10,5 *dpc*), im dorsalen

Wurzelganglien (11,5 *dpc*) und in der embryonalen Haut (11,5 *dpc*) exprimiert. In der adulten Maus wird Cx31 in der Granulosaschicht der Haut und im Hoden exprimiert. Die Cx31-Knockout Maus zeigt aber keine Defekte in diesen Geweben (Plum *et al.*, 2001).

Beim Menschen sind Mutationen im Cx31 Protein Ursache für die Hautkrankheit Erythrokeratoderma variabilis. Bei Nagern ist diese Hautkrankheit hingegen unbekannt. Wahrscheinlich sind die artspezifischen Unterschiede im Expressionsmuster der verschiedenen Connexine in der Haut dafür verantwortlich, dass Mutationen im murinen Cx31-Gen keinen pathogenen Einfluss besitzen (Richard *et al.*, 1998). Im Gegensatz zur Maus führen Mutationen im Cx31-Gen beim Menschen nicht syndromalem Hörverlust (Liu *et al.*, 2000).

Cx31 könnte an der Regulation des Gleichgewichts von Genen beteiligt sein, die die Differenzierung zu Riesenzellen fördern bzw. inhibieren. Dementsprechend würde der Verlust von Cx31 zu einer Aktivierung von Differenzierungsgenen dieser Gene führen und damit die Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie fördern. Diese Funktion von Cx31 manifestiert sich aber erst, wenn der Differenzierungsprozess bereits begonnen hat. Die Erhaltung des Stammzellpotentials in der frühen Trophoblastzelllinie ist abhängig von FGF4 und einem noch nicht identifizierten, löslichen Faktor der von Fibroblasten gebildet wird (Tanaka *et al.*, 1998). Möglicherweise ist Cx31 den FGF4-vermittelten Signalwegen assoziiert, indem es Signale stromabwärts des FGF2-Rezeptors innerhalb der frühen Trophoblastlinie synergistisch verstärkt. So könnte die Kommunikation über Cx31-spezifische Gap Junctions für die Synchronisation der Zellen in der frühen Trophoblastzelllinie verantwortlich sein, die der Koordinierung dieser Signalwege dient. Das Fehlen von Cx31-Kanälen würde demnach zu einem schnellen Aktivitätsverlust von FGF4-vermittelten Signalwegen und damit zu einer beschleunigten Differenzierung der Zellen führen.

Neben den spezifischen Eigenschaften des Cx31-Kanals könnte auch das Protein eine Funktion in der Signaltransduktion besitzen. So wurde für Cx43 gezeigt, dass der freie zytoplasmatische C-Terminus eine Rolle bei der Signaltransduktion spielt. Ähnlich Regulationen werden auch für andere Connexine angenommen (Willecke *et al.*, 2002). Welche molekulare Funktion Cx31 bei der Erhaltung des Stammzellpotentials in der Trophoblastzelllinie einnimmt, bleibt zu erforschen. Die in dieser Arbeit etablierten TS-Zelllinien stellen dafür das geeignete *in vitro* Modell dar.

5 Zusammenfassung

Während der Plazentaentwicklung der Maus ist das Expressionsmuster der Connexine räumlich und zeitlich reguliert. Cx31 ist das spezifische Connexin für den diploiden, proliferierenden Trophoblasten der frühen plazentaren Anlage. Die drei funktionellen Schichten der Plazenta sind ebenfalls durch eine spezifische Connexin-Expression gekennzeichnet. Die zwei synzytialen Trophoblastschichten des Labyrinths sind durch Cx26 verbunden. Der Spongiotrophoblast exprimiert Cx31 und mit zunehmender Differenzierung auch Cx43, während Trophoblast-Riesenzellen durch die ausschließliche Expression von Cx43 charakterisiert sind. Die Cx31-Knockout Maus zeigt eine transiente, plazentare Dymorphogenese, die das Absterben von 60% der Embryonen zwischen den Tagen 10,5 und 13,5 *pc* bedingt. Trophoblast-Stammzellen stellen das derzeit am besten geeignete Modell zur zell- und molekularbiologischen Analyse letaler, plazentarer Phänotypen dar. TS-Zelllinien können aus der frühen plazentaren Anlage von Knockout Mäusen generiert werden und die veränderte Physiologie dieser Zelllinien lässt Rückschlüsse auf die Funktion des mutierten Gens in der Trophoblastdifferenzierung zu.

Durch Kreuzung wurde in dieser Arbeit die Cx31/Cx43-Doppelknockout Maus generiert. Die Analyse ergab, dass im Zeitraum 11,5 bis 15,5 *dpc* vitale Cx31^{-/-}/Cx43^{-/-} Embryonen vorhanden waren. Die Plazenta dieser Embryonen entsprach histologisch einer Cx31-Knockout Plazenta am selben Tag. Der zusätzliche Verlust des Cx43-Gens hat somit keinen weiteren Effekt auf die Entwicklung der Cx31^{-/-} Plazenta. Daher kann die Induktion von Cx43 im Spongiotrophoblasten der Cx31-Knockout Plazenta nicht für deren Regeneration und damit für das Überleben von 40% der Embryonen verantwortlich sein. Diesen Daten entsprechend zeigt die Cx43-Knockout Plazenta an den Tagen 13,5 bis 17,5 *dpc* keine morphologischen Unterschiede zur Wildtyp Kontrolle. Cx43 ist daher für die Entwicklung der Plazenta nicht essentiell.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Trophoblast-Stammzellen ein geeignetes Modell zur Analyse der Funktion von Connexinen in der Trophoblast-Differenzierung der Maus sind. TS-Zellen weisen das Connexin-Expressionsmuster des extraembryonalen Ektoderms/Chorionektoderms auf und sind durch die spezifische Bildung des Cx31-Kanals gekennzeichnet. Die Expression von Cx31.1 konnte als weitere Isoform an TS-Zellen sowie in der Plazenta nachgewiesen werden.

Möglicherweise kann der Cx31.1-Kanal den Verlust des Cx31-Kanals in einer Knockout Plazenta partiell kompensieren.

Während der Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie weisen TS-Zellen das koordinierte Connexin-Expressionsmuster der Plazenta auf. Die Bildung von Riesenzellen wird durch eine Repression der Cx31 und Cx31.1 sowie einer Induktion der Cx43-Expression markiert. Die Induktion der Cx26-Expression zeigt, dass TS-Zellen das Potential besitzen in Synzytiotrophoblast zu differenzieren.

In Nachtmäuse injizierte TS-Zellen führen zur Bildung transienter, hämorrhagischer Tumore. Entsprechend der Modulation maternalen Uterus-Arterien durch den Trophoblasten, werden die Blutgefäße der Wirtshaut durch die TS-Zellen arrodirt, was zum Blutfluss in das umliegende Gewebe führt. TS-Zellen besitzen also den invasiven Charakter des Trophoblasten *in vivo*.

Cx26-, Cx31- und Cx43-defiziente TS-Zelllinien konnten aus den Blastozysten der entsprechenden Knockout Mäuse generiert werden. Die Analyse des Differenzierungsverhaltens der Knockout TS-Zelllinien anhand ausgewählter Markergene ergab, dass spezifisch der Verlust der Cx31-Kanals zu einer um 2 Tage beschleunigten Differenzierung entlang der Trophoblastzelllinie führt. Diese Fehlregulation ist mit einem Verlust der proliferativen Aktivität der Cx31^{-/-} TS-Zelllinien in der Differenzierung verbunden. Die an der Cx31-Knockout Plazenta gemachten morphologischen Befunde konnten an TS-Zellen auf molekularer und physiologischer Ebene bestätigt werden.

Erste Untersuchungen der Cx26-Knockout TS-Zelllinien ergab, dass der Verlust dieses Connexins nicht zu einer Veränderung im Differenzierungsverhalten führt. Auch Cx43-defiziente TS-Zelllinien weisen das Proliferations- und Differenzierungsverhalten des Wildtyps auf.

Die vergleichenden Gene-Array-Analysen Cx31-defizienter TS-Zelllinien bestätigten, dass Cx31^{-/-} TS-Zelllinien eine endogene Bereitschaft zeigen, in die Differenzierung einzutreten. Die Repression des Glukosetransporters 3 in undifferenzierten Cx31^{-/-} TS-Zellen impliziert, dass TS-Zellen durch den Verlust von Cx31 nicht mehr das Potential des extraembryonalen Ektoderms/Chorionektoderms besitzen, sondern einen Schritte weiter in der Differenzierung stehen.

Cx31 reguliert folglich die Erhaltung des Stammzellpotentials in der frühen plazentaren Anlage.

6 Literatur

Achen MG, Gad JM, Stacker SA, Wilks AF (1997) Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor are co-expressed during early embryonic development. *Growth Factors*. 15(1):69-80.

Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC (2002) Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev. Biol.* 250(2):358-73.

Al-Ubaidi MR, White TW, Ripps H, Poras I, Avner P, Gomes D, Bruzzone R (2000) Functional properties, developmental regulation, and chromosomal localization of murine connexin36, a gap-junctional protein expressed preferentially in retina and brain. *J. Neurosci. Res.* 59(6):813-26.

Anson-Cartwright L, Dawson K, Holmyard D, Fisher SJ, Lazzarini RA, Cross JC (2000) The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat. Genet.* 25(3):311-4.

Barlow PW, Sherman MI (1972) The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: studies on polyploidy. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27(2):447-65.

Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM (1991) Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* 351:153-5.

Bennett MV, Zheng X, Sogin ML (1994) The connexins and their family tree. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 49:223-33.

Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM (1990) The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol. Cell Biol.* 10(1):28-36.

Butterweck A, Elfgang C, Willecke K, Traub O (1994) Differential expression of the gap junction proteins connexin45, -43, -40, -31, and -26 in mouse skin. *Eur. J. Cell. Biol.* 65(1):152-63.

Chai N, Patel Y, Jacobson K, McMahon J, McMahon A, Rappolee DA (1998) FGF is an essential regulator of the fifth cell division in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 198(1):105-15.

Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE, Kontgen F, Beck F (1997) Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 386:84-7.

Clarson LH, Glazier JD, Sides MK, Sibley CP (1997) Expression of the facilitated glucose transporters (GLUT1 and GLUT3) by a choriocarcinoma cell line (JAR) and cytotrophoblast cells in culture. *Placenta* 18(4):333-9.

Cohen-Salmon M, Ott T, Michel V, Hardelin JP, Perfettini I, Eybalin M, Wu T, Marcus DC, Wangemann P, Willecke K, Petit C (2002) Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr. Biol.* 12(13):1106-11.

- Colosi P, Talamantes F, Linzer DI** (1987) Molecular cloning and expression of mouse placental lactogen I complementary deoxyribonucleic acid. *Mol. Endocrinol.* 1(11):767-76.
- Copp AJ** (1978) Interaction between inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. I. A study of cellular proliferation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 48:109-25.
- Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, Adamson SL** (2002) Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187(1-2):207-12.
- Cross JC** (2000) Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 11(2):105-13.
- Cross JC, Baczyk D, Dobric N, Hemberger M, Hughes M, Simmons DG, Yamamoto H, Kingdom JC** (2003) Genes, development and evolution of the placenta. *Placenta* 24(2-3):123-30.
- Cross JC, Werb Z, Fisher SJ** (1994) Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science.* 266:1508-18.
- Dahl E, Winterhager E, Reuss B, Traub O, Butterweck A, Willecke K** (1996) Expression of the gap junction proteins connexin31 and connexin43 correlates with communication compartments in extraembryonic tissues and in the gastrulating mouse embryo, respectively. *J. Cell. Sci.* 109:191-7.
- Davies TC, Barr KJ, Jones DH, Zhu D, Kidder GM** (1995) Multiple members of the connexin gene family participate in preimplantation development of the mouse. *Dev. Genet.* 18(3):234-43.
- Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hulser DF, Willecke K** (1995) Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell. Biol.* 129(3):805-17.
- Evans WH, Martin PE** (2002) Lighting up gap junction channels in a flash. *Bioessays* 24(10):876-80.
- Feldman B, Poueymirou W, Papaioannou VE, DeChiara TM, Goldfarb M** (1995) Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development *Science* 267:246-9.
- Folkman J, Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth** (1976) *Int Rev. Exp. Pathol.* 16:207-48.
- Gabriel HD, Jung D, Butzler C, Temme A, Traub O, Winterhager E, Willecke K** (1998) Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J. Cell. Biol.* 140(6):1453-61.
- Gardner RL** (1996) Clonal analysis of growth of the polar trophectoderm in the mouse. *Hum. Reprod.* 11(9):1979-84.

- Gardner RL, Johnson MH** (1972) An investigation of inner cell mass and trophoblast tissues following their isolation from the mouse blastocyst. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 28(2):279-312.
- Gellhaus A** (2003) Einfluss verschiedener Gap Junction-Kanäle auf das Proliferations-, Invasions- und Differenzierungsverhalten der humanen Chorionkarzinomzelllinie Jeg3. *Dissertation. Universität Duisburg-Essen.*
- Giepmans BN, Verlaan I, Hengeveld T, Janssen H, Calafat J, Falk MM, Moolenaar WH.** (2001a) Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr. Biol.* 11(17):1364-8.
- Giepmans BN, Hengeveld T, Postma FR, Moolenaar WH** (2001b) Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *J. Biol. Chem.* 276(11):8544-9.
- Gong X, Agopian K, Kumar NM, Gilula NB** (1999) Genetic factors influence cataract formation in alpha 3 connexin knockout mice. *Dev. Genet.* 24(1-2):27-32.
- Gramsch BD** (2000) Auswirkungen einer veränderten Connexin-Expression bei Cx43-Knock-out-Mäusen und Zelllinien auf den Phänotyp von Knochenzellen *in vitro*: Molekularbiologische, immunzytochemische und zellbiologische Charakterisierung. *Dissertation. Universität-Gesamthochschule Essen.*
- Grummer R, Donner A, Winterhager E** (1999) Characteristic growth of human choriocarcinoma xenografts in nude mice. *Placenta* 20(7):547-53.
- Grummer R, Hellmann P, Traub O, Soares MJ, el-Sabban ME, Winterhager E** (1996) Regulation of connexin31 gene expression upon retinoic acid treatment in rat choriocarcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* 227(1):23-32.
- Guillemot F, Caspary T, Tilghman SM, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Anderson DJ, Joyner AL, Rossant J, Nagy A** (1995) Genomic imprinting of Mash2, a mouse gene required for trophoblast development. *Nat. Genet.* 9(3):235-42.
- Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, Rossant J, Joyner AL** (1994) Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature* 371(6495):333-6.
- Guldenagel M, Sohl G, Plum A, Traub O, Teubner B, Weiler R, Willecke K** (2000) Expression patterns of connexin genes in mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 425(2):193-201.
- Haefliger JA, Bruzzone R, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Paul DL** (1992) Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. Molecular cloning, expression, and chromosome mapping. *J. Biol. Chem.* 267(3):2057-64.
- Hahn T, Barth S, Graf R, Engelmann M, Beslagic D, Reul JM, Holsboer F, Dohr G, Desoye G** (1999) Placental glucose transporter expression is regulated by glucocorticoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84(4):1445-52.

- Hattori N, Davies TC, Anson-Cartwright L, Cross JC** (2000) Periodic expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p57(Kip2) in trophoblast giant cells defines a G2-like gap phase of the endocycle. *Mol. Biol. Cell.* 11(3):1037-45.
- He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR, Charnock-Jones DS** (1999) Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol. Endocrinol.* 13(4):537-45.
- Hemberger M, Cross JC** (2001) Genes governing placental development. *Trends Endocrinol. Metab.* 12(4):162-8.
- Hennemann H, Dahl E, White JB, Schwarz HJ, Lalley PA, Chang S, Nicholson BJ, Willecke K** (1992) Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin. *J. Biol. Chem.* 267(24):17225-33.
- Houghton FD, Barr KJ, Walter G, Gabriel HD, Grummer R, Traub O, Leese HJ, Winterhager E, Kidder GM** (2002) Functional significance of gap junctional coupling in preimplantation development. *Biol. Reprod.* 66(5):1403-12.
- Jackson D, Volpert OV, Bouck N, Linzer DI** (1994) Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein. *Science* 266:1581-4.
- Jungbluth S, Willecke K, Champagnat J** (2002) Segment-specific expression of connexin31 in the embryonic hindbrain is regulated by Krox20. *Dev. Dyn.* 223(4):544-51.
- Kargul GJ, Dudekula DB, Qian Y, Lim MK, Jaradat SA, Tanaka TS, Carter MG, Ko MS** (2001) Verification and initial annotation of the NIA mouse 15K cDNA clone set. *Nat. Genet.* 28(1):17-8.
- Kelley PM, Abe S, Askew JW, Smith SD, Usami S, Kimberling WJ** (1999) Human connexin 30 (GJB6), a candidate gene for nonsyndromic hearing loss: molecular cloning, tissue-specific expression, and assignment to chromosome 13q12. *Genomics* 62(2):172-6.
- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM.** (1997) Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387:80-3.
- Kemler R, Brulet P, Schnebelen MT, Gaillard J, Jacob F** (1981) Reactivity of monoclonal antibodies against intermediate filament proteins during embryonic development. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 64:45-60.
- Kraut N, Snider L, Chen CM, Tapscott SJ, Groudine M** (1998) Requirement of the mouse *l-mfa* gene for placental development and skeletal patterning. *EMBO J.* 17(21):6276-88.
- Krebs DL, Hilton DJ.** (2000) SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J. Cell Sci.* 113:2813-9.

Kruger O, Plum A, Kim JS, Winterhager E, Maxeiner S, Hallas G, Kirchhoff S, Traub O, Lamers WH, Willecke K (2000) Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* 127(19):4179-93.

Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84(3):381-8.

Kwan KM (2002) Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis* 32(2):49-62.

Lautermann J, ten Cate WJ, Altenhoff P, Grummer R, Traub O, Frank H, Jahnke K, Winterhager E (1998) Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. *Cell Tissue Res.* 294(3):415-20.

Lee SJ, Talamantes F, Wilder E, Linzer DI, Nathans D (1988) Trophoblastic giant cells of the mouse placenta as the site of proliferin synthesis. *Endocrinology* 122(5):1761-8.

Leighton PA, Saam JR, Ingram RS, Tilghman SM (1996) Genomic imprinting in mice: its function and mechanism. *Biol. Reprod.* 54(2):273-8.

Leighton PA, Ingram RS, Eggenschwiler J, Efstratiadis A, Tilghman SM (1995) Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. *Nature* 375:34-9.

Lescisin KR, Varmuza S, Rossant J (1988) Isolation and characterization of a novel trophoblast-specific cDNA in the mouse. *Genes Dev.* 2(12A):1639-46.

Li Y, Behringer RR (1998) Esx1 is an X-chromosome-imprinted regulator of placental development and fetal growth. *Nat. Genet.* 20(3):309-11.

Linzer DI, Fisher SJ (1999) The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy. *Mol. Endocrinol.* 13(6):837-40.

Liu XZ, Xia XJ, Xu LR, Pandya A, Liang CY, Blanton SH, Brown SD, Steel KP, Nance WE (2000) Mutations in connexin31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Hum. Mol. Genet.* 9(1):63-7.

Lo CW, Gilula NB (1979) Gap junctional communication in the post-implantation mouse embryo *Cell* 18(2):411-22.

Luo J, Sladek R, Bader JA, Matthyssen A, Rossant J, Giguere V (1997) Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta. *Nature* 388:778-82.

Ma GT, Linzer DI (2000) GATA-2 restricts prolactin-like protein A expression to secondary trophoblast giant cells in the mouse. *Biol. Reprod.* 63(2):570-4.

Mackay D, Ionides A, Kibar Z, Rouleau G, Berry V, Moore A, Shiels A, Bhattacharya S (1999) Connexin46 mutations in autosomal dominant congenital cataract. *Am. J. Hum. Genet.* 64(5):1357-64.

- Manthey D, Bukauskas F, Lee CG, Kozak CA, Willecke K** (1999) Molecular cloning and functional expression of the mouse gap junction gene connexin-57 in human HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 274(21):14716-23.
- Miozzo M, Simoni G** (2002) The role of imprinted genes in fetal growth. *Biol. Neonate.* 81(4):217-28.
- Moorby C, Patel M** (2001) Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp. Cell. Res.* 271(2):238-48.
- Moos M, Gallwitz D** (1983) Structure of two human beta-actin-related processed genes one of which is located next to a simple repetitive sequence. *EMBO J.* 2(5):757-61.
- Morasso MI, Grinberg A, Robinson G, Sargent TD, Mahon KA** (1999) Placental failure in mice lacking the homeobox gene Dlx3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(1):162-7.
- Nakayama H, Liu Y, Stifani S, Cross JC** (1997) Developmental restriction of Mash-2 expression in trophoblast correlates with potential activation of the notch-2 pathway. *Dev. Genet.* 21(1):21-30.
- Norwitz ER, Repke JT** (2000) Preeclampsia prevention and management. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 7(1):21-36.
- Nozaki T, Masutani M, Watanabe M, Ochiya T, Hasegawa F, Nakagama H, Suzuki H, Sugimura T** (1999) Syncytiotrophoblastic giant cells in teratocarcinoma-like tumors derived from Parp-disrupted mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(23):13345-50.
- Pal JD, Berthoud VM, Beyer EC, Mackay D, Shiels A, Ebihara L** (1999) Molecular mechanism underlying a Cx50-linked congenital cataract. *Am. J. Physiol.* 276:1443-6.
- Pantaleon M, Harvey MB, Pascoe WS, James DE, Kaye PL** (1997) Glucose transporter GLUT3: ontogeny, targeting, and role in the mouse blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(8):3795-800.
- Pauken CM, Lo CW** (1995) Nonoverlapping expression of Cx43 and Cx26 in the mouse placenta and decidua: a pattern of gap junction gene expression differing from that in the rat. *Mol. Reprod. Dev.* 41(2):195-203.
- Paul DL** (1986) Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell Biol.* 103(1):123-34.
- Peters TJ, Chapman BM, Wolfe MW, Soares MJ** (2000) Placental lactogen-I gene activation in differentiating trophoblast cells: extrinsic and intrinsic regulation involving mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Endocrinol.* 165(2):443-56.
- Phelan P, Starich TA** (2001) Innexins get into the gap. *Bioessays* 23(5):388-96.

- Plum A, Winterhager E, Pesch J, Lautermann J, Hallas G, Rosentreter B, Traub O, Herberhold C, Willecke K** (2001) Connexin31-deficiency in mice causes transient placental dysmorphogenesis but does not impair hearing and skin differentiation. *Dev. Biol.* 231(2):334-47.
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J** (1995) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267:1831-4.
- Reuss B, Hellmann P, Traub O, Butterweck A, Winterhager E** (1997) Expression of connexin31 and connexin43 genes in early rat embryos. *Dev. Genet.* 21(1):82-90.
- Reuss B, Hellmann P, Dahl E, Traub O, Butterweck A, Grummer R, Winterhager E** (1996) Connexins and E-cadherin are differentially expressed during trophoblast invasion and placenta differentiation in the rat. *Dev. Dyn.* 205(2):172-82.
- Richard G, Smith LE, Bailey RA, Itin P, Hohl D, Epstein EH Jr, DiGiovanna JJ, Compton JG, Bale SJ** (1998) Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. *Nat. Genet.* 20(4):366-9.
- Riley P, Anson-Cartwright L, Cross JC** (1998) The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat. Genet.* 18(3):271-5.
- Risek B, Gilula NB** (1991) Spatiotemporal expression of three gap junction gene products involved in fetomaternal communication during rat pregnancy. *Development.* 113(1):165-81.
- Roberts RM, Farin CE, Cross JC** (1990) Trophoblast proteins and maternal recognition of pregnancy. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 12:147-80.
- Roberts AW, Robb L, Rakar S, Hartley L, Cluse L, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Alexander WS** (2001) Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 31;98(16):9324-9.
- Rossant J, Cross JC** (2001) Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat. Rev. Genet.* 2(7):538-48.
- Russ AP, Wattler S, Colledge WH, Aparicio SA, Carlton MB, Pearce JJ, Barton SC, Surani MA, Ryan K, Nehls MC, Wilson V, Evans MJ** (2000) Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* 404:95-9.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edition). Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y. USA.
- Sasaki H, Ferguson-Smith AC, Shum AS, Barton SC, Surani MA** (1995) Temporal and spatial regulation of H19 imprinting in normal and uniparental mouse embryos. *Development.* 121(12):4195-202.

Scott IC, Anson-Cartwright L, Riley P, Reda D, Cross JC (2000) The HAND1 basic helix-loop-helix transcription factor regulates trophoblast differentiation via multiple mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 20(2):530-41.

Smith DE, Gridley T (1992) Differential screening of a PCR-generated mouse embryo cDNA library: glucose transporters are differentially expressed in early postimplantation mouse embryos. *Development* 116(3):555-61.

Smith RJ, Arnaud P, Konfortova G, Dean WL, Beechey CV, Kelsey G (2002) The mouse *Zac1* locus: basis for imprinting and comparison with human *ZAC*. *Gene* 292(1-2):101-12

Sohl G, Guldenagel M, Beck H, Teubner B, Traub O, Gutierrez R, Heinemann U, Willecke K (2000) Expression of connexin genes in hippocampus of kainate-treated and kindled rats under conditions of experimental epilepsy. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 83(1-2):44-51.

Svensson K, Mattsson R, James TC, Wentzel P, Pilartz M, MacLaughlin J, Miller SJ, Olsson T, Eriksson UJ, Ohlsson R (1998) The paternal allele of the H19 gene is progressively silenced during early mouse development: the acetylation status of histones may be involved in the generation of variegated expression patterns. *Development.* 125(1):61-9.

Takahashi Y, Carpino N, Cross JC, Torres M, Parganas E, Ihle JN (2003) SOCS3: an essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation. *EMBO J.* 22(3):372-84.

Takahashi K, Kobayashi T, Kanayama N (2000) p57(Kip2) regulates the proper development of labyrinthine and spongiotrophoblasts. *Mol. Hum. Reprod.* 6(11):1019-25.

Talamantes F, Ogren L (1988) The placenta as an endocrine organ : polypeptides. In: Knobil E, Neill JD (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, vol 2: 2093-2144.

Tamai Y, Ishikawa T, Bosl MR, Mori M, Nozaki M, Baribault H, Oshima RG, Taketo MM (2000) Cytokeratins 8 and 19 in the mouse placental development. *J. Cell Biol.* 151(3):563-72.

Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J (1998) Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 282:2072-5.

Tanaka M, Gertsenstein M, Rossant J, Nagy A (1997) Mash2 acts cell autonomously in mouse spongiotrophoblast development. *Dev. Biol.* 190(1):55-65.

Teubner B, Michel V, Pesch J, Lautermann J, Cohen-Salmon M, Sohl G, Jahnke K, Winterhager E, Herberhold C, Hardelin JP, Petit C, Willecke K (2003) Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum. Mol. Genet.* 12(1):13-21.

Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M, Tada M (1998) Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 273(21):12725-31.

Traub O, Hertlein B, Kasper M, Eckert R, Krisciukaitis A, Hulser D, Willecke K (1998) Characterization of the gap junction protein connexin37 in murine endothelium, respiratory epithelium, and after transfection in human HeLa cells. *Eur. J. Cell Biol.* 77(4):313-22.

Traub O, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Elfgang C, Bastide B, Scheidtmann KH, Hulser DF, Willecke K (1994) Immunochemical and electrophysiological characterization of murine connexin40 and -43 in mouse tissues and transfected human cells. *Eur. J. Cell Biol.* 64(1):101-12.

Traub O, Look J, Dermietzel R, Brummer F, Hulser D, Willecke K (1989) Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. *J. Cell. Biol.* 108(3):1039-51.

Traub O, Janssen-Timmen U, Druge PM, Dermietzel R, Willecke K (1982) Immunological properties of gap junction protein from mouse liver. *J. Cell. Biochem.* 19(1):27-44.

Uy GD, Downs KM, Gardner RL (2002) Inhibition of trophoblast stem cell potential in chorionic ectoderm coincides with occlusion of the ectoplacental cavity in the mouse. *Development.* 129(16):3913-24.

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

White TW, Bruzzone R, Goodenough DA, Paul DL (1992) Mouse Cx50, a functional member of the connexin family of gap junction proteins, is the lens fiber protein MP70 *Mol. Biol. Cell.* 3(7):711-20.

Whitten WK, Champlin AK (1978) Pheromones, estrus, ovulation and mating. *Methods in mammalian reproduction* (ed. J.C. Daniel). 403-417.

Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG, Nisula BC (1988) Incidence of early loss of pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 319(4):189-94.

Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* 383(5):725-37.

Wooding FBP, Flint APF (1994) Placentation. In: Lamming GE, ed. *Marshall's Physiology of Reproduction*, 4th edit. New York: Chapman and Hall; 233-460.

Yamamoto H, Flannery ML, Kupriyanov S, Pearce J, McKercher SR, Henkel GW, Maki RA, Werb Z, Oshima RG (1998) Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. *Genes Dev.* 12(9):1315-26.

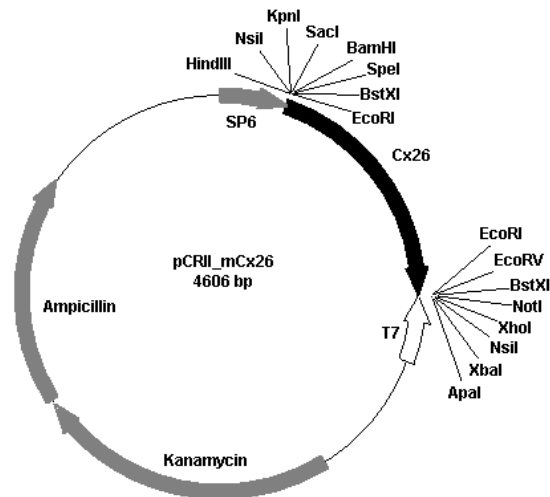
Yan J, Tanaka S, Oda M, Makino T, Ohgane J, Shiota K (2001) Retinoic acid promotes differentiation of trophoblast stem cells to a giant cell fate. *Dev. Biol.* 235(2):422-32.

Yotsumoto S, Shimada T, Cui CY, Nakashima H, Fujiwara H, Ko MS (1998) Expression of adrenomedullin, a hypotensive peptide, in the trophoblast giant cells at the embryo implantation site in mouse. *Dev. Biol.* 203(2):264-75.

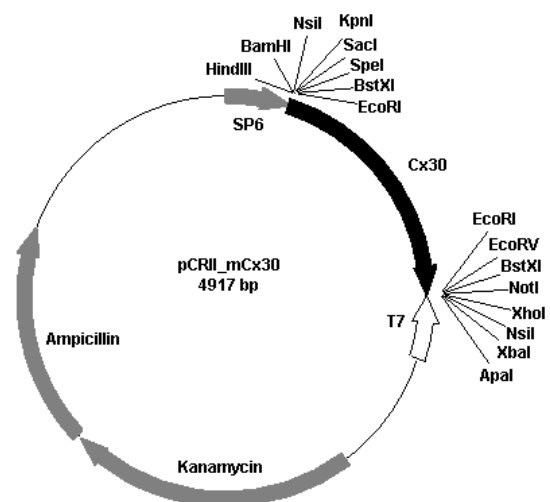
Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH (1997) Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J. Clin. Invest.* 99(9):2139-51.

7 Anhang

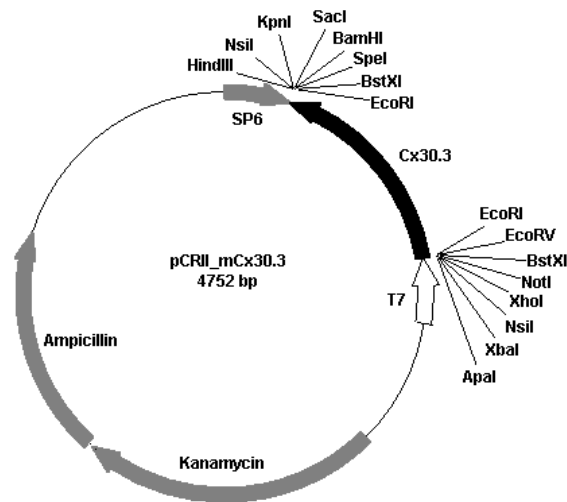
7.1 Plasmidkarten



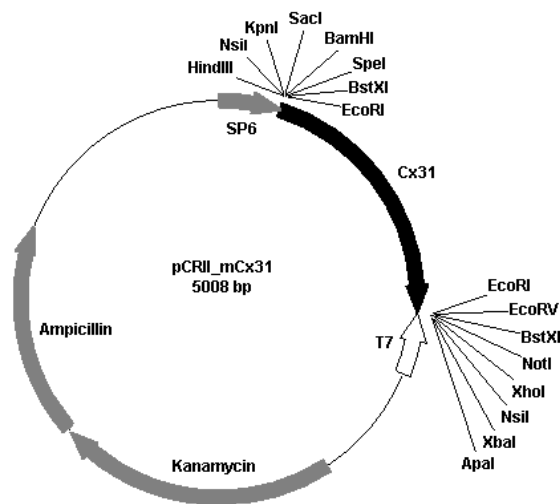
pCRII_mCx26 - 658 bp
cDNA-Fragment aus dem
OLR des Maus Cx26



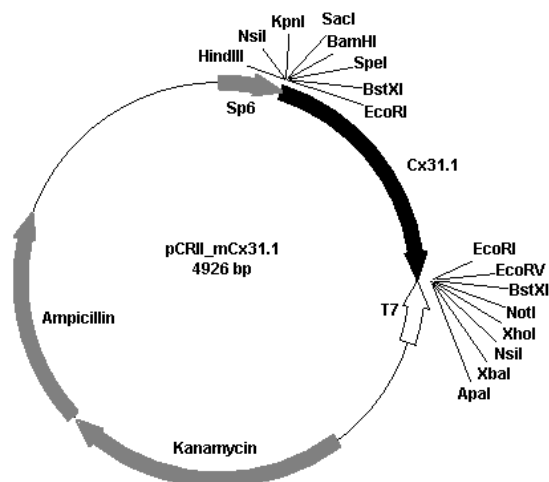
pCRII_mCx30 - 969 bp
cDNA-Fragment aus dem
OLR des Maus Cx30



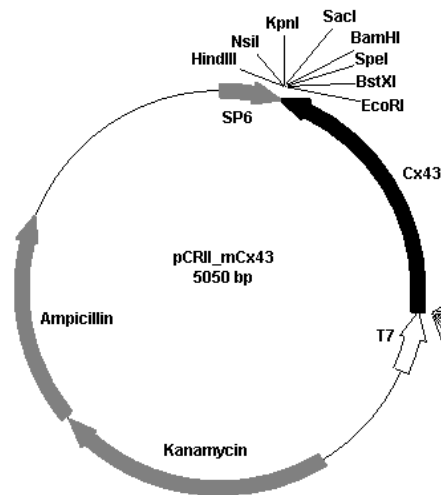
pCRII_mCx30.3 - 804 bp
cDNA-Fragment aus dem
OLR des Maus Cx30.3



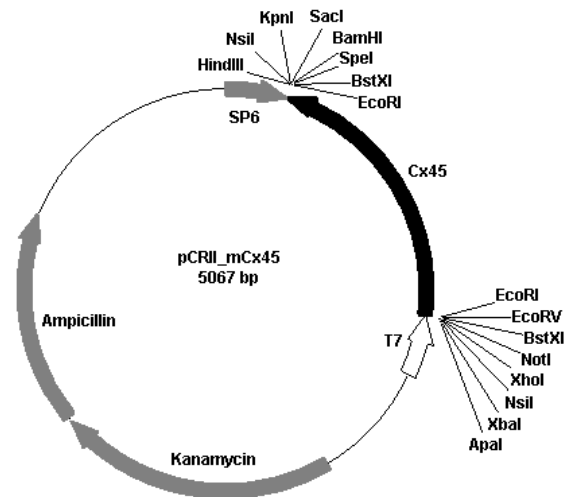
pCRII_mCx31 - 1060 bp
cDNA-Fragment aus dem
OLR des Maus Cx31



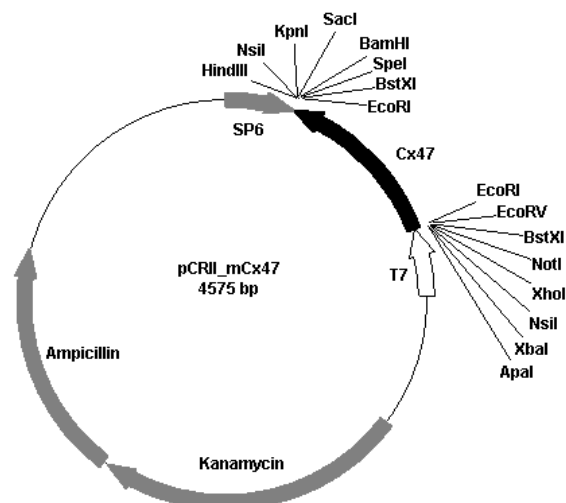
pCRII_mCx31.1 - 978 bp
cDNA-Fragment aus dem
OLR des Maus Cx31.1



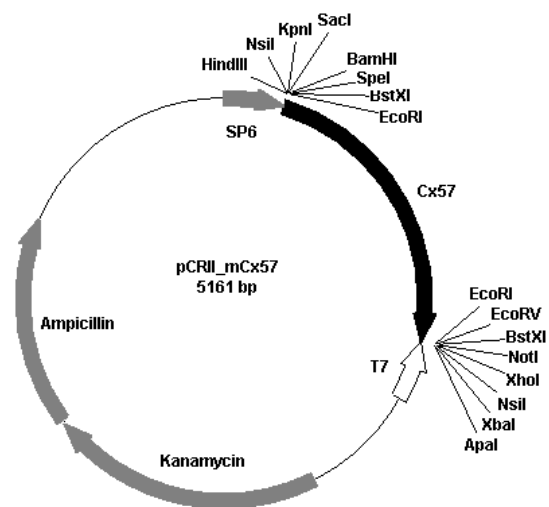
pCRII_mCx43 - 1102 bp
cDNA-Fragment aus dem
OLR des Maus Cx43



pCRII_mCx45 - 1119 bp
cDNA-Fragment aus dem
OLR des Maus Cx45



pCRII_mCx47 - 627 bp
cDNA-Fragment aus dem
OLR des Maus Cx47



pCRII_mCx57 - 1213 bp
cDNA-Fragment aus dem
OLR des Maus Cx57

7.2 Gene-Array Ergebnisse

Ergebnisse der vergleichenden Analyse nach Anwendung aller Filter

In den Tabellen 7.2.1 bis 7.2.4 sind die Ergebnisse aus der vergleichenden Analyse der *Cx31^{-/-}* mit den *Cx31^{+/-}* TS-Zelllinien dargestellt. Alle aufgelisteten Gene zeigten eine mindestens 2,5fache Regulation und hielten einem *p-value* von 0,999 (bzw. 0,001) stand. Angegeben sind alle Gene, die in mindestens der Hälfte der Einzelvergleiche (16 im undifferenzierten Zustand; 12 an Tag 4 der Differenzierung) eine Regulation zeigten.

Die Gene bzw. deren Produkte wurden nach Kargul *et al.* (2001) in funktionelle Klassen eingeordnet: E, Energie/Metabolismus; M, Matrix/Strukturproteine; P, Proteinsynthese/Translation; S, Signaltransduktion; T, Transkription/Chromatin; Z, Zellzyklus; U, unbekannte Funktion oder noch nicht charakterisierte EST-Sequenz. Die Regulation ist als Mittel der Werte aus den Einzelvergleichen angegeben. Grau unterlegt sind die Gene, die im Mann-Whitney-Test eine signifikante Regulation aufwiesen. Der ‚MW-change‘ gibt das Maß der Regulation auf Basis des Mann-Whitney-Tests an.

Einige der EST-Sequenzen konnte durch eine Datenbanksuche als Teil einer bekannten Sequenz identifiziert werden. Dies ist durch ein in Klammern nachgestelltes EST angezeigt. Für andere, noch nicht charakterisierte ESTs, ist in Klammern eine Homologie zu bekannten Proteinen anderer Arten angegeben.

Tab. 7.2.1: Gene die in undifferenzierten Cx31^{-/-} TS-Zellen eine erniedrigte Expression zeigten. Angegeben sind alle Gene, die in der vergleichenden Analyse von undifferenzierten Cx31^{-/-} mit undifferenzierten Cx31^{+/-} TS-Zelllinien in mindestens 8 der 16 Einzelvergleiche eine Regulation zeigten. D, Häufigkeit der Regulation in den 16 Einzelvergleichen. Weitere Erklärungen s.o.

D	Gen-Bezeichnung bzw. Gen-Produkt	Funkt. Klasse	Datenbank Nummer	Regulation im Mittel	MW Change
16	Connexin31	S	X63099	-42,1	-100,4
16	H19	S	X58196	-49,2	-15,0
14	Facilitated glucose transporter 3 (GLUT3)	E	M75135	-7,2	-5,4
13	Facilitated glucose transporter 3 (GLUT3) (EST)	E	AI854156	-4,1	-4,6
12	PAF-Acetylhydrolase	E	U34277	-3,0	-2,3
12	Fructose-1,6-bisphosphatase	E	D42083	-6,8	-3,8
11	Inteferon beta, fibroblast	S	V00755	-3,5	-1,7
11	Small inducible Cytokine A2	S	M19681	-2,6	-2,2
10	Peripheral myelin protein (PMP22)	M	Z38110	-3,1	-2,2
10	EST (unbekannt)	U	AI839109	-2,2	-2,0
10	Spermidine aminopropyltransferase	E	AF031486	-2,9	-2,0
10	FKBP65 binding protein	S	L07063	-4,8	-2,5
9	EST (unbekannt)	U	AW125086	-2,9	-2,6
9	EST (meltrin-beta)	M	AA726223	-4,4	-1,9
9	EST (unbekannt)	U	AA163960	-2,5	-1,7
9	Proteoglycan core protein	M	M34603	-22,9	-2,8
9	High mobility group protein 1c (HMG-1c)	T	X99915	-2,6	-2,1
8	Inhibitor of DNA binding 1 (Id1)	T	M31885	-2,3	-2,3
8	Carbonic anhydrase IV	M	U37091	-6,4	-2,0
8	Translation initiation factor eIF2 gamma	P	AJ006584	-45,9	-23,8
8	Insulin like growth factor binding protein 6	S	X81584	-3,4	-1,8
8	EST (unbekannt)	U	AA981581	-2,6	-1,9
8	EST (unbekannt)	U	AV210958	-3,3	-1,3
8	FKBP65 binding protein (EST)	S	AV320580	-11,2	-6,2
8	Troponin T3	M	L48989	-3,2	-2,1
8	Ly-6 alloantigene (Ly-6E.1)	S	X04653	-2,7	-1,9
8	Lymphocyte orientated kinase (LOK)	S	D89728	-2,6	-1,2
8	Histon 1	T	M29260	-2,1	-1,6
8	Junctional cell adhesion molecule (Jcam3) (EST)	M	AI850297	-4,8	-1,8
8	Matrix metalloproteinase 9 (MMP9)	M	X72795	-3,8	-2,7

Tab. 7.2.2: Gene die in undifferenzierten Cx31^{-/-} TS-Zellen eine erhöhte Expression zeigten. Angegeben sind alle Gene, die in der vergleichenden Analyse von undifferenzierten Cx31^{-/-} mit undifferenzierten Cx31^{+/-} TS-Zelllinien in mindestens 8 der 16 Einzelvergleiche eine Regulation zeigten. Die Häufigkeit einer Erhöhung (I) bzw. Erniedrigung (D) der Expression in den 16 Einzelvergleichen ist in Spalte 1 angegeben. Die mittlere Regulation ist für eine Erhöhung mit positivem und für eine Erniedrigung mit negativen Vorzeichen dargestellt. Weitere Erklärungen s.o.

I / D	Gen-Bezeichnung bzw. Gen-Produkt	Funkt. Klasse	Datenbank Nummer	Regulation im Mittel	MW Change
12	Bone gamma carboxyglutamate protein 1 (Osteocalcin 2)	M	L24431	+7,5	+1,6
12	Osteocalcin related protein	M	L24430	+7,0	+1,6
12	EST (tumor-associated calcium signal transducer 2)	U	AI563854	+18,7	+1,9
11 / 1	Claudin-7	M	AF087825	+38,8 / - 6,1	+1,11
10 / 4	Placental lactogen 1	S	M35662	+65,5 / -1,9	+1,1
10 / 1	EST (unbekannt)	U	AW123574	+37,7 / -3,9	+21,3
9 / 1	EST (unbekannt)	U	AI845823	+6,8 / -3,3	+1,4
8 / 3	Growth factor regulated calcium channel (GRC)	S	AB021665	+4,1 / -2,33	+1,1
8 / 1	c-fos	T	V00727	+3,8 / -1,8	+1,1
8 / 1	Proliferin	S	K03235	+9,7 / -1,9	+1,1
8	Heat stable antigen (CD24a)	M	M58661	+2,71	+1,3
8	X-linked lymphocyte regulated complex (pM1)	M	X07967	+12,5	+1,6
8	Adenylyl-cyclase-associated protein (CAP)	M	L12367	+6,6	+1,2
8	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1c (p57)	C	U22399	+3,3	+1,1
8	EST (unbekannt)	U	AA619554	+3,2	+1,2

Tab. 7.2.3: Gene, die in Cx31^{-/-} TS-Zellen an Tag 4 der Differenzierung eine erniedrigte Expression zeigten. Angegeben sind alle Gene, die in der vergleichenden Analyse von Cx31^{-/-} mit Cx31^{+/-} TS-Zelllinien am Tag 4 der Differenzierung in mindestens 6 der 12 Einzelvergleiche eine Regulation zeigten. Die Häufigkeit einer Erniedrigung (D) der Expression in den 12 Einzelvergleichen ist in Spalte 1 angegeben. Weitere Erklärungen s.o.

D	Gen-Bezeichnung	Funkt. Klasse	Datenbank Nummer	Regulation im Mittel	MW change
12	Connexin31	S	X63099	-256,1	-367,4
12	Connexin31.1	S	M91236	-5,3	-4,7
11	High mobility group protein 1c (HMG-1c)	T	X99915	-5,1	-3,9
11	FGF binding protein 1	S	AF065441	-3,8	-4,5
10	Inhibitor of DNA binding 1 (Id1)	T	M31885	-4,5	-3,2
8	Facilitated glucose transporter 3 (GLUT3) (EST)	E	AI854156	-4,6	-4,1
8	Facilitated glucose transporter 3 (GLUT3)	E	M75135	-6,7	-2,6
8	EST (unbekannt)	U	AA260145	-4,6	-5,0
8	Calmodulin binding protein SAH1	S	AF062378	-4,1	-3,3
6	Kinesin related mitotic motor protein (Eg5)	M	AJ223293	-3,1	-2,8
6	EST (unbekannt)	U	AI842603	-3,6	-2,8
6	Fk506 binding protein (Fkbp25) (EST)	S	AI155120	-13,0	-4,0
6	EST (unbekannt)	U	AI848671	-3,0	-2,5
6	H19	S	X58196	-38,7	-5,8
6	Wingless-related MMTV integration site 6 (Wnt6)	S	M89800	-3,0	-2,5
6	Translation initiation factor eIF2 gamma	P	AJ006584	-55,5	-30
6	EST (unbekannt)	U	AA822539	-8,6	-2,5
6	SRY-box containing gene 2 (Sox2)	T	X94127	-3,4	-2,1

Tab. 7.2.4: Gene, die in Cx31^{-/-} TS-Zellen an Tag 4 der Differenzierung eine erhöhte Expression zeigten. Angegeben sind alle Gene, die in der vergleichenden Analyse von Cx31^{-/-} mit Cx31^{+/-} TS-Zelllinien am Tag 4 der Differenzierung in mindestens 6 der 12 Einzelvergleiche eine Regulation zeigten. Die Häufigkeit einer Erhöhung (I) bzw. Erniedrigung (D) der Expression in den 12 Einzelvergleichen ist in Spalte 1 angegeben. Die mittlere Regulation ist für eine Erhöhung mit positivem und für eine Erniedrigung mit negativen Vorzeichen dargestellt. Weitere Erklärungen s.o.

I / D	Gen-Bezeichnung bzw. Gen-Produkt	Funkt. Klasse	Datenbank Nummer	Regulation im Mittel	MW change
12	EST (unbekannt)	U	AW123574	+45,9	+59,8
11	Zinc finger protein Zac1	T	X95504	+24,3	+4,9
11	Plakophilin 3 (Pkp) (EST)	M	AW120906	+10,1	+3,4
10	EST (unbekannt)	U	AI834895	+5,4	+6,0
10	Sialyltransferase 10 (Siat10) (EST)	M	AI153959	+3,6	+4,1
9 / 1	EST (tumor-associated calcium signal transducer 2)	U	AI563854	+45,2 / -3,5	+58,6
9	Growth factor regulated calcium channel (GRC)	S	AB021665	+4,7	+3,9
9	Tubby like protein (Tulp1)	S	AF085681	+3,6	+3,2
9	Insulin-like growth factor binding protein 3 (EST)	S	AI842277	+4,9	+3,2
8 / 1	Claudin-7	M	AF087825	+260,7 / -2,8	+20,3
8	Solute carrier family 6, member 2	E	U76306	+7,7	+9,3
8	G-protein-like LRG-47	S	U19119	+4,6	+2,3
8	Proliferin	S	K03235	+9,6	+3,4
8	EST (Olr1-like gene)	U	AA104818	+5,2	+4,2
8	Zinc finger protein Zac1	T	X95503	+4,6	+3,1
8	myc-intron-binding protein-1	S	Y15907	+4,8	+3,2
8	EST (unbekannt)	U	AW125390	+25,8	+6,1
8	EST (unbekannt)	U	AW048779	+5,1	+5,1
8	PRDC (protein related to DAN und Cerbus)	S	AB011030	+10,0	+4,4
8	Phosphoglycoprotein 3	E	M24417	+16,3	+11,6
8	Phosphoprotein (F1-20)	M	M83985	+3,5	+3,1
7	Connexin26	S	M81445	+5,3	+2,7
7	Cyp11a (EST)	E	AW121619	+5,7	+3,3
7	Mitogen regulated protein/proliferin (MRP/PLF3)	S	X16009	+18,7	+3,7
7	Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase	M	U04299	+3,7	+2,5
7	EST (homolog zu prostate stem cell antigen)	U	AW209486	+5,5	+8,6
7	Predicted GTP binding protein (IRG-47)	S	M63630	+9,6	+4,1
7	Colony stimulating factor 1 receptor (c-fms)	S	X06368	+3,7	+2,6
7	EST (unbekannt)	U	AI850713	+4,0	+2,8
7	EST (unbekannt)	U	AI197161	+3,6	+2,7
7	Macrosialin (CD68)	M	X68273	+3,4	+2,2
7	Osteocalcin related protein	M	L24430	+4,4	+4,0
7	Necdin	T	D76440	+7,2	+1,6
7	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	S	U43084	+23,8	+4,9
6 / 2	Placental lactogen 1	S	M35662	+12,0 / -3,8	+1,2

Tab. 7.2.4: Fortsetzung

I / D	Gen-Bezeichnung bzw. Gen-Produkt	Funkt. Klasse	Datenbank Nummer	Regulation im Mittel	MW change
6 / 2	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II	E	Y09517	+9,0 / -2,6	-1,1
6 / 1	NAD(+)-dependent 15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase	E	U44389	+3,1 / -2,8	+1,8
6 / 1	Trop2	S	Y08830	+6,3 / -2,6	+6,3
6	Interferon-induced 15-KDa protein	S	X56602	+5,6	+2,2
6	Adenosine deaminase	E	M10319	+2,8	+1,3
6	Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)	M	AF004833	+9,0	+1,9
6	Peptidylprolyl isomerase C-associated protein	M	X67809	+5,5	+2,0
6	EST (unbekannt)	U	AA413015	+5,8	+3,8
6	EST (unbekannt)	U	AW047875	+4,4	+3,2
6	EST (unbekannt)	U	AW047237	+11,2	+2,4
6	UPB43 (Ubiquitin specific protease) (EST)	S	AW047653	+17,1	+2,1
6	Guanine nucleotide binding protein, beta 1	S	U29055	+3,3	+2,0
6	Interleukin 1 alpha	S	M14639	+3,5	+4,2
6	Signal transducer and activator of transcription 6	S	L47650	+25,9	+2,0
6	Plasminogen activator, tissue	M	J03520	+3,2	+1,9
6	Proliferin	S	K03235	+13,0	+3,4
6	Adenylyl cyclase-associated protein (CAP)	M	L12367	+5,4	+1,9
6	EST (unbekannt)	U	AI852734	+2,9	+2,1
6	EST (unbekannt)	U	AW046243	+6,6	+6,3
6	Low molecular mass polypeptide complex subunit 2	M	D44456	+4,2	+2,7
6	Osteoblast specific factor 2 (osf-2)	M	D13664	+7,2	+2,4
6	EST (ähnlich zu Interferon stimulated gene, Isg15)	U	AV152244	+6,6	+2,4
6	Sciellin (EST)	M	AA727482	+16,0	+3,9
6	mGBP-2	S	AJ007970	+9,6	+2,3
6	Natriuretic peptide precursor type B	S	D16497	+5,2	+1,6
6	EST (VHSH viral hemorrhagic septicemia virus)	U	AA204579	+3,9	+1,8
6	Glycoprotein-associated amino acid transporter y+LAT1a	E	AJ012754	+7,3	+3,3
6	EST (Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2)	U	U43085	+7,6	+5,0
6	EST (ähnlich zu melanoma differentiation associated protein)	U	AA959954	+3,2	+1,7
6	Guanylat nucleotide binding protein 3 (EST)	S	AW047476	+10,0	+2,2
6	Prolactin-like protein G precursor	S	AF020525	+11,3	+2,1
6	Epidermal growth factor binding protein type A	M	M17979	+6,11	+5,4
6	hsd11b2	E	X90647	+9,3	+3,3
6	Bone gamma carboxyglutamate protein 1 (Osteocalcin 2)	M	L24431	+8,3	+5,8

Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. E. Winterhager bedanke ich mich für die Möglichkeit diese Promotion durchführen zu können sowie für ihre zahlreichen Anregungen und ihre ständige Diskussionsbereitschaft. Die Ermunterung meine Arbeiten auf Kongressen zu präsentieren und die Ermöglichung eines Forschungsaufenthaltes in Toronto gehören zu den besonders positiven Erfahrungen meiner Doktorandenzeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. B. Opalka danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Stephen Lye danke ich dafür, dass ich vier Monate in seinem ‚lab‘ am Mount Sinai Hospital in Toronto verbringen durfte, wo ich die Generierung von Trophoblast-Stammzellen erlernt habe.

Heinz-Dieter Gabriel danke ich für die anfängliche Betreuung und die Einarbeitung in die Laborarbeit.

Ein besonderer Dank gilt Natalie Knipp die mich in allen experimentellen Bereichen durch ihre Arbeit unterstützt hat.

Bei Georgia Rauter und Gabriele Sehn bedanke ich mich für die histologischen Arbeiten und die Hilfe bei den zahlreichen Northern-Hybridisierungen.

Meinen ‚Kollegen‘ Alexandra Gellhaus und Yvonne Janßen bin ich für drei Jahre guter Zusammenarbeit dankbar. Die gegenseitige Hilfe im Labor, dass ‚Erleben‘ gemeinsamer Probleme und die amüsanten Kongressabende haben das Arbeiten in den vergangenen Jahre sehr angenehm gemacht.

Mariam Nassiry danke ich für die Connexin-Immunzytochemien.

Caroline Dunk bin ich für die sprachliche Unterstützung bei der Kommunikation mit kanadischen Institutionen dankbar.

Bei Dave Kittel und Peter Babioch bedanke ich mich für die Fotoarbeiten.

Dominik Heyers danke ich für die Hilfe bei den Laserscanaufnahmen.

Herrn Dr. Klein-Hitpass danke ich für die Gene-Array-Analysen und die Hilfe bei der Datenauswertung.

Allen Mitgliedern des Instituts für Anatomie und des ‚Lye labs‘ am Mount Sinai Hospital in Toronto danke ich für das gute Arbeitsklima.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Familie - allen voran an meiner Mutter – und an meine Freunde für die jahrelange Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Mark Kibschull

Anschrift: Rauterstr. 13
45122 Essen

Geburtsdatum: 14.12.1972

Geburtsort: Essen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1979-1983 Grundschule in Essen-Kettwig
1984-1992 Theodor-Heuss-Gymnasium in Essen-Kettwig

Schulabschluss: 1992 Abitur

Studium: 1992-1998 Diplom-Studiengang Biologie an der Ruhr-Universität Bochum

Studienabschluss: 1998 Diplom-Biologe

Berufstätigkeit: 10.98-06.99 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität-Bochum
07.99-12.1999 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (BAT2a/2) am selben Institut

Doktorarbeit: 01.2000-04.2002 Doktorand in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Winterhager am Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen

Essen, 11.04.2003

Mark Kibschull

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Trophoblast-Stammzellen als Modell zur Analyse der Connexin vermittelten Signalwege in der Plazentaentwicklung der Maus“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Mark Kibschull befürworte.

Essen, 11.04.2003

Prof. Dr. E. Winterhager

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, 11.04.2003

Mark Kibschull

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, 11.04.2003

Mark Kibschull

