

# TEMPERATURSENSITIVITÄT VON CONNEXIN 26

Melanie Steffens<sup>1</sup>, Hongling Wang<sup>1,2</sup>, Thomas Lenarz<sup>1</sup>, Frank Stahl<sup>3</sup>, Athanasia Warnecke<sup>1</sup>, Carsten Zeilinger<sup>2</sup>

<sup>1</sup>HNO-Klinik und Deutsches HörZentrum Hannover (DHZ) der Medizinischen Hochschule Hannover (Direktor: Prof. Th. Lenarz)

<sup>2</sup>BMWZ (Zentrum für Biomolekulare Wirkstoffe)/ Institut für Biophysik, Gottfried-Wilhelm-Leibniz Universität Hannover

<sup>3</sup>Institut für Technische Chemie, Gottfried-Wilhelm-Leibniz Universität Hannover

## Einleitung

Die Gap Junctions sind Zell-Zell Kanäle, die den extrazellulären Raum zwischen zwei benachbarten Zellen überbrücken. Gap Junctions wurden bei vielen Säugetieren in fast allen Geweben nachgewiesen. Ein Zell-Zell-Kanal besteht aus jeweils zwei Halbkanälen (Hemichannels, Connexone), wobei jede Zelle ein Connexon zur Bildung des Kanals beisteuert. Der Halbkanal, bestehend aus jeweils sechs Connexinen, verbindet den intrazellulären Raum einer Zelle mit dem transmembranen Halbkanal der Nachbarzelle.

Eine rapide Öffnung und Schließung der Connexone (Halbzellkanäle von Connexinen) ermöglicht den Transport kleiner Moleküle zwischen den benachbarten Zellen. Im Innenohr führt dies zum Aufbau und Erhalt des endocochleären Potentials und somit zur physikalischen Grundlage des Hörens. Störungen der Homöostase führen zum Hörverlust. In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass Patienten mit heterozygoten Connexinmutationen trotz initial einwandfreier Innenohrfunktion ihr Gehör im Verlauf verlieren. Pathologische Änderungen des physikalischen Milieus, wie z. B. eine Inflammation im Innenohr, die mit einer Temperaturänderung einhergeht, könnten hierfür ursächlich sein. Es gibt indes keine Screening-Verfahren zur Evaluierung des patientenspezifischen Risikopotentials.

## Material und Methoden

Die temperaturabhängige Connexin Aktivität wurde elektrophysiologisch an *Xenopus laevis* Oozyten und optisch mittels eines Mikroarray-basierten Farbstofftransporttests bestimmt.

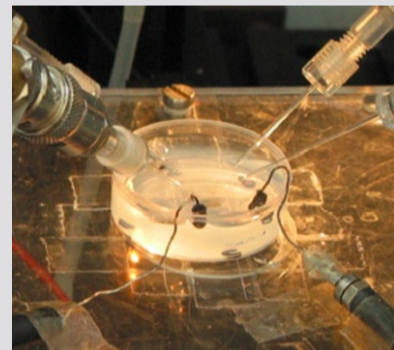


Fig. 1

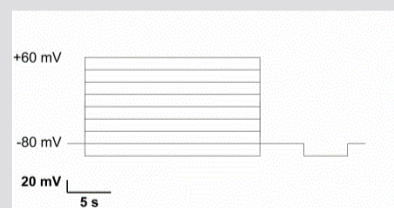


Fig. 2

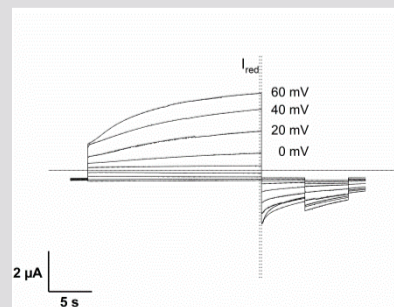


Fig. 3

Um zu überprüfen, ob eine Veränderung der Temperatur sich auf die Funktion von hCx26 Halbkanälen auswirkt, wurden in *Xenopus laevis* Oozyten hCx26 RNA und Antisense Cx38 (ASCx38) (23 nl, 2 µg/µl) zur Expression gebracht. Die Kontroll-Oozyten, die zum Vergleich der Messungen herangezogen wurden, erhielten eine Injektion nur mit ASCx38 mit der gleichen Konzentration und dem gleichen Volumen wie sie in den hCx26-ASCx38 injizierten Oozyten vorhanden waren. Der Antisense Primer dient dazu, endogene Expression von *Xenopus* Cx38 zu verhindern. Die anschließenden Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemm-Technik (Fig. 1) wurden zwei bis vier Tage nach der Injektion durchgeführt. In Fig. 2 ist das applizierte Spannungspulsprotokoll dargestellt und in Fig. 3 die korrespondierenden Stromantworten von hCx26-ASCx38 exprimierten Oozyten auf dieses Pulsprotokoll. Die gestrichelte Linie in Fig. 3 markiert das Intervall, in dem die Stromwerte ( $I_{red}$ ) für die Strom-Spannungs-Kurve abgelesen wurden. Diese Werte wurden nach Abzug des Leckstroms in Fig. 4 (3. Zeile) als Funktion über die Spannung aufgetragen.

## Ergebnisse

Die temperaturabhängige Öffnung der Connexin-Halbzellkanäle konnte direkt am Protein gezeigt werden (Wang et al. (2019)) und wurde an dem bereits etablierten Model der *Xenopus*-Oozyten verifiziert.

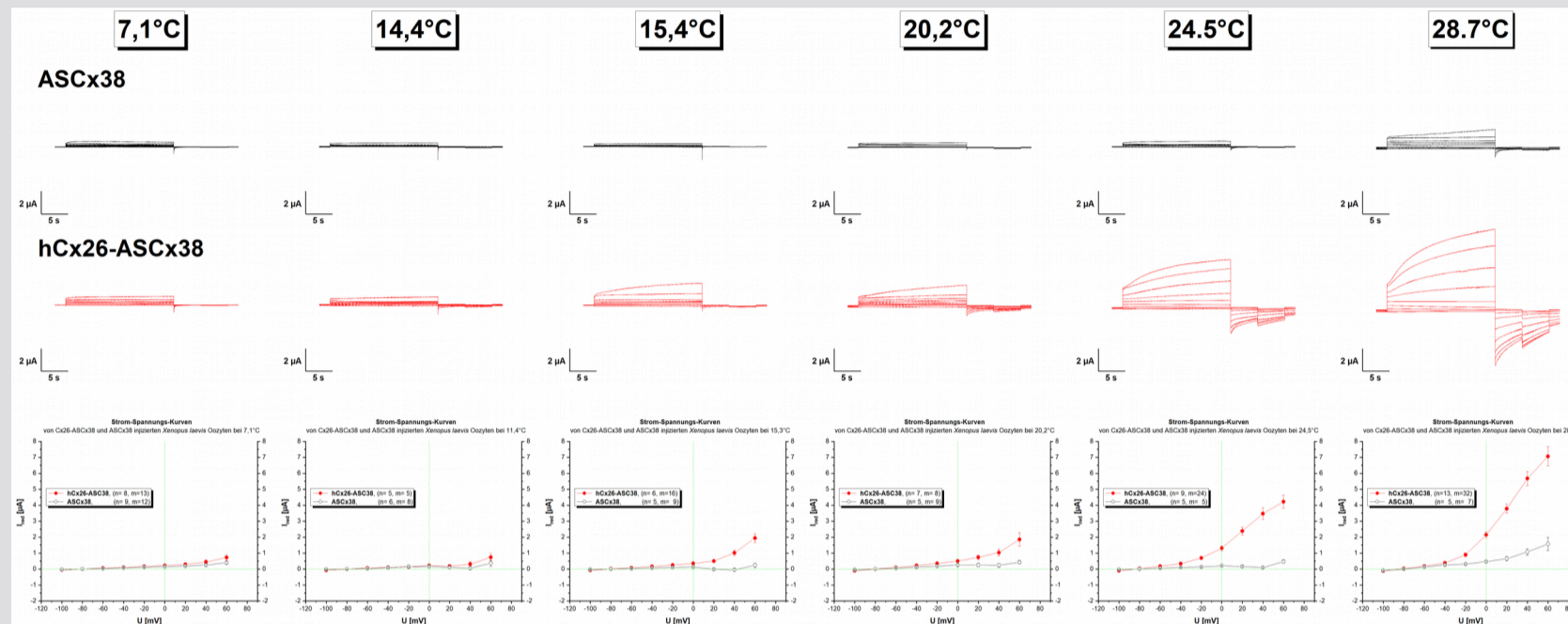


Fig. 4: Stromantworten der Spannungspulse während der Applikation verschiedener Temperaturen in  $Ca^{++}$ -freiem Badmedium. (1. Zeile): Mittelwert der Stromamplituden von ASCx38 Oozyten (Kontrolle) bei verschiedenen Temperaturen. (2. Zeile): Mittelwert der Stromamplituden von hCx26-ASCx38 Oozyten bei unterschiedlichen Temperaturen. (3. Zeile): Mittelwert  $\pm$  SEM des leckreduzierten Antwortstroms ( $I_{red}$ ) am Ende eines 20 s dauernden Spannungspulses aufgetragen als Funktion zur Spannung (U) zu verschiedenen Temperaturen. (n := Anzahl der Oozyten, m := Anzahl der Messungen, die in der Analyse verwendet wurden).

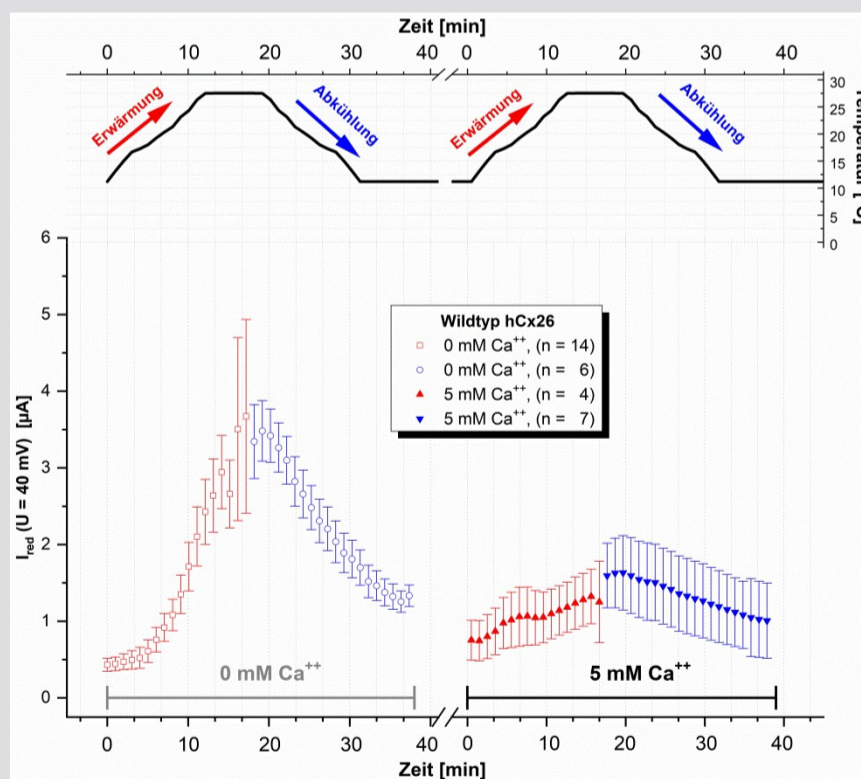


Fig. 5: Der Einfluss von Erwärmung und Abkühlung auf den Stromfluss nach einem 40 mV Puls. Oben: applizierte Temperatur. Unten: Mittelwerte  $\pm$  SEM leckreduzierter Steady-State-Ströme ( $I_{red}$ ) von hCx26-ASCx38-exprimierten *Xenopus laevis* Oozyten während Temperaturänderungen ohne (links) und mit 5 mM  $Ca^{++}$ -Medium (rechts).

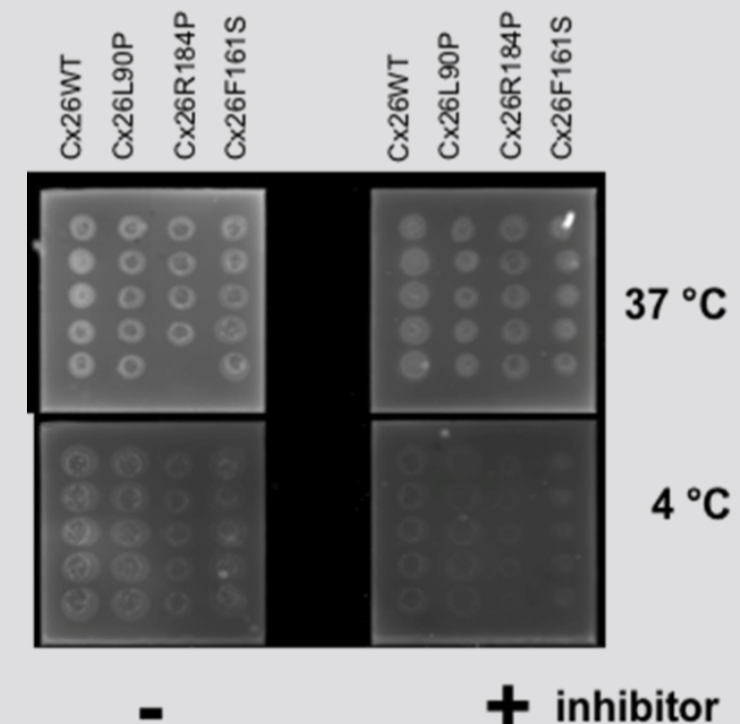


Fig. 6: Einfluss von Mutationen, Temperatur und Inhibitoren auf die Aufnahme von Lucifer Yellow über Cx26 in HeLa Zellen. HeLa Zellen, die Cx26WT oder Cx26 Mutanten exprimieren wurden in einer Mikrotiterplatte kultiviert und dann auf die NC Membran eines Microarrays gespottet. Nachfolgend wurde die freie NC Membran mit einem BSA-haltigen Puffer blockiert und die Zellen mit 3% Lucifer Yellow in PBS inkubiert. Der Chip wurde mehrmals mit PBS gewaschen und die Fluoreszenzsignale des Arrays ausgelesen.

## Zusammenfassung

Mutationen in Cx26 setzen auch die temperaturabhängige Aktivität von Cx26 herab. Untersuchungen mittels eines zellbasierten Microarraytestverfahren zeigen, dass HeLa Zellen die Cx26 exprimieren bei 37°C den Farbstoff Lucifer Yellow aufnehmen, während Mutationen in Cx26 zu einer geringeren Kanalaktivität führen (Fig. 6). Niedrige Temperatur oder die Anwesenheit von Carbenoxolone blockiert ebenfalls die Kanalaktivität. Von anderen Connexinen ist ein solcher Mechanismus nicht bekannt, die physiologische Relevanz ist noch unbekannt. Möglicherweise verhindert eine Temperatursensitivität unabhängig von  $Ca^{2+}$  und  $CO_2$  eine unkontrollierte Freisetzung von ATP oder Flüssigkeit aus der Zelle.

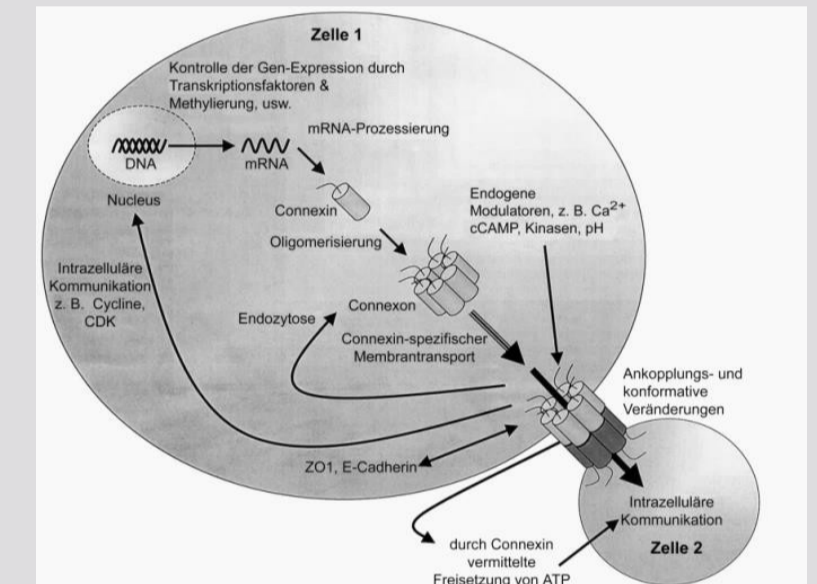


Fig. 7: Mögliche Mechanismen zur Connexin Veränderung bei Tumorigenese (modifiziert nach Chipman et al. (2003))

In Fig. 7 sind mögliche Regulationsmechanismen gezeigt, die die Veränderung der Zell-Zell Kommunikation via Gap Junctions bewirken könnten. So könnte eine Mutation im Connexin-Gen oder eine verminderte oder fehlerhafte Proteinexpression eine Ursache sein. Auf der Proteinebene könnte die Fehllokalisierung und eine nicht korrekte Phosphorylierung eine Reduktion der intrazellulären Kommunikation bewirken (Ngezahayo et al., 1998). Änderungen der Plasmamembran können ebenfalls einen Einfluss auf die in die Zellmembran eingebauten Connexone haben. Aufgrund der Präsenz von Cx26 im Innenohr, insbesondere in der Cochlea, ist die Rolle von Cx26 beim Hören besonders interessant. Die Umwandlung von Schallwellen in elektrische Impulse beinhaltet viele Prozesse unter anderem die Aufrechterhaltung der richtigen Kaliumionen-Konzentration im Innenohr. Mutationen beim Cx26 Gen könnte die normale Funktion von Cx26 stören, aber auch die oben gezeigte Temperaturabhängigkeit des Schaltverhaltens des Halbkanals könnte durch den elektrischen Impuls eines Cochlea-Implantats oder einer Inflammation gestört werden und die korrekte interzelluläre Kommunikation stören bis hin zum Zelltod. Das bessere Verständnis des Schaltmechanismus von Cx26 in Kombination mit seinen Mutationen könnte eine Vorhersage über den möglichen pathologischen Hörverlauf und Hinweise auf zukünftige vorbeugende Therapien geben um einer Fehlfunktion dieser Ionenkanäle zwischen Perilymphe und Endolymphe entgegenzuwirken. Hiermit wäre eine Prognose eines patientenspezifisches Risikopotentials möglich.

## Literatur/Quellenangaben

Chipman, J. K., Mally, A. und Edwards, G. O. (2003). Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity. *The Journal of Toxicological Sciences*, 71(2):146–153.  
 Ngezahayo, A., Zeilinger, C., Todt, I., Marten, I. und Kolb, H.-A. (1998). Inactivation of expressed and conducting rCx46 hemichannels by phosphorylation. *Pflügers Archiv*, 436(4):627–629.  
 Wang H., Stahl F., Scheper T., Steffens M., Warnecke A., Zeilinger C. (2019). Microarray-based screening system for the identification of temperature-dependent deactivation of Connexin 26 (in progress)