

1. Einleitung

1.1. Rho-GTPasen und ihre Stellung im Signaltransduktionsnetz der Zelle

Die kleinen GTPasen der Rho-Familie nehmen eine zentrale Stellung im Signaltransduktionsnetz der Zelle ein und sind an der Steuerung einer Vielzahl zellbiologischer Prozesse beteiligt. Drei Moleküle, die durch Madaule und Axel 1985 erstmals in der Seeschnecke *Aplysia* beschrieben und auf Grund ihrer Homologie zum *ras*-Onkogen als RhoA, RhoB und RhoC (für *ras homologous*) bezeichnet wurden (Madaule und Axel, 1985), bildeten die ersten Vertreter dieser Familie, die heute in Säugerzellen 22 Moleküle umfasst und deren Mitglieder mit etwa einem Prozent der Proteine, die durch das humane Genom kodiert werden, interagieren können (Übersicht bei Jaffe und Hall, 2005).

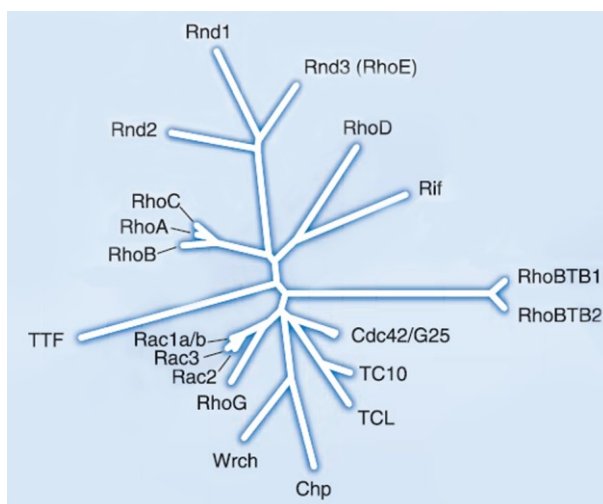


Abbildung 1.1: Rho-GTPasen in Säugerzellen.

Die Abbildung zeigt ein Dendrogramm der bisher in Säugerzellen identifizierten Rho-GTPasen, gegliedert nach dem Grad ihrer Sequenzhomologie. Splicevarianten sind durch einen Schrägstrich, alternative Nomenklaturen durch Klammern gekennzeichnet. Die atypischen mitochondrialen GTPasen Miro-1 und Miro-2 sind nicht berücksichtigt. Modifiziert nach Wherlock und Mellor, 2002.

Wie die anderen Mitglieder der *ras*-Superfamilie zeichnen sich die in Abbildung 1.1 dargestellten Rho-GTPasen dadurch aus, dass sie intrazellulär in zwei Aktivitätszuständen vorliegen können, die durch Bindung eines Guanosinnukleotids determiniert werden. So führt die Bindung von GTP zu einer Konformationsänderung dieser Moleküle, die eine Interaktion mit verschiedenen Effektorproteinen ermöglicht. Im GDP-gebundenen Zustand sind Rho-GTPasen hingegen inaktiv und nicht in der Lage, mit ihren Zielmolekülen zu interagieren. Die Rho-Aktivierung unterliegt dabei einer engen Kontrolle und kann in eukaryotischen Zellen durch mehr als 130 Proteine moduliert werden (Übersicht bei Etienne-Manneville und Hall, 2002). Hierzu gehören mit den GEFs (für *guanine nucleotide exchange factors*) eine Reihe prominenter

Onkogene, die den Austausch von GDP gegen GTP katalysieren und damit zu einer Aktivierung der GTPasen führen. Voraussetzung hierfür ist, wie in Abbildung 1.2. dargestellt, eine Translokation der Rho-Proteine an die Zellmembran, die durch eine posttranslationelle Lipidmodifikation vermittelt wird. Regulatorische Proteine der GDI-Familie (für *GDP dissociation inhibitors*) binden selektiv an derart posttranslationell modifizierte GTPasen und führen zu deren Sequestrierung im Zytoplasma, so dass die so gebundenen Proteine für den Aktivierungsprozess nicht unmittelbar zur Verfügung stehen. Zur Überwindung der GTPasen-Interaktion mit GDIs wird die Existenz spezifischer GDFs (für *GDI displacement factor*) postuliert; bislang konnte mit dem Neurotrophin-Rezeptor aber nur ein solches Molekül für die kleine GTPase RhoA identifiziert werden (Yamashita und Tohyama, 2003). Proteine der GAP-Gruppe (für *GTPase-activating proteins*) schließlich stimulieren die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-Moleküle und führen so zu deren Inaktivierung.

Als Folge des in Abbildung 1.2. dargestellten Aktivierungsmechanismus fungieren Rho-GTPasen innerhalb des zellulären Signaltransduktionsnetzes als molekulare Schalter (*molecular switches*), die die Aktivität einer Vielzahl nachgeschalteter Signalprozesse modulieren können. RhoA, Rac1 und Cdc42, die bislang am besten untersuchten Mitglieder der Rho-Familie, wurden dabei initial vor allem als Schlüsselproteine bei Regulation des Aktin-Zytoskeletts charakterisiert. So konnte in verschiedenen *in vitro* Modellsystemen gezeigt werden, dass die Aktivierung von RhoA zur Ausprägung spezialisierter kontraktile Zytoskelettstrukturen, sogenannter Stressfasern (*stress fibers*), sowie zur Bildung fokaler Adhäsionsplaques (*focal adhesions*) führt, die der Verbindung des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix dienen.

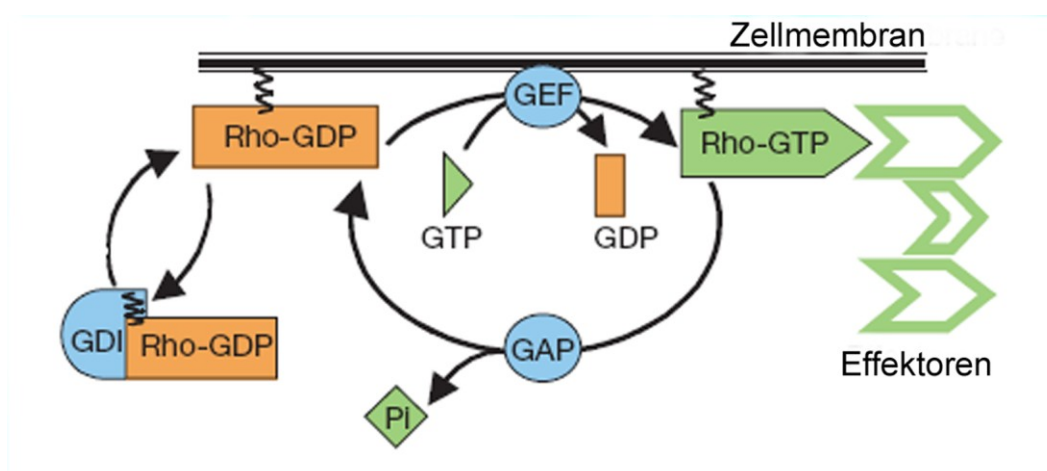


Abbildung 1.2: Regulation der Rho-Aktivierung durch GEFs, GAPs und Rho-GDI.

Modifiziert nach Etienne-Manneville und Hall, 2002.

Die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 ist in kultivierten Zellen hingegen mit der Ausbildung von Lamellipodien bzw. Filopodien, spezialisierten Ausstülpungen des Aktin-Zytoskeletts, assoziiert (Übersicht bei Kaibuchi *et al.*, 1999).

Neben diesen Effekten auf das Zytoskelett wurden in den letzten 20 Jahren zahlreiche weitere zellbiologische Prozesse beschrieben, die durch GTPasen der Rho-Familie reguliert werden und zu denen neben der Transkriptionskontrolle auch die Regulation der Zellteilung sowie die Steuerung von Membrantransportprozessen, Proliferation und Differenzierungsprozessen zählen (Übersicht bei Etienne-Manneville und Hall, 2002). Darüber hinaus spielen Rho-GTPasen eine wesentliche Rolle bei entwicklungsbiologischen Prozessen sowie bei der Etablierung der epithelialen Zellpolarisierung (Übersichten bei Settleman, 1999, sowie Van Aelst und Symons, 2002). Grundlage für diese Vielfalt zellbiologischer Prozesse, die durch die GTPasen der Rho-Familie reguliert werden, ist die Tatsache, dass für jedes dieser Moleküle eine große Anzahl potenzieller Effektoren existiert, die in Abhängigkeit von Expression und subzellulärer Lokalisation durch Rho-GTPasen aktiviert werden können und das Ablaufen verschiedener Signaltransduktionskaskaden unterhalb dieser Moleküle steuern. So vermittelt die Interaktion von RhoA mit Kinasen der ROCK/Rho-Kinase-Familie unter anderem zahlreiche Aspekte der beschriebenen Effekte auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Übersicht bei Riento und Ridley, 2003), während die Aktivierung der phylogenetisch verwandten Citron-Kinase durch RhoA den Ablauf der Zellteilung beeinflusst (Übersicht bei Madaule *et al.*, 2000). Rho-GTPasen bilden damit innerhalb des zellulären Signaltransduktionsnetzes nicht nur zentrale Konvergenzpunkte für eine Vielzahl übergeordneter Stimuli, sondern stellen gleichzeitig Divergenzpunkte dar, die die Aktivierung zahlreicher Signaltransduktionsprozesse unterhalb dieser Moleküle koordinieren (Abbildung 1.3).

Als Folge dieser zentralen Stellung im zellulären Signaltransduktionsnetz ist die Aktivierung von Rho-GTPasen mit einer Reihe pathologischer Zustände assoziiert. So findet sich im Rahmen zahlreicher humaner Malignomerkrankungen eine Überexpression dieser Proteine; darüber hinaus belegen umfangreiche *in vitro* und *in vivo* Studien eine Schlüsselrolle der Rho-GTPasen im Prozess der Metastasierung (Übersicht bei Sahai und Marshall, 2002). Weiterhin sind Mitglieder dieser Familie maßgeblich an der Pathogenese und Progression der arteriellen Hypertonie sowie zerebraler und koronarer Vasospasmen beteiligt und spielen eine wesentliche Rolle im Rahmen der Myokardhypertrophie und der endothelialen Dysfunktion (Übersicht bei Wettschureck und Offermanns, 2002). Damit bilden die kleinen GTPasen der Rho-Familie einen potenziell attraktiven pharmakologischen Ansatzpunkt zur Therapie zahlreicher Erkrankungen.

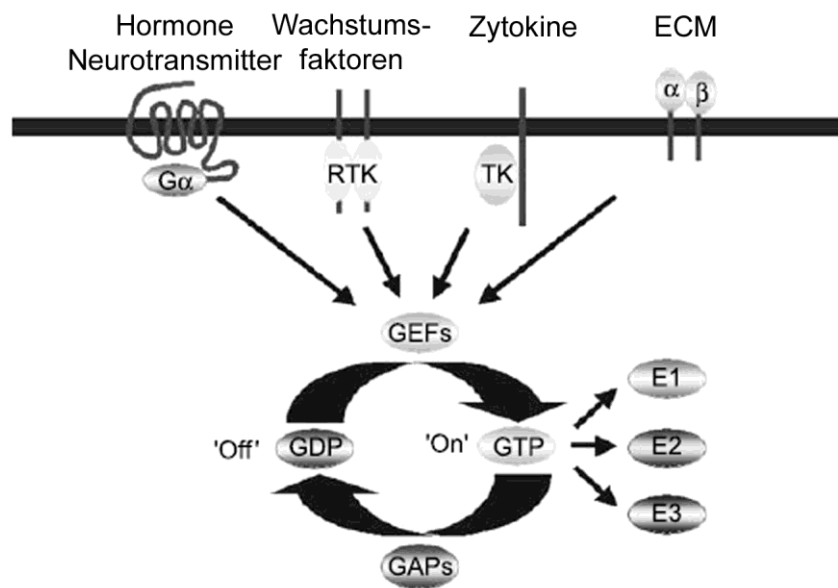


Abbildung 1.3: Rho-GTPasen als Konvergenz- und Divergenzpunkte im zellulären Signaltransduktionsnetz.

Extrazelluläre Signale führen über verschiedene Membranrezeptoren (von links nach rechts: G-Protein gekoppelter Rezeptor, Rezeptortyrosinkinase (RTK), tyrosinkinase-assoziiierter Rezeptor, Integrin) zur Aktivierung von Rho-Proteinen durch GEFs, die in einer Aktivierung verschiedener Effektorproteine (E1, E2, E3) resultiert. ECM: extrazelluläre Matrix. Modifiziert nach Karnoub *et al.*, 2004.

Eine Möglichkeit der pharmakologischen Interferenz mit der Rho-Aktivierung liegt im Einsatz von β -HMG-CoA-Reduktasehemmern, die durch ihren Einfluss auf den zellulären Lipidmetabolismus zu einer verminderten Isoprenylierung von Rho-GTPasen führen, so dass wie beschrieben eine Membrantranslokation dieser Proteine verhindert wird und eine Aktivierung nicht erfolgen kann. Dies wird als ein Teilmechanismus der bekannten pleiotropen Statinwirkung diskutiert, bei der sich positive Effekte auf die kardiovaskuläre Mortalität unabhängig vom Effekt auf den LDL-Cholesterinspiegel finden (Übersicht bei Rikitake und Liao, 2005). Die Beobachtung, dass es in großen randomisierten und kontrollierten Studien unter einer Therapie mit β -HMG-CoA-Reduktasehemmern zu einer verminderten Inzidenz kolorektaler und anderer Karzinome kam, wird ebenfalls teilweise auf deren inhibitorische Wirkung auf die Rho-Aktivierung zurückgeführt (Übersicht bei Demierre *et al.*, 2005).

Neuere pharmakologische Ansätze beschäftigen sich mit der gezielten Blockade einzelner Signaltransduktionswege unterhalb der Rho-GTPasen. Hier liegt mit Fasudil, einem selektiven Antagonisten der Rho-Kinase, eine erste Substanz vor, die in Japan bereits zur Prävention zerebraler Vasospasmen nach Subarachnoidalblutung zugelassen ist. Darüber hinaus liegen aus aktuellen klinischen Studien erste vielversprechende Ergebnisse zum Einsatz dieser Substanz bei

pulmonaler Hypertonie, stabiler Angina pectoris und hypertensiver Nephropathie vor (Vicari *et al.*, 2005, Ishikura *et al.*, 2006, Nishikimi und Matsuoka, 2006). Die gezielte Entwicklung weiterer Pharmaka, die selektiv mit einzelnen Aspekten der Rho-Aktivierung interferieren, wird jedoch dadurch erschwert, dass viele der Signaltransduktionswege unterhalb dieser Moleküle bislang nur unvollständig charakterisiert werden konnten, so dass die physiologischen Aufgaben zahlreicher Rho-Effektormoleküle bisher unbekannt sind. Im Folgenden soll mit der Serin/Threoninkinase PKN eines dieser Effektormoleküle vorgestellt werden, das im Zentrum dieser Arbeit steht.

1.2. Die Serin/Threoninkinase PKN als Rho-Effektormolekül

Die Entdeckung der Proteinkinase N geht auf Beobachtungen von Gabrielli und Mitarbeitern zurück, die bereits 1984 in Proteinextrakten aus Lebergewebe der Ratte eine Kinaseaktivität beschrieben, die nach Trypsinaktivierung zur Phosphorylierung des ribosomalen S6-Proteins führte und von den Autoren initial als proteaseaktivierte Kinase PAK-1 bezeichnet wurde (Gabrielli *et al.*, 1984). 1994 klonierten Mukai und Ono nach Durchmusterung einer cDNA-Bank aus humanem Hippocampusgewebe eine aus 942 Aminosäuren bestehende ubiquitär exprimierte Proteinkinase, deren katalytische Domäne eine deutliche Homologie zur Proteinkinase C aufwies, aminoterminal aber durch eine neuartige regulatorische Domäne gekennzeichnet war (Mukai und Ono, 1994). Die Autoren bezeichneten diese neu identifizierte Kinase als PKN, ein Akronym für *protein kinase novel*, deren Identität mit der durch Gabrielli beschriebenen PAK-1 später gezeigt werden konnte (Peng *et al.*, 1996). Untersuchungen aus verschiedenen Laboratorien etablierten dieses Molekül in den folgenden Jahren als ersten Vertreter einer neuen Proteinkinasefamilie, die neben verschiedenen Säugetierspezies auch im Frosch, der Taufliege *Drosophila* sowie im Seestern nachgewiesen werden konnte und bislang aus 3 Mitgliedern besteht (Übersicht bei Mukai, 2003). Auf Grund ihrer initialen Beschreibung durch verschiedene Forschergruppen existiert für die einzelnen Vertreter dieser Familie eine uneinheitliche Terminologie, in der synonym mit der Bezeichnung PKN auch die Namen PRK (für *protein kinase C related*) und Prkcl (für *protein kinase C like*) verwendet wird. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt die Bezeichnung der einzelnen PKN-Isoformen in Anlehnung an die Übersicht von Mukai als PKN(α), PKN β und PRK2/PKN γ (Mukai, 2003). Dabei handelt es sich bei PKN α und PRK2/PKN γ um ubiquitär exprimierte Moleküle, während PKN β bislang ausschließlich in Tumorzelllinien, nicht aber in adulten humanen Geweben nachgewiesen werden konnte (Oishi *et al.*, 1999). Die schematische Darstellung der verschiedenen PKN-

Isoformen in Abbildung 1.4 zeigt, dass all diesen Molekülen eine carboxyterminal lokalisierte Kinasedomäne mit ausgeprägter Homologie zur Proteinkinase C-Familie aufweisen. Aminoterminal hiervon finden sich als charakteristische Strukturelemente eine autoinhibitorische Domäne, die die basale katalytische Aktivität der Proteinkinase N hemmt (Yoshinaga *et al.*, 1999), sowie drei jeweils 70 Aminosäuren umfassende Abschnitte, deren Tertiärstruktur mit Hilfe der Röntgenkristallanalyse als antiparallele Superhelix zweier α -Helices charakterisiert wurde und die daher als ACC-Domänen (für *antiparallel coiled-coil*) bezeichnet werden (Maesaki *et al.*, 1999). RhoA, RhoB und RhoC sowie Rac1 können im aktivierten Zustand an spezifische Motive innerhalb dieser Domänen binden und eine Änderung der PKN-Konformation induzieren, die zu einer Stimulierung der Kinaseaktivität führt, wobei die genauen Mechanismen dieser Aktivierung bislang nicht vollständig geklärt werden konnten (Übersicht bei Mukai, 2003).

Zusätzlich zu den allen PKN-Isoformen gemeinsamen Strukturmotiven zeigen PKN β sowie PRK2/PKN γ prolinreiche Abschnitte, die die Konsensussequenz für die Bindung an die SH3-Domäne beinhalten und damit die Grundlage für die isoformspezifische Interaktion mit SH3-haltigen Proteinen wie NCK oder Grb4 bilden, wobei die funktionelle Relevanz dieser Wechselwirkungen bislang nicht geklärt werden konnte (Übersicht bei Mukai, 2003).

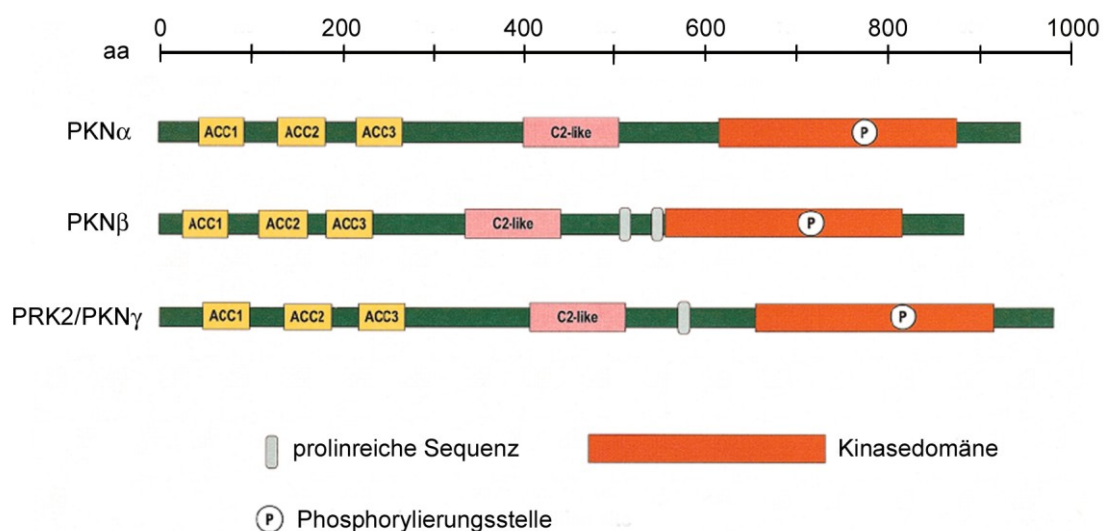


Abbildung 1.4: Struktur der humanen PKN-Isoformen.

Die mit „c2-like“ bezeichneten Domänen zeigen eine schwache Homologie zur C2-Domäne der Proteinkinase C ϵ und C η und enthalten in ihrem C-terminalen Abschnitt die autoinhibitorische Domäne. Die Skala im oberen Teil der Abbildung stellt einen Größenmaßstab mit Nummerierung der Aminosäuren dar. ACC: *antiparallel coiled-coil* Strukturen. Modifiziert nach Mukai, 2003.

Neben der beschriebenen Aktivierung durch kleine GTPasen der Rho-Familie kann die PKN-Kinaseaktivität auch durch ungesättigte Fettsäuren wie Arachidon- oder Linolensäure sowie durch Phospholipide wie Cardiolipin, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und Lysophosphatidylsäure stimuliert werden (Mukai *et al.*, 1994). Weiterhin wurde die Aktivierung der Proteinkinase N durch proteolytische Spaltung beschrieben, wodurch die Kinasedomäne von der regulatorischen Domäne getrennt wird und ein konstitutiv aktives Fragment entsteht. Dieser Vorgang kann *in vivo* als caspasevermittelter Prozess beobachtet werden (Takahashi *et al.*, 1998). Zahlreiche Hinweise deuten darüber hinaus darauf hin, dass die PKN-Kinaseaktivität durch eine PDK1-abhängige Phosphorylierung innerhalb der katalytischen Domäne stimuliert werden kann; der exakte Mechanismus dieser Aktivierung ist aber komplex und in seiner funktionellen Relevanz umstritten (Übersicht bei Mukai, 2003).

Die physiologische Funktion der einzelnen PKN-Isoformen konnte bislang nicht geklärt werden. Modelle zur *in vivo* Analyse wurden bislang nicht publiziert und auch *in vitro* existieren bislang nur wenige Studien in epithelialen Systemen. Hier zeigen die veröffentlichten Daten, dass die PKN-Aktivierung im Gegensatz zu den Rho-Effektormolekülen der ROCK/Rho-Kinase-Familie nicht zu offensichtlichen Veränderungen des Zytoskeletts wie der Formierung von Stressfasern oder fokalen Adhäsionsplaques führt (Mellor *et al.*, 1998), wohingegen eine Reihe von Hinweisen auf PKN-Effekte existieren, die unabhängig vom Aktin-Zytoskelett vermittelt werden. So inhibiert eine konstitutiv aktive RhoA-Punktmutante, deren Interaktion mit den Kinasen der PKN-Familie selektiv gestört ist, in murinen Keratinozyten die kalziuminduzierte Translokation des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin an die Zellmembran, während die RhoA-induzierte Ausprägung fokaler Adhäsionsplaques durch diese Mutation nicht gestört ist (Calautti *et al.*, 2002). Auch die Rho-Effekte auf die Regulation der Genexpression scheinen zumindest teilweise unabhängig von den Veränderungen des Zytoskeletts zu sein (Sahai *et al.*, 1998). Hier existieren aus verschiedenen experimentellen Systemen Hinweise auf eine Bedeutung der PKN-Kinasen. So konnte demonstriert werden, dass es nach Hitzeschockbehandlung *in vitro* zu einer Translokation der zytoplasmatisch lokalisierten PKN in den Zellkern kommt und die ektopische Expression einer konstitutiv aktiven PKN-Form die Transkription des Hitzeschockproteins α B-Crystallin stimuliert (Kitagawa *et al.*, 1998; Mukai *et al.*, 1996). In kultivierten Kardiomyozyten der Ratte wurde nach Transfizierung mit der konstitutiv aktivierten Proteinkinase N eine Steigerung der Expression des atrialen natriuretischen Faktors ANF beobachtet, die durch Stimulation eines *serum response elements* im ANF-Promotor vermittelt wurde (Morissette *et al.*, 2000). Weiterhin konnten Marinissen *et al.* die Existenz einer Signaltransduktionsachse zeigen, die über die Proteinkinase N und die MAP Kinase p38 γ RhoA mit der Aktivierung des

Transkriptionsfaktors c-jun verbindet (Marinissen *et al.*, 2001). Schließlich wurde *in vitro* die Interaktion zwischen PKN und den Transkriptionsfaktoren NDRF/NeuroD2 (Shibata *et al.*, 1999) und PCD17/CDR62 (Takanaga *et al.*, 1998) demonstriert und gezeigt, dass PKN die transkriptionelle Aktivität verschiedener Steroidrezeptoren modulieren und mit diesen *in vitro* interagieren kann (Metzger *et al.*, 2003). Trotz dieser Vielzahl an Hinweisen auf eine potenzielle Rolle der Proteinkinase N bei der Regulation der Genexpression konnten relevante Zielgene *in vivo* bislang nicht identifiziert werden.

Auch für eine mögliche Beteiligung der Proteinkinase N bei der Steuerung des Vesikeltransports existieren Anhaltspunkte aus verschiedenen Modellsystemen. So konnte sowohl in Neuronen des menschlichen Kortex als auch in kultivierten Fibroblasten ein Teil der PKN-Moleküle an der Membran vesikulärer Strukturen nachgewiesen werden; die Überexpression der endosomal lokalisierten kleinen GTPase RhoB führt darüber hinaus in Hek293-Zellen zu einer Rekrutierung der Proteinkinase N an das endosomale Kompartiment (Mellor *et al.*, 1998, Kawamata *et al.*, 1998). Auf eine mögliche funktionelle Bedeutung dieser Beobachtungen weisen Ergebnisse aus HeLa-Zellen hin, in denen der vesikuläre Transport des internalisierten EGF-Rezeptors nach Überexpression von RhoB verzögert wurde, wobei dieser Effekt durch gleichzeitige Expression einer dominant-negativen PKN-Mutante komplett antagonisiert werden konnte (Gampel *et al.*, 1999).

Weitere zelluläre Funktionen, für die Hinweise auf eine potenzielle Beteiligung PKN-abhängiger Signalprozesse vorliegen, beinhalten die Steuerung der Phospholipase D Aktivierung, der Glukoseaufnahme und der Zellteilung sowie die Phosphorylierung des Tau-Proteins im Rahmen der alzhaimerschen Erkrankung. Auch *in vitro* Interaktion mit einigen Proteinen des Zytoskeletts wurde beschrieben (Übersicht bei Mukai, 2003). Trotz dieser Vielzahl an Bindungspartnern *in vitro* bleibt die physiologische Funktion der Proteinkinase N und ihre Position im Signaltransduktionsnetz der Zelle weiter ungeklärt, da insbesondere keine geeigneten *in vivo* Modelle zu ihrem Studium existieren.

1.3. Die tight junction als Teil des apikalen Haftkomplexes

1.3.1. Struktur und Funktion des apikalen Haftkomplexes

Epitheliale Zellen weisen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* charakteristische Strukturen im Bereich ihrer apikalen Zellmembran auf, die der Verbindung benachbarter Epithelzellen dienen und bereits im 19. Jahrhundert als Schlussleisten beschrieben wurden. Mit Einführung der

Elektronenmikroskopie gelang es 1963 durch Farquhar und Palade, diese lichtmikroskopische Struktur in einen Komplex verschiedener Substrukturen aufzulösen, die in Abbildung 1.5. dargestellt sind (Farquhar und Palade, 1963).

Hierbei finden sich basal fleckförmig verteilte Desmosomen, die auch als *Maculae adherentes* bezeichnet werden und auf ihrer zytoplasmatischen Seite als Ansatzpunkte für die Intermediärfilamente des Zytoskeletts dienen, während die Verbindung mit der benachbarten Zelle über Transmembranproteine aus der Gruppe der desmosomalen Cadherine hergestellt wird (Übersicht bei Green und Jones, 1996). Apikal hiervon befinden sich mit den adherens junctions, auch als *Zonulae adhaerentes* oder Gürteldesmosomen bezeichnet, zirkuläre Strukturen, die benachbarte Epithelzellen über die extrazellulären Domänen des Transmembranproteins E-Cadherin verbinden und auf ihrer zytoplasmatischen Seite einen Komplex verschiedener Adapterproteine aufweisen, die eine dynamische Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett vermitteln (Drees *et al.*, 2005).

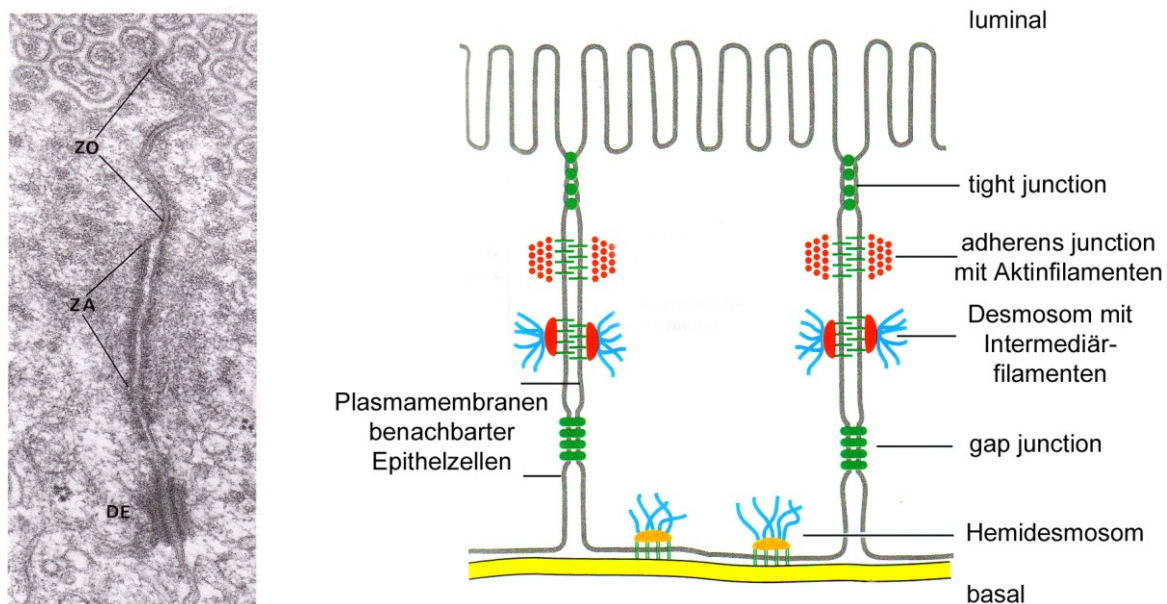


Abbildung 1.5: Struktur des apikalen Haftkomplexes.

Die linke Seite zeigt die elektronenmikroskopische Darstellung des apikalen Haftkomplexes zwischen zwei benachbarten Epithelzellen des Dickdarms in 80000facher Vergrößerung. ZO: *Zonula occludens*, ZA: *Zonula adhaerens*, DE: Desmosom. Aus Junqueira und Carneiro, 1996.

Die rechte Seite zeigt die schematische Darstellung des apikalen Haftkomplexes zwischen benachbarten Epithelzellen; Aktinfilamente sind rot, Intermediärfilamente blau dargestellt. Die basal lokalisierten gap junctions dienen der interzellulären Kommunikation und sind nicht Bestandteil des apikalen Haftkomplexes im engeren Sinne. Modifiziert nach Alberts *et al.*, 2004.

Während beide dieser Strukturen vor allem dem mechanischen Zusammenhalt benachbarter Epithelzellen dienen und ebenfalls eine wichtige Rolle in Signaltransduktionsprozessen spielen, versiegeln die am apikalen Pol des interzellulären Haftkomplexes lokalisierten tight junctions oder *Zonulae occludentes* den Interzellulärraum gegenüber dem extrazellulären Milieu und fungieren damit als Barriere, die das epitheliale Kompartiment vom Interstitium trennt. Als Folge dieser Barriere kommt es im Bereich abgeschlossener tight junctions zu einer Unterbindung des parazellulären Stofftransports, so dass wie im Tubulussystem der Niere hohe Konzentrationsunterschiede für bestimmte Substanzen und Ionen über die Zellmembran aufgebaut werden können. Die Durchlässigkeit der *Zonulae occludentes* variiert dabei zwischen verschiedenen Geweben erheblich und ist auch innerhalb eines Gewebes nicht statisch, sondern einer dynamischen Regulation unterworfen (Übersicht bei Schneeberger und Lynch, 2004).

Neben dieser als *gate function* bezeichneten Rolle in der Regulation des parazellulären Transports schränken die *Zonulae occludentes* ebenfalls die Diffusion von Proteinen innerhalb der Lipiddoppelschicht der Zellmembran ein und ermöglichen so durch diese als *fence function* bezeichnete Eigenschaft die räumliche Trennung apikaler und basaler Ionentransporter, die eine integrale Voraussetzung für zahlreiche Funktionen polarisierter Epithelien darstellt. Darüber hinaus konnten neuere Beobachtungen demonstrieren, dass zahlreiche Proteine, die auf der zytoplasmatischen Seite der tight junction Plaques lokalisiert sind, eine wesentliche Rolle bei der Regulierung der Gentranskription, der Tumorsuppression sowie der Steuerung der Zellproliferation spielen, so dass die *Zonulae occludentes* neben ihrer Barrierefunktion auch der Integration und Koordination zahlreicher Signaltransduktionsprozesse dienen (Übersicht bei Schneeberger und Lynch, 2004). Im folgenden Abschnitt soll ein kurzer Überblick über den molekularen Aufbau dieser Strukturen gegeben werden.

1.3.2. Molekulare Architektur der tight junctions

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie stellen sich die *Zonulae occludentes* als Reihe scheinbarer Membranfusionen zwischen benachbarten Epithelzellen dar, die im angloamerikanischen Schrifttum als *kissing points* beschrieben werden und in deren Bereich der Interzellulärraum vollständig verschlossen erscheint. Die Analyse von Gefrierbruchpräparaten zeigt, dass es sich bei diesen Strukturen um ein Netzwerk anastomosierender Stränge handelt, das sich innerhalb der Lipiddoppelschicht der Zellmembran befindet, wobei die Assoziation solcher Stränge zwischen benachbarten Zellen wie in Abbildung 1.6 gezeigt zur Versiegelung des Interzellulärraums führt (Übersicht bei Schneeberger und Lynch, 1992).

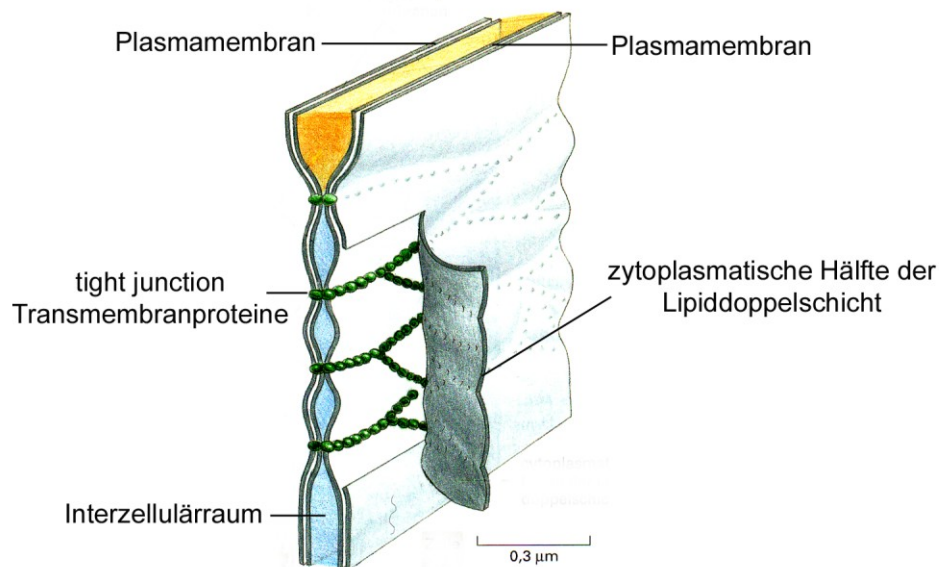


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der tight junction Struktur.

Modifiziert nach Alberts *et al.*, 2004.

Die Aufklärung der molekularen Struktur der *Zonulae occludentes* begann 1993 mit der Entdeckung des Occludins, eines integralen Membranproteins mit einem Molekulargewicht von 60 kDa, welches elektronenmikroskopisch im Bereich epithelialer tight junctions lokalisiert werden konnte (Furuse *et al.*, 1993). Überexpression dieses Proteins in kultivierten Zellen resultierte in einem Anstieg des transepithelialen Widerstands, so dass diesem Molekül initial eine wesentliche Rolle bei der Formierung funktioneller tight junctions zugeschrieben wurde (Übersicht bei Feldman *et al.*, 2005). Die Analyse occludindefizienter Stammzellen zeigte aber, dass die Ausbildung intakter tight junction Strukturen auch in Abwesenheit dieses Moleküls möglich ist (Saitou *et al.*, 1998), so dass die präzise Rolle, die Occludin für die Funktion der *Zonulae occludentes* spielt, bislang ungeklärt bleibt.

1998 erfolgte dann mit der Isolierung von Claudin 1 und 2 die Entdeckung einer neuen Proteinfamilie, die sich im Folgenden als wesentliches Strukturelement der *Zonulae occludentes* herausstellen sollte. Diese in menschlichen Zellen bislang 24 Mitglieder umfassende Familie der Claudine besteht aus Proteinen mit vier Transmembrandomänen, deren amino- und carboxyterminale Enden zytoplasmatisch lokalisiert sind und deren extrazellulären Domänen eine Verbindung zwischen benachbarten Epithelzellen herstellen. Hierbei liegen innerhalb der tight junction Stränge verschiedene Claudine in Form von Heteropolymeren vor, die in homotypischer Bindung mit identischen Claudinen benachbarter Zellen interagieren, aber auch heterotypische Wechselwirkungen mit anderen Mitgliedern dieser Familie eingehen können, so

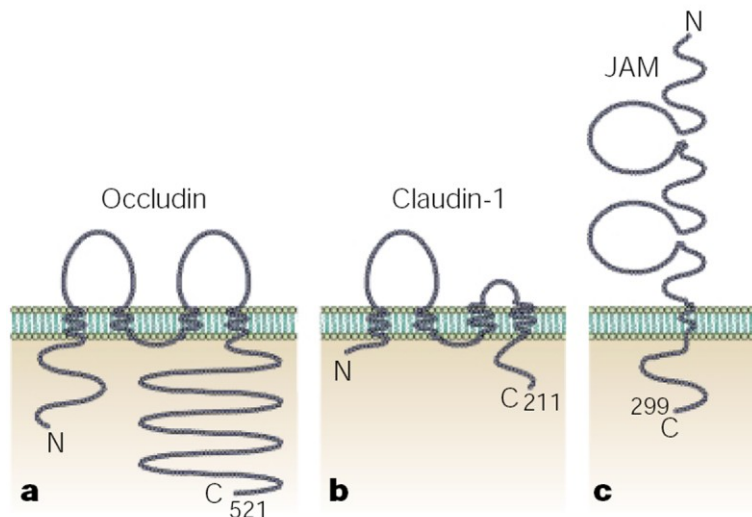


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der bislang identifizierten tight junction Transmembranproteine.

Die Buchstaben N und C bezeichnen den amino- bzw. carboxyterminalen Abschnitt der jeweiligen Moleküle, deren Größe durch Angabe der Aminosäureanzahl dargestellt ist.

Aus Tsukita *et al.*, 2001

dass eine Vielzahl potenzieller Interaktionen existieren, die für die beobachteten Permeabilitätsunterschiede zwischen den tight junctions verschiedener Gewebe verantwortlich sind (Übersichten bei Turksen und Troy, 2004).

Schließlich wurden mit den Proteinen der JAM-Familie (für *junctional adhesion molecule*) eine dritte Gruppe von Transmembranproteinen identifiziert, die mit epithelialen und endothelialen *Zonulae occludentes* assoziiert sind und eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Leukozytentransmigration spielen (Übersicht bei Mandell und Parkos, 2005). Diese in Abbildung 1.7 schematisch dargestellten Transmembranproteine binden auf ihrer zytoplasmatischen Seite an eine Reihe von Struktur- und Signalproteinen, zu denen neben den initial identifizierten Adapterproteinen der MAGUK-Gruppe wie ZO-1, ZO-2 und ZO-3 auch zahlreiche Transkriptionsfaktoren sowie mit GEF-H1 ebenfalls ein Rho aktivierendes Protein gehören. In den sogenannten tight junction Plaques werden so komplexe Proteincluster konstituiert, die neben der Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett wie bereits beschrieben auch an der Regulation zahlreicher Signaltransduktionsprozesse beteiligt sind (Übersicht bei Schneeberger und Lynch, 2004).

Während sich damit innerhalb der letzten zehn Jahre das Wissen über die molekulare tight junction Architektur bedeutend vergrößert hat, bleiben die Signalprozesse, die die Formierung und Funktionalität dieser Strukturen steuern, zum großen Teil weiter unverstanden. Insbesondere

die Mechanismen, über die durch die Expression spezifischer Claudine die parazelluläre Permeabilität reguliert wird, konnten bislang nicht vollständig geklärt werden. Dabei ist das Verständnis dieser Prozesse nicht ausschließlich von akademischem Interesse, da die gezielte Manipulation der tight junction Permeabilität beispielsweise die Entwicklung pharmakologischer Strategien zur Modulation der hochgradig impermeablen *Zonulae occludentes* im Bereich der Blut-Hirn-Schranke ermöglichen könnte, um die ZNS-Gängigkeit zahlreicher Medikamente zu verbessern. Störungen der parazellulären Permeabilität sind darüber hinaus neben ihrer Schlüsselrolle in Rahmen des septischen Geschehens mit einer Reihe von Erkrankungen assoziiert, zu denen neben der diabetischen Retinopathie und der Zöliakie auch die Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zählt (Übersichten bei Harhaj und Antonetti, 2004; Mullin *et al.*, 2005).

Obwohl ein Großteil der Erkenntnisse über den molekularen Aufbau der *Zonulae occludentes* in Zellkultursystemen gewonnen wurde, ist die Analyse der tight junction Funktionalität *in vivo* für das Verständnis dieser Strukturen von unverzichtbarem Wert. Dabei hat sich die murine Brustdrüse als attraktives Modellsystem erwiesen, da sich hier Veränderungen der tight junction Permeabilität in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium in ihrem biologischen Kontext studieren lassen. Im Folgenden soll daher der Entwicklungszyklus der murinen Brustdrüse und dessen Bedeutung als zellbiologisches Modellsystem im Überblick dargestellt werden.

1.4. Die murine Brustdrüse als Modellsystem in der Entwicklungs- und Zellbiologie

Die murine Brustdrüse stellt ein wertvolles Modellsystem zur Untersuchung zell- und entwicklungsbiologischer Prozesse *in vivo* dar (Medina, 1996). Eine der Ursachen hierfür ist die Tatsache, dass sich ein Großteil der Entwicklungsprozesse in der Brustdrüse während der postnatalen Lebensphase vollzieht und daher der Analyse und experimentellen Manipulation in weitaus besserem Maße zugänglich ist als in den meisten anderen Organen. Eine Vielzahl zellbiologischer Prozesse, deren Zusammenspiel für das koordinierte Ablaufen des komplexen Entwicklungszyklus aus Trächtigkeit, Laktation und Involution erforderlich ist, kann so in einem physiologischen Kontext studiert und mit morphologischen Veränderungen korreliert werden, wobei ein zusätzlicher Vorteil in der einfachen Induzierbarkeit dieser Prozesse im Versuchstier besteht. Fortschritte auf dem Gebiet der Molekularbiologie und die zunehmende Verbreitung transgener Technologien haben es darüber hinaus ermöglicht, eine Reihe von Signaltransduktionsprozessen und ihre Bedeutung für die Entwicklungsbiologie der Brustdrüse in einem *in vivo* Kontext zu studieren. Hierbei hat sich vor allem der Einsatz

brustdrüsenpezifischer Promotoren bewährt, mit deren Hilfe einzelne Gene gezielt in diesem Organ überexprimiert oder bei Verwendung konditioneller knock-out-Techniken auch deletiert werden können. Der Einsatz von Transplantationstechniken, mit Hilfe derer die epithelialen Anlagen und das stromale Kompartiment aus Mäusen, die in verschiedener Weise genetisch modifiziert wurden, kombiniert werden können, erlaubt darüber hinaus das gezielte Studium der Wechselwirkungen zwischen Brustdrüsenepithel und –stroma (Übersicht bei Hennighausen und Robinson, 2001).

Im Folgenden sollen die einzelnen Phasen der murinen Brustdrüsenentwicklung und einzelne Faktoren, die diese regulieren, im Überblick dargestellt werden.

1.4.1. Der Entwicklungszyklus der murinen Brustdrüse

Unmittelbar nach der Geburt finden sich in der Maus im Bereich der späteren Brustdrüsen rudimentäre Epithelanlagen, die in einen Fettkörper eingebettet sind und bis zum Beginn der Pubertät nur geringfügige Veränderungen zeigen. Zu diesem Zeitpunkt besteht das Mammaparenchym lediglich aus einem gering entwickelten System epithelialer Zellen, die in einer einzelnen Schicht das spätere Lumen der Milchgänge begrenzen und von einem Netzwerk myoepithelialer Zellen umgeben sind. Mit dem Einsetzen der zyklischen Gonadotropinsekretion beginnt im Alter von etwa drei Wochen das Auswachsen des Milchgangsystems in den Fettkörper. Hierbei entwickeln sich, wie in Abbildung 1.8 schematisch dargestellt, unter dem Einfluss von Östrogen sogenannte terminale Endknospen, die in ihrer äußeren Schicht aus einer Gruppe undifferenzierter pluripotenter Stammzellen bestehen, die durch komplexe Interaktionen mit dem Brustdrüsenstroma die Invasion des Milchgangssystems in das Brustdrüsenstroma vermitteln und ebenfalls Ursprung der Milchgangverzweigungen sind. In ihren inneren Schichten bestehen diese terminalen Endknospen aus proliferierenden Mammaepithelzellen, die nach Beendigung der Wachstumsphase das Milchgangepithel bilden. Erreicht das Milchgangsystem die Grenzen des Fettkörpers, kommt es zur Regression der terminalen Endknospen, so dass im Alter von 10-12 Wochen der gesamte Brustdrüsenfettkörper von einem baumartig verzweigten Milchgangsystem ausgefüllt wird. Lateral der Milchgänge finden sich in virginen postpubertären Tieren abhängig vom genetischen Hintergrund ebenfalls bereits alveoläre Knospen, deren Ausprägung durch Progesteron induziert wird und damit Schwankungen im Verlauf des Menstruationszyklus unterliegt.

Mit dem Eintreten einer Trächtigkeit kommt es unter dem Einfluss des jetzt vermehrt sezernierten Progesteron zur massiven Proliferation dieser alveolären Knospen, die sich im

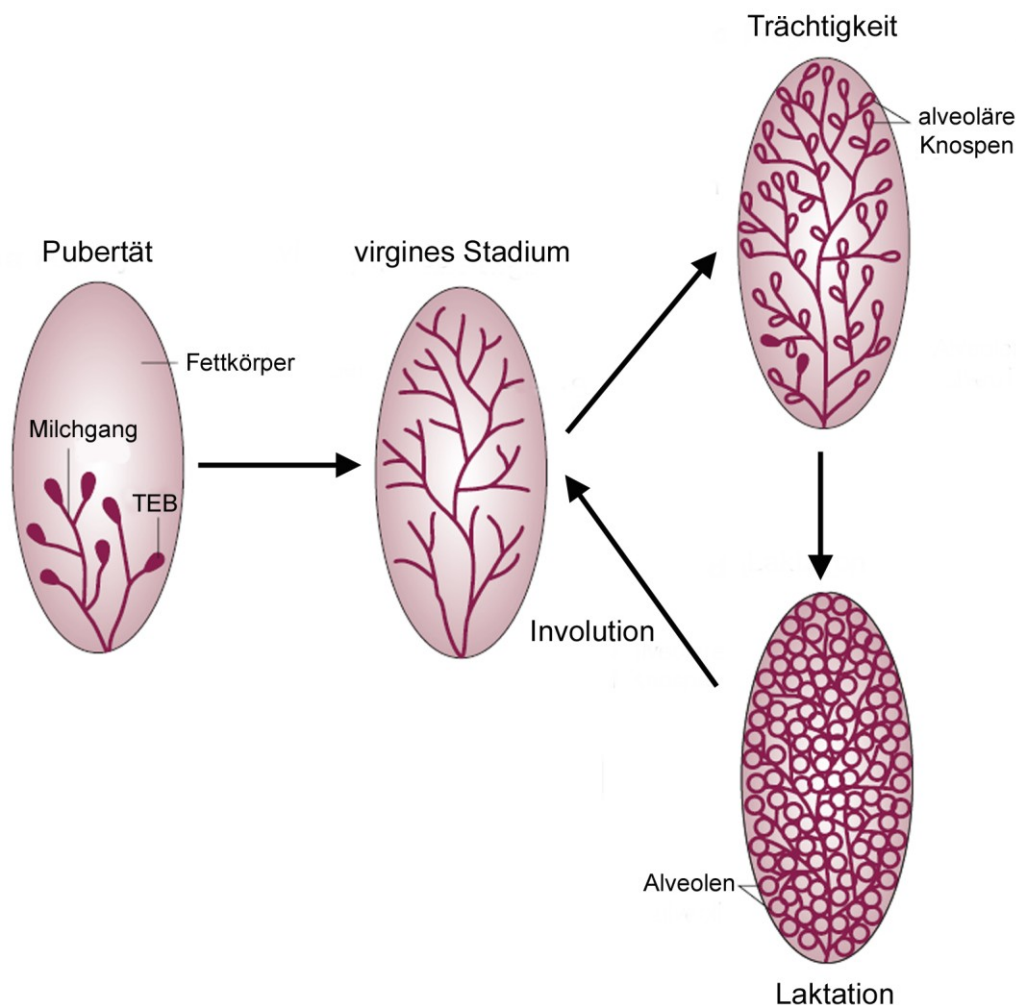


Abbildung 1.8: Entwicklungszyklus der Brustdrüse, schematische Darstellung.

TEB: Terminale Endknospe. Modifiziert nach Hennighausen und Robinson, 2005.

Verlauf der 21tägigen Trächtigkeit zu Alveolen, den milchproduzierenden Einheiten, differenzieren. In dieser Entwicklungsphase findet sich eine zunehmende Verdrängung des stromalen Fettgewebes durch das expandierende Mammaparenchym; innerhalb alveolärer Epithelzellen kommt zur Vermehrung des rauhen endoplasmatischen Retikulums sowie zur Expansion des Golgi-Apparats. Während dieser späten Phase der Trächtigkeit, die auch als Phase der lobuloalveolären Entwicklung bezeichnet wird, beginnt die Expression von Milchproteinen sowie die Synthese der Milchlipide, so dass sich in histologischen Brustdrüsenpräparaten dieses Entwicklungsstadium regelmäßig große intrazelluläre Vesikel finden, die mit Milchlipiden gefüllt sind (Übersicht bei Richert *et al.*, 2000).

Mit der Geburt der Jungtiere erfolgt schließlich der Übergang in die Phase der Laktation, während der es histologisch zur Expansion der alveolären Lumina mit Abflachung der während der Trächtigkeit zylindrischen Mammaepithelzellen sowie zur weiteren Verdrängung des stromalen Fettgewebes kommt. Nach Abschluss der etwa dreiwöchigen Laktationsphase durchläuft die Brustdrüse mit der Involution einen Prozess der Rückbildung, der durch die verminderte Entleerung der Alveolen mit konsekutiver Milchakkumulation induziert wird, nachdem die Jungtiere ihre Ernährung umgestellt haben (Übersicht bei Wilde *et al.*, 1999). Auf molekularer Ebene ist der Prozess der Involution durch einen zweiphasigen Verlauf gekennzeichnet, bei dem es zunächst zu einem massiven Anstieg der Apoptoseinzidenz kommt, der durch die verstärkte Expression zahlreicher Akutphasenproteine und proapoptotischer Faktoren gekennzeichnet ist (Übersicht bei Furth *et al.*, 1997). Wesentliche Erkenntnisse über die Regulation dieses Prozesses stammen aus Untersuchungen im *teat sealing* Modell, in dem der Ausführungsgang nur einer Brustdrüse im laktierenden Versuchstier versiegelt wird, während die anderen Brustdrüsen des Tieres nicht manipuliert werden. Im Verlauf der Laktation kann dann in der versiegelten Brustdrüse die Induktion des programmierten Zelltods beobachtet werden, während die anderen Brustdrüsen ihre Differenzierung vollständig erhalten (Li *et al.*, 1997). Dies zeigt, dass die initiale Phase der Involution ausschließlich durch lokale Faktoren innerhalb der Brustdrüse kontrolliert wird und unabhängig von Veränderungen der systemischen Hormonspiegel ist, wobei hier insbesondere die frühzeitige Induktion des Zytokins TGF β 3 sowie des IGF-bindenden Proteins IGFBP5 eine Rolle zu spielen scheinen (Nguyen und Pollard, 2000, Tonner *et al.*, 1997). In der zweiten Phase der Involution kommt es zur verstärkten Expression verschiedener Proteasen, die in einem lipomatösen Umbau der Drüse resultiert, so dass am Ende dieses Entwicklungszyklus ein Zustand erreicht wird, der auf morphologischer Ebene der postpubertären virginen Brustdrüse ähnelt (Lund *et al.*, 1996).

1.4.2. Regulation der tight junction Permeabilität in der Brustdrüse

Die Initiierung der Laktation ist auf molekularer Ebene durch eine Reihe tiefgreifender Veränderung in Struktur und Metabolismus der Mammaepithelzelle gekennzeichnet, die unter dem Begriff der sekretorischen Aktivierung oder Laktogenese zusammengefasst werden (Übersicht bei Neville *et al.*, 2001). Eine besondere Rolle spielt hierbei die Versiegelung der tight junctions zwischen benachbarten Mammaepithelzellen. So konnte in verschiedenen Spezies gezeigt werden, dass sich das Brustdrüsenepithel während der Phase der Trächtigkeit durch eine hohe parazelluläre Permeabilität auszeichnet, die auch die Passage hochmolekularer Substanzen

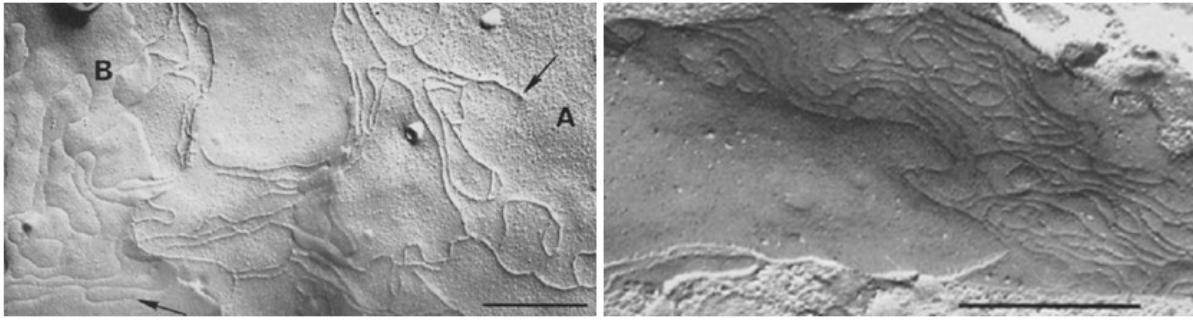


Abbildung 1.9: Gefrierbruchanalyse der tight junction Morphologie in Brustdrüsenpräparaten trächtiger (links) und laktierender (rechts) Mäuse, 41000fache Vergrößerung.

Während der Trächtigkeit zeigen sich desorganisierte tight junction Stränge in Form von Erhebungen auf der protoplasmatischen (A) bzw. korrespondierenden Einfaltungen auf der exoplasmatischen Membranseite (B), die häufig blind enden (Pfeil). Im Gegensatz hierzu stellt sich während der Laktation ein komplex organisiertes Netzwerk parallel verlaufender tight junction Stränge mit ausgeprägten Anastomosen dar. Aus Pitelka *et al.*, 1973; die abgebildeten Größenmaßstäbe entsprechen 500 nm.

gestattet. Mit Beginn der Laktation kommt es zu einer hochsignifikanten Abnahme dieser Permeabilität, so dass eine funktionelle Barriere zwischen dem Milchkompartiment und dem Interstitium ausgebildet wird (Übersicht bei Nguyen und Neville, 1998). Pitelka und Mitarbeiter konnten bereits 1973 demonstrieren, dass diese Reduktion der parazellulären Permeabilität auf ultrastruktureller Ebene von charakteristischen Veränderung der tight junction Architektur begleitet wird, die sich aber, wie in Abbildung 1.9 dargestellt, lediglich in der Analyse von Gefrierbruchpräparaten nachweisen lassen, während sich transmissionselektronenmikroskopisch keine Veränderungen dieser Strukturen zeigt (Pitelka *et al.*, 1973). Interessanterweise finden sich auch in der immunhistochemischen Verteilung der tight junction assoziierten Proteine Occludin und ZO-1 keine Unterschiede zwischen trächtigen und laktierenden Versuchstieren, so dass diskretere Änderungen der molekularen tight junction Architektur für die beobachtete Reduktion der parazellulären Permeabilität verantwortlich zu sein scheinen (Nguyen und Neville, 1998). Die molekularen Hintergründe dieses Phänomens bleiben aber bislang ungeklärt, da insbesondere die Rolle, die die verschiedenen Vertreter der Claudin-Familie bei der Regulation der parazellulären Permeabilität in der Brustdrüse spielen, unbekannt ist.

1.5. Ziele und Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit

Wie beschrieben, sind die kleinen GTPasen der Rho-Familie an der Regulation einer Vielzahl zellbiologischer Prozesse beteiligt und stellen potentiell attraktive Ansatzpunkte zur Pharmakotherapie zahlreicher Erkrankungen dar. Hierbei bildet die Entschlüsselung der Signaltransduktionskaskaden, die durch diese Proteine aktiviert werden, eine Voraussetzung zur gezielten Modulation Rho-vermittelter Prozesse. Mit der funktionellen Charakterisierung des Rho-Effektormoleküls PKN soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis dieses Signaltransduktionsweges leisten.

Aufgabe dieser Arbeit war dabei zunächst die Grundcharakterisierung eines transgenen Mausmodells, das zum Studium der PKN Funktion am Institut für Pharmakologie der Charité Universitätsmedizin Berlin entwickelt wurde. In diesem Modell wurde eine durch Deletion der aminoterminal lokalisierten regulatorischen Domäne konstitutiv aktivierte Form der Proteinkinase N durch die Promotorsequenz des MMT-Virus gerichtet im murinen Mammaepithel exprimiert, um die Funktion dieses Moleküls im biologischen Modellsystem der murinen Brustdrüse unabhängig von übergeordneten Signalen analysieren zu können (Stuckas, 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst geklärt werden, ob dieses Tiermodell zur funktionellen Charakterisierung der Proteinkinase N in einem *in vivo* Kontext geeignet ist. Hierzu wurde neben der Analyse der Transgenintegration in den bereits generierten Tieren die Expression der konstitutiv aktivierten Proteinkinase N auf RNA- und Proteinebene und deren Veränderung während der verschiedenen Entwicklungsstadien der murinen Brustdrüse untersucht. Weiterhin erfolgte eine Analyse der räumlichen Verteilung der Transgenexpression innerhalb der Brustdrüse sowie die Untersuchung weiterer Gewebe auf Expression der konstitutiv aktivierten Proteinkinase N.

Im Anschluss daran erfolgte die phänotypische Charakterisierung des beschriebenen Tiermodells. Neben Untersuchungen zur Brustdrüsenfunktionalität stand hierbei zunächst die Analyse morphologischer Veränderungen auf konventionell-histologischer sowie ultrastruktureller Ebene im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit, die durch Untersuchungen verschiedener Differenzierungsmarker ergänzt wurden. Ausgehend von den erhobenen Befunden wurde die Hypothese einer beeinträchtigten tight junction Funktion in den transgenen Tieren aufgestellt und gezielt *in vivo* sowie in einem *in vitro* Modell geprüft. Zusammenfassend sollte die vorliegende Arbeit damit eine erste funktionelle Charakterisierung der Proteinkinase N *in vivo* liefern und die Grundlage für weiterführende Untersuchungen schaffen.