

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung und Grundcharakterisierung der transgenen Linien

3.1.1. Etablierung transgener Linien und Analyse der Transgenintegration

Zur *in vivo* Charakterisierung des RhoA-Effektormoleküls PKN stand im Institut für Pharmakologie der Charité Universitätsmedizin Berlin ein transgenes Mausmodell zur Verfügung (Stuckas, 2003). Abbildung 3.1 zeigt schematisch die Struktur des zur Generierung dieser Tiere verwendeten Transgenkonstrukts sowie die Lage der für die weitere Analyse genutzten Primer und Sonden.

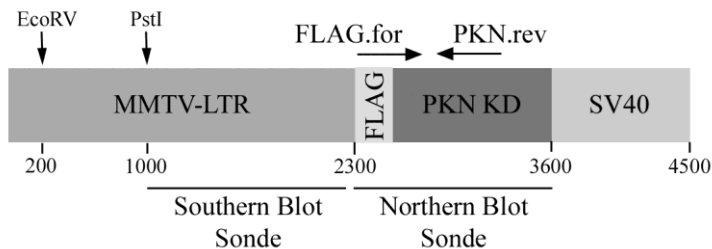


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Transgenkonstrukts. Die Lage der verwendeten Primer und Sonden sowie wesentliche Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind gekennzeichnet. Zur besseren Übersicht ist die Sequenz des FLAG-Epitops (18 Basenpaare) nicht maßstabsgerecht dargestellt. PKN KD: Kinasedomäne der humanen Proteinkinase N. SV40: Kleines Intron und Polyadenylierungssignal des SV40-Virus. Alle Größenangaben in Basenpaaren.

Durch Mikroinjektion des DNA-Konstrukts generierte transgene Tiere wurden mit Wildtyp-NMRI-Mäusen verpaart und bildeten die Grundlage für die Etablierung der transgenen Linien 921, 924, 931, 933, 995 und 2501. Die Weitergabe des Transgens folgte dabei den mendelschen Gesetzen. Zur Identifizierung transgener Tiere wurde DNA aus Schwanzbiopsien gewonnen und in einer PCR unter Einsatz der Primer FLAG.for und PKN.rev analysiert. Die Sequenz des Primers FLAG.for stammt aus dem FLAG-Epitop des Transgenkonstrukts und besitzt im murinen Genom keine Entsprechung, so dass diese Reaktion in transgenen Tieren ein DNA-Fragment von 508 Basenpaaren amplifiziert, während Wildtypiere kein PCR-Produkt zeigen. Ein repräsentatives Beispiel einer solchen Genotypisierung zeigt Abbildung 3.2.

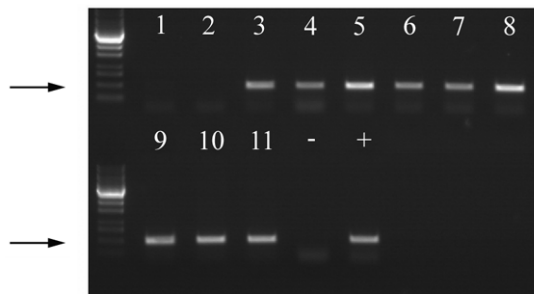


Abbildung 3.2: PCR Analyse zur Identifizierung transgener Tiere. DNA von Jungtieren einer Verpaarung zweier transgener Mäuse wurde durch eine PCR unter Verwendung der Primer FLAG.for und PKN.rev analysiert. Tiere, deren DNA in den Spuren 1 und 2 aufgetragen wurde, zeigen keine Integration des Transgens; in den DNA Proben der Spuren 3-11 konnte hingegen ein transgen-spezifisches Amplifikat nachgewiesen

Spur 12 enthält Wasser als Negativkontrolle (-); in Spur 13 wurde als Positivkontrolle das Transgenkonstrukt aufgetragen (+). Die Pfeile kennzeichnen das spezifische Amplifikat.

Die Transgenintegration wurde in Tieren der F1-Generation weiterhin durch Southern Blot Hybridisierung untersucht. Dieses Verfahren gestattet neben dem Nachweis des Transgens auch die Detektion einer eventuellen Mehrfachintegration an verschiedenen Positionen des murinen Genoms, die durch unabhängige Weitergabe der einzelnen Integrationsloci zu phänotypischen Inhomogenitäten innerhalb der einzelnen Linien führen kann. Zur Southern Blot Analyse wurde genomische DNA aus Lebergewebe von Tieren der F1-Generation mit der Restriktionsendonuklease EcoRV gespalten und mit einer transgenspezifischen Sonde aus der Sequenz des MMTV-LTR-Promotors hybridisiert. Die Größe der so detektierten Fragmente ist unter anderem vom Integrationsort des Transgens abhängig und kann zur Analyse des Integrationsmusters genutzt werden. Auch mit dieser Methode wurde die Anwesenheit des Transgens in allen zur weiteren Analyse verwendeten Linien nachgewiesen; Hinweise auf eine Mehrfachintegration an verschiedenen Positionen des murinen Genoms ergaben sich nicht. Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch die Southern Blot Analyse transgener Tiere der Linie 933.

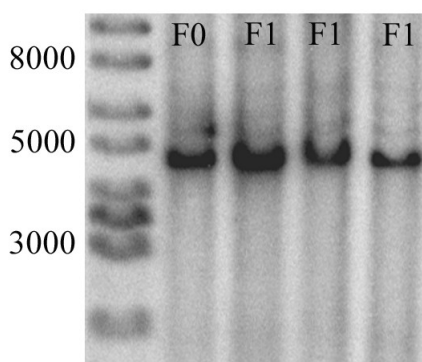


Abbildung 3.3: Southern Blot Analyse der Transgenintegration in Linie 933.

DNA des Founder-Tieres (F0) sowie dreier Tiere der F1-Generation (F1) wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer Sonde gegen die Sequenz des MMTV-LTR Promotors hybridisiert. Die Abbildung zeigt eine singuläre Bande von zirka 4700 Basenpaaren in allen Tieren. In der linken Spur befindet sich ein Größenmarker. Alle Größenangaben in Basenpaaren.

3.1.2. Analyse der Transgenexpression auf RNA Ebene

3.1.2.1. Identifizierung transgenexprimierender Linien

Zur Untersuchung der Transgenexpression in den etablierten Linien wurde RNA aus Brustdrüsengewebe laktierender Tiere gewonnen, da die Expressionsstärke des MMTV-Promotors in der Phase der Laktation am höchsten ist (Wagner *et al.*, 2001). Nach reverser Transkription in cDNA erfolgte die Expressionsanalyse durch eine PCR unter Verwendung der Primer FLAG.for und PKN.rev, die wie beschrieben ein transgenspezifisches Fragment von 508 Basenpaaren amplifizieren. Abbildung 3.4 zeigt, dass so Transkripte der konstitutiv aktiven Proteinkinase N in Tieren der Linien 933 und 995 nachgewiesen werden konnten; Tiere der übrigen Linien exprimierten das Transgen nicht. Zur Kontrolle der reversen Transkription wurde ein Fragment des ubiquitär exprimierten murinen β -Aktin Gens amplifiziert, welches in allen untersuchten cDNA Proben nachgewiesen werden konnte. Um eine eventuelle Kontamination der RNA-Isolate durch DNA auszuschließen, wurden in einem parallelen Ansatz RNA-Proben, denen keine reverse Transkriptase zugesetzt wurde, analysiert; wie erwartet konnten hier weder mit den transgenspezifischen noch mit den β -Aktin Primern Amplifikate erhalten werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse konnten mit Hilfe von Northern Blot Hybridisierungen unter Verwendung einer Sonde gegen den C-Terminus der humanen PKN bestätigt werden. Während weder in Wildtypmäusen noch in transgenen Tieren anderer Linien ein Hybridisierungssignal erhalten wurde, zeigten Proben der Linien 933 und 995 auch mit dieser Methode das transgene Transkript (Abbildung 3.5). Die Northern Blot Analyse erlaubt darüber hinaus eine semiquantitative Abschätzung der Expressionsstärke, da die Intensität des Hybridisierungssignals mit steigender RNA Expression zunimmt.

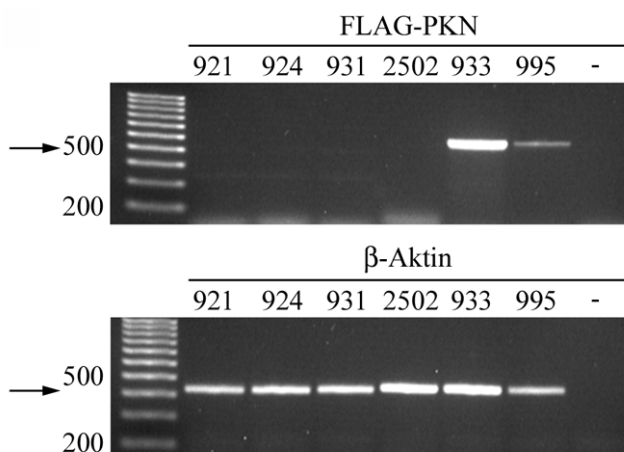


Abbildung 3.4: Expressionsanalyse durch RT-PCR. RNA aus Brustdrüsen transgener Tiere der angegebenen Linien wurde revers transkribiert und in einer PCR unter Verwendung transgenspezifischer Primer analysiert (oben). Zur Kontrolle der reversen Transkription wurde eine PCR unter Verwendung von Primern für das murine β -Aktin Gen durchgeführt (unten). Größenangaben in Basenpaaren; die Pfeile kennzeichnen die spezifischen Amplifikate. -: Wasser.

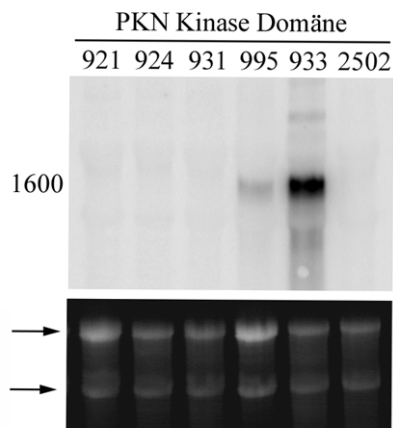


Abbildung 3.5: Northern Blot Analyse der Transgenexpression.

RNA aus laktierenden Brustdrüsen transgener Tiere der angegebenen Linien wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Sonde gegen die Kinasedomäne der humanen PKN hybridisiert. Tiere der Linien 933 und 995 zeigen ein transgenspezifisches Hybridisierungssignal von zirka 1600 Basenpaaren; dieses ist in Linie 933 deutlich intensiver als in Linie 995 (oben). Als Ladekontrolle ist die mit Ethidiumbromid gefärbte RNA nach Northern Blot Transfer dargestellt; die Pfeile kennzeichnen die Banden der ribosomalen 28S bzw. 18S RNA.

Dabei zeigte sich, wie Abbildung 3.5 demonstriert, in Tieren der Linie 933 eine deutlich höhere Transgenexpression als in Linie 995.

3.1.2.2. Analyse des zeitlichen Verlaufs der Transgenexpression in Linie 933

Der zeitliche Verlauf der Transgenexpression wurde in Tieren der Linie 933 mit Hilfe von Northern Blot Hybridisierungen untersucht. Abbildung 3.6 zeigt, dass Transkripte der konstitutiv aktiven Proteinkinase N in allen untersuchten Entwicklungsphasen vom virginen Tier bis zur abgeschlossenen Involution nachgewiesen werden konnten. Zur semiquantitativen Abschätzung der Expressionsstärke wurde die Gesamtmenge der jeweils analysierten RNA durch Hybridisierung mit einer Sonde gegen das ubiquitär exprimierte und invariante ribosomale Protein S26 bestimmt (Vincent *et al.*, 1993). Dabei zeigte sich, dass in virginen Tieren sowie in der ersten Hälfte der Trächtigkeit deutlich mehr RNA eingesetzt werden musste, um ein Hybridisierungssignal für die konstitutiv aktive Protein Kinase N zu erhalten, welches in seiner Intensität dem in Laktationsstadien detektierten Signal entspricht. Dies weist darauf hin, dass die Expressionsstärke des Transgens während der Laktationsphase deutlich zunimmt.

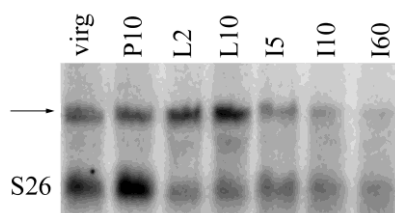


Abbildung 3.6: Zeitlicher Verlauf der Transgenexpression in Linie 933.

Northern Blot Analyse von RNA Proben aus Brustdrüsen transgener Tiere in folgenden Entwicklungsstadien: 12 Wochen, virgin (virg); zehnter Tag der Trächtigkeit (P10); zweiter und zehnter Tag der Laktation (L2 bzw. L10); fünf, zehn und 60 Tage nach Abschluss der Laktation (I5, I10 bzw. I60). Das transgenspezifische Hybridisierungssignal ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Zur Abschätzung der analysierten RNA Menge erfolgte weiterhin die Hybridisierung mit einer Sonde gegen das invariante ribosomale Protein S26.

Abbildung 3.6 zeigt darüber hinaus, dass die Transgenexpression während dieser Phase auf einem in etwa konstanten Niveau verbleibt. Mit dem Beginn der Involution fällt die Stärke der Transgenexpression erneut ab; Transkripte der konstitutiv aktivierten Proteinkinase N bleiben aber auch zwei Monate nach Abschluss der Laktation nachweisbar.

3.1.2.3. Transgenexpression außerhalb der Brustdrüse

Zahlreiche Berichte aus der Literatur belegen, dass die Aktivität des MMTV-LTR Promotors nicht ausschließlich auf die Brustdrüse beschränkt ist, sondern ebenfalls eine Transgenexpression in anderen sekretorisch aktiven Organen vermitteln kann. So wurde bislang unter anderem der Nachweis MMTV gesteuerter Transgene in Speicheldrüsen, dem männlichen Reproduktionstrakt und dem Ovar beobachtet (Übersicht bei Wagner *et al.*, 2001). Mittels Northern Blot Hybridisierung und RT-PCR wurde daher die Expression der konstitutiv aktivierten Proteinkinase N in den Glandulae parotidea, den Vesiculae seminales sowie in Hoden, Nebenhoden und Ovarien transgener Tiere analysiert. Dazu wurde in den Linien 931, 933 und 995 aus diesen Geweben RNA isoliert und wie oben beschrieben durch Northern Blot Hybridisierung mit einer Sonde gegen die Kinasedomäne der humanen PKN sowie durch RT-PCR unter Verwendung der transgenspezifischen Primer FLAG.for und PKN.rev untersucht.

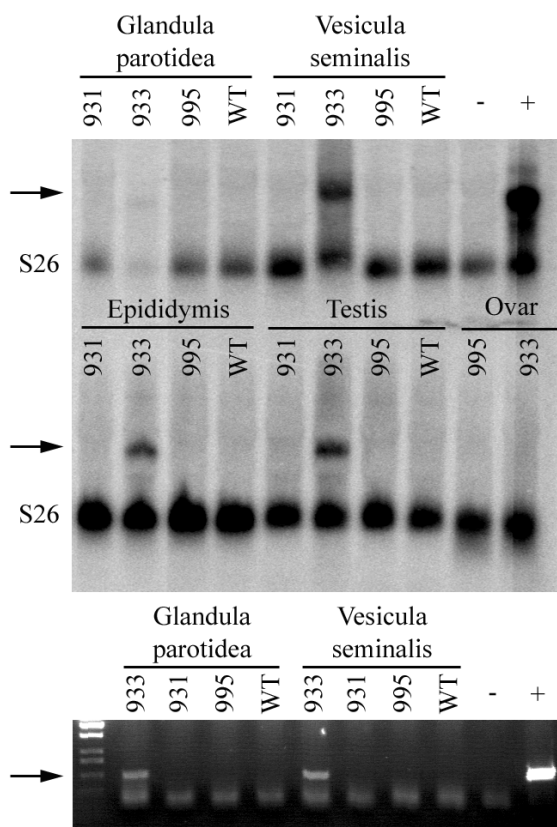


Abbildung 3.7: Analyse der Transgenexpression außerhalb der Brustdrüse.

RNA aus den angegebenen Geweben und Linien wurde mittels Northern Blot Hybridisierung auf das Vorhandensein transgener Transkripte untersucht; als Ladekontrolle erfolgte die Hybridisierung mit einer Sonde gegen das ubiquitär exprimierte ribosomale Protein S26 (oben). Nachweis der Transgenexpression in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme des Ovars in Linie 933. Die im Northern Blot nur schwach ausgeprägte Bande in der Probe aus der Glandula parotidea ist auf eine zu geringe Menge der transferierten RNA zurückzuführen (vgl. Intensität des S26 Signals). – und +: RNA nichttransgener bzw. transgener Brustdrüsen. Zum Nachweis der Transgenexpression in der Glandula parotidea ist im unteren Teil der Abbildung eine RT-PCR unter Verwendung der Primer FLAG.for und PKN.rev gezeigt.

In Tieren der Linien 931 und 995 konnte so in keinem der zusätzlich untersuchten Organe eine Transgenexpression nachgewiesen werden, während Tiere der Linie 933 Transkripte der konstitutiv aktivierten Proteinkinase N auch in der Ohrspeicheldrüse und den untersuchten Organen des männlichen Reproduktionstrakts, nicht aber in Ovarien transgener Weibchen zeigten. Abbildung 3.7 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der Expressionsanalyse außerhalb der Brustdrüse transgener Tiere.

3.1.3. Transgensynthese auf Proteinebene

Zur Beurteilung möglicher Effekte einer PKN Aktivierung *in vivo* ist der Nachweis des transgenen Proteins essenziell. Es wurde daher analysiert, ob die in den Linien 933 und 995 nachgewiesenen Transkripte auch translatiert werden. Da die erhältlichen Antikörper gegen das FLAG-Epitop nur eine eingeschränkte Spezifität aufwiesen, wurde hierzu ein Immunpräzipitationsansatz gewählt. Dabei wurden Proteinextrakte aus Brustdrüsen laktierender Tiere mit einem agarosegekoppelten Antikörper gegen das FLAG-Epitop inkubiert und so gebundene Proteine in einem zweiten Schritt durch Zentrifugation angereichert. Anschließend erfolgte der Western Blot unter Verwendung eines Antikörpers gegen den Carboxyterminus der humanen Proteinkinase N. Mit diesem Verfahren werden ausschließlich Proteine detektiert, die sowohl an Antikörper gegen das FLAG-Epitop als auch an anti-PKN-Antikörper binden. Wie Abbildung 3.8 zeigt, gelang es so, in Tieren der Linien 933 und 995 ein Protein von zirka 53 kDa nachzuweisen, dessen Molekulargewicht dem der PKN-Kinasedomäne entspricht (Ueyama *et al.*, 2001). In Wildtypmäusen sowie Tieren der Linie 931 konnte erwartungsgemäß kein solches Protein detektiert werden. Damit wurde gezeigt, dass Tiere der Linien 933 und 995 das Transgen sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene synthetisieren und für die weiterführende Charakterisierung der Protein Kinase N *in vivo* geeignet sind. Da für die Immunpräzipitation in allen Linien die selbe Proteinmenge eingesetzt wurde, bestätigt die im Vergleich zu Linie 995 höhere Intensität des Western Blot Signals in Linie 933 darüber hinaus die Ergebnisse der semiquantitativen Northern Blot Analyse und belegt damit eine höhere Expression des Transgens in dieser Linie auch auf Proteinebene.

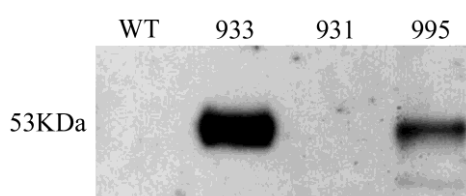


Abbildung 3.8: Immunpräzipitation zum Nachweis der Transgenexpression auf Proteinebene.

Präzipitation mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop, Western-Blot unter Verwendung eines anti-PKN-Antikörpers.

3.2. Analyse der Brustdrüsenfunktion in transgenen Tieren

Zur Beurteilung der Brustdrüsenfunktionalität *in vivo* wurde während der Laktationsphase die Gewichtsentwicklung von Jungtieren transgener und nicht transgener Weibchen verglichen. Dabei zeigten sich hochsignifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die in Tabelle 3.1 und Abbildung 3.9 dargestellten Daten demonstrieren, dass der Gewichtszuwachs der Jungtiere sowohl nach zehn als auch nach 21 Tagen in beiden transgenen Linien signifikant unter dem der Kontrolltiere lag. Die durchschnittliche Anzahl der Jungtiere pro Wurf unterschied sich dabei zwischen transgenen Weibchen und Kontrolltieren nicht signifikant; die Gewichtsdaten innerhalb der einzelnen Gruppen waren normalverteilt. In beiden transgenen Linien wurde darüber hinaus eine Steigerung der perinatalen Mortalität beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Um zu bestimmen, ob der beobachtete verminderte Gewichtszuwachs in den Linien 933 und 955 auf eine eingeschränkte Laktationsfähigkeit transgener Weibchen oder einen Defekt auf Seiten transgener Jungtiere zurückzuführen ist, wurden Austauschexperimente durchgeführt, in denen zunächst transgene und nicht-transgene Weibchen zum selben Zeitpunkt mit männlichen Wildtypmäusen verpaart wurden, so dass die Geburt der Jungtiere am selben Tag erfolgte. Anschließend wurden die Jungtiere der transgenen Weibchen mit denen der Kontrolltiere vertauscht und die Gewichtsentwicklung in beiden Gruppen analysiert. Dabei zeigte sich, dass Wildtypjungtiere, die von transgenen Weibchen gesäugt wurden, einen verminderten Gewichtszuwachs aufwiesen, während sich transgene Jungtiere, die von Kontrolltieren gesäugt wurden, unauffällig entwickelten (Daten nicht gezeigt). Demnach wird der beobachtete Phänotyp ausschließlich vom Genotyp der Mutter, nicht aber von dem der Jungtiere bestimmt. Dies deutet darauf hin, dass die Expression der konstitutiv aktivierten Proteinkinase N in der murinen Brustdrüse zu einer Beeinträchtigung der Organfunktion führt.

	Wildtyp			PKN 933				PKN 995			
	n	m	s	n	m	s	p	n	m	s	p
L10	246	5,82	0,94	290	4,69	0,74	<0,0001	94	4,17	0,60	<0,0001
L21	246	11,10	2,01	273	7,88	1,91	<0,0001	44	7,03	1,49	<0,0001

Tabelle 3.1: Übersicht über die Gewichtsentwicklung der Jungtiere in Wildtypmäusen sowie in den transgenen Linien 933 und 995. L10: Körpergewicht am zehnten Lebenstag; L21: Körpergewicht am 21. Lebenstag.

Die p-Werte kennzeichnen die Signifikanzniveaus gegenüber Jungtieren nicht transgener Weibchen.

n: Anzahl der gewogenen Jungtiere. m: Durchschnittsgewicht in Gramm. s: Standardabweichung der erhobenen Gewichtsdaten in Gramm.

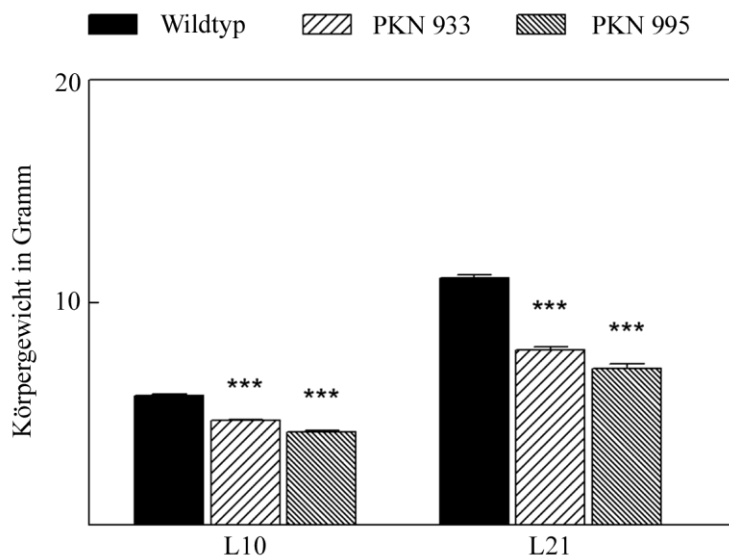


Abbildung 3.9: Gewichtsentwicklung der Jungtiere transgener und nichttransgener Tiere.

Dargestellt sind die durchschnittlichen Körpergewichte von Jungtieren am zehnten (L10) bzw. 21. (L21) Lebensstag, die von Müttern der angegebenen Linien gesäugt wurden. Die Fehlerbalken stellen den Standardmessfehler dar. ***: $p < 0,0001$ gegenüber Wildtyp-Kontrolle.

3.3. Analyse der Brustdrüsenmorphologie in transgenen Tieren

Wie in Abschnitt 3.1.2.2. gezeigt, exprimieren transgene Tiere die konstitutiv aktive Proteinkinase N nach Abschluss der Pubertät in allen Entwicklungsphasen. Um die Frage nach einem strukturellen Korrelat des beobachteten funktionellen Defizits in PKN transgenen Tieren zu klären, wurde die Brustdrüsenmorphologie in diesen Tieren vom virgines Stadium bis zum Abschluss der Involution analysiert. Die Beurteilung der groben Organarchitektur erfolgte dabei mit Hilfe von Ganzorganpräparaten, während mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Gewebeschnitte zur feineren histologischen Analyse dienten. Für jedes Entwicklungsstadium wurden mindestens vier Tiere der Linien 933 und 995 sowie mindestens vier nicht transgene Kontrollweibchen untersucht.

3.3.1. Virgines Stadium und Trächtigkeit

Die Analyse der Brustdrüsenmorphologie wurde in zwölf Wochen alten virgines Tieren begonnen. Brustdrüsengewebe transgener Tiere der Linie 933 zeigte sich in diesem Entwicklungsstadium regelrecht differenziert und wies weder auf Ebene der Ganzorganpräparate noch in Gewebeschnitten pathologische Veränderungen auf. Sowohl in Tieren dieser Linie als auch in Kontrollmäusen hatte das Milchgangsystem die Grenzen des Drüsenfettkörpers erreicht; die terminalen Endknospen hatten sich in beiden Gruppen vollständig zurückgebildet.

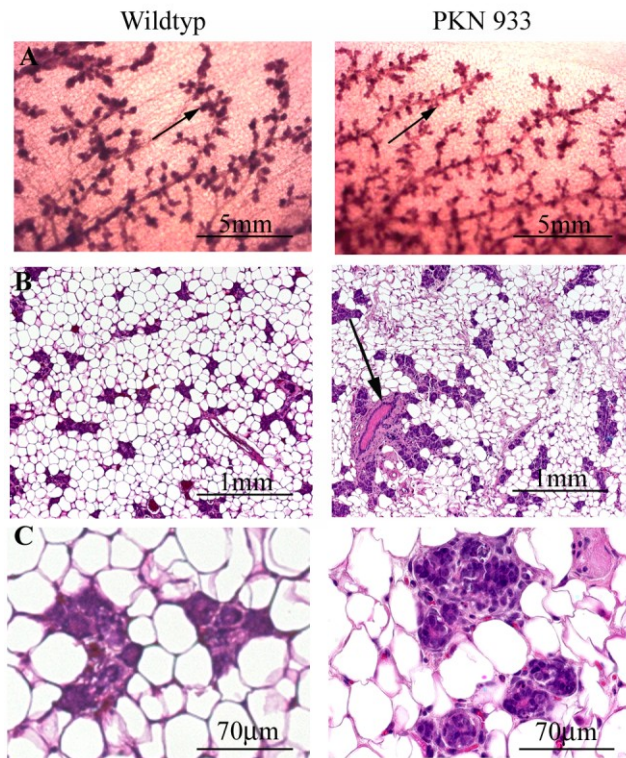


Abbildung 3.10: Brustdrüsenmorphologie in zwölf Wochen alten virginen Tieren.

A: Ganzorganpräparat. Die Pfeile kennzeichnen seitliche Knospen, die vom Milchgangsystem ausgehen.

B: HE gefärbter Gewebeschnitt, 25fache Vergrößerung. Ein im transgenen Tier angeschnittener Milchgang ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

C: HE gefärbter Gewebeschnitt, 400fache Vergrößerung.

Wie Abbildung 3.10A demonstriert, bestanden darüber hinaus zwischen transgenen Tieren und Kontrollweibchen keine Unterschiede im Grad der Milchgangverzweigung und der Ausbildung alveolärer Knospen; die terminalen Endknospen hatten sich in beiden Gruppen vollständig zurückgebildet. In mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Gewebeschnitten dominierte in diesem Entwicklungsstadium erwartungsgemäß univakuoläres Fettgewebe; der Anteil des Brustdrüsenepithels war in transgenen Tieren der Linie 933 und Kontrollbrustdrüsen vergleichbar (Abbildung 3.10B). Das Milchgangepithel war in beiden Gruppen einschichtig und zeigte keine atypischen Veränderungen; wie Abbildung 3.10C demonstriert, waren die alveolären Knospen histologisch regelrecht konfiguriert.

Auch während der Trächtigkeit zeigten transgene Tieren der Linie 933 eine unauffällige Entwicklung. Abbildung 3.11 gibt einen Überblick über die Morphologie der Brustdrüse in transgenen Mäusen sowie in Kontrolltieren während der Phase der lobuloalveolären Entwicklung am 17. Tag der Trächtigkeit. Übersicht und Detailansicht der Ganzorganpräparate (Abbildung 3.11A bzw. B) zeigten einen identischen Proliferationsgrad der alveolären Knospen und die regelrechte Ausbildung lobuloalveolärer Strukturen.

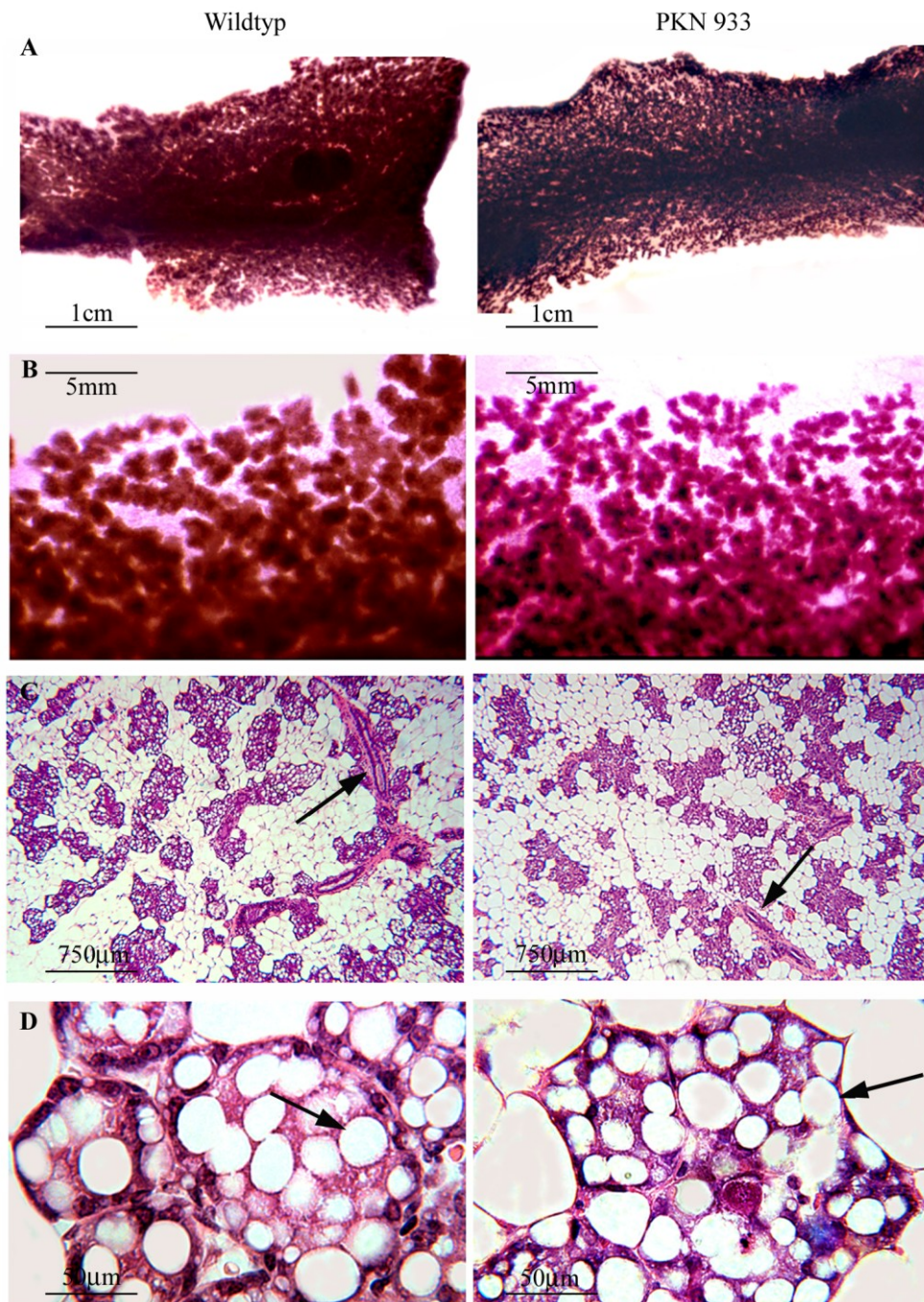


Abbildung 3.11: Brustdrüsenmorphologie am Tag 17 der Trächtigkeit.

A: Ganzorganpräparate, Übersicht.

B: Ganzorganpräparate, Detailansicht.

C: HE gefärbter Gewebeschnitt, 25fache Vergrößerung. Anschnitte des Milchgangsystems sind durch Pfeile gekennzeichnet.

D: HE gefärbter Gewebeschnitt, 400fache Vergrößerung. Die Pfeile kennzeichnen intrazelluläre Lipidvesikel als Zeichen der sekretorischen Differenzierung.

Sowohl in transgenen Tieren als auch in Kontrollbrustdrüsen kam es im Vergleich zum virginalen Entwicklungsstadium zu einer relativen Zunahme des epithelialen Kompartiments mit Abnahme der Anzahl der Adipozyten (Abbildung 3.11C). Mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Gewebeschnitte zeigten in 400facher Vergrößerung darüber hinaus regelrecht konfigurierte lobuloalveoläre Strukturen mit Mammaepithelzellen, die als Zeichen der zunehmenden Differenzierung mit der Lipidsynthese begonnen hatten und in ihrem Zytoplasma große lipidhaltige Vesikel aufwiesen (Abbildung 3.11D). Anzahl, Größe und Verteilung dieser Vesikel unterschieden sich zwischen transgenen Tieren und Kontrollbrustdrüsen nicht. Zusammenfassend ergab die morphologische Analyse transgener Tiere der Linie 933 damit keinen Hinweis auf einen Entwicklungsdefekt der Brustdrüse bis zum Ende der Trächtigkeit.

3.3.2. Sekretorische Aktivierung und Laktation

Mit Beginn der Laktation stellten sich erstmals deutliche Unterschiede zwischen transgenen Brustdrüsen und Kontrolltieren dar: Während sich die Alveolen in Ganzorganpräparaten von Wildtypbrustdrüsen im Vergleich zur Phase der Trächtigkeit deutlich erweitert hatten, zeigten, wie Abbildung 3.12A demonstriert, transgene Tiere nur spärlich entwickelte lobuloalveoläre Strukturen, die in ihrem Erscheinungsbild Parallelen zur Morphologie während der späten Trächtigkeit aufwiesen (vgl. Abbildung 3.11B). In mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Gewebeschnitten wurde deutlich, dass dies auf eine ausgebliebene Expansion der Alveolen in der Phase der sekretorischen Aktivierung zurückzuführen ist. Alveolen in genetisch nicht modifizierten Brustdrüsen wiesen wie erwartet große Lumina auf, in denen sich vereinzelt ein lockeres Sekretionsprodukt darstellte. Im Gegensatz dazu zeigten Alveolen in transgenen Tieren deutlich kleinere Lumina; häufig fand sich hier intraluminal ein eosinophiles kondensiertes Sekretionsprodukt (Pfeile in Abbildung 3.12B). Als Folge der ausgebliebenen alveolären Expansion war der Adipozytenanteil im Brustdrüsengewebe transgener Tiere in diesem Entwicklungsstadium deutlich höher als in Kontrollbrustdrüsen, obwohl konsistent mit den am Ende der Trächtigkeit erhobenen Befunden in beiden Gruppen eine vergleichbare Anzahl von Alveolen ausgebildet wurde.

Die detaillierte Analyse der Zellmorphologie in 400facher Vergrößerung zeigte als Hinweis auf die begonnene sekretorische Aktivität auch in transgenen Tieren abgeflachte Epithelzellen; wie in genetisch nicht modifizierten Brustdrüsen fanden sich auch in diesem Stadium sowohl intrazellulär als auch luminal lipidhaltige Vesikel. Zusammenfassend deuten diese Befunde darauf hin, dass mit der Geburt der Jungtiere auch in transgenen Mäusen der Prozess der Milchsekretion einsetzt, die Expansion der Alveolen aber ausbleibt.

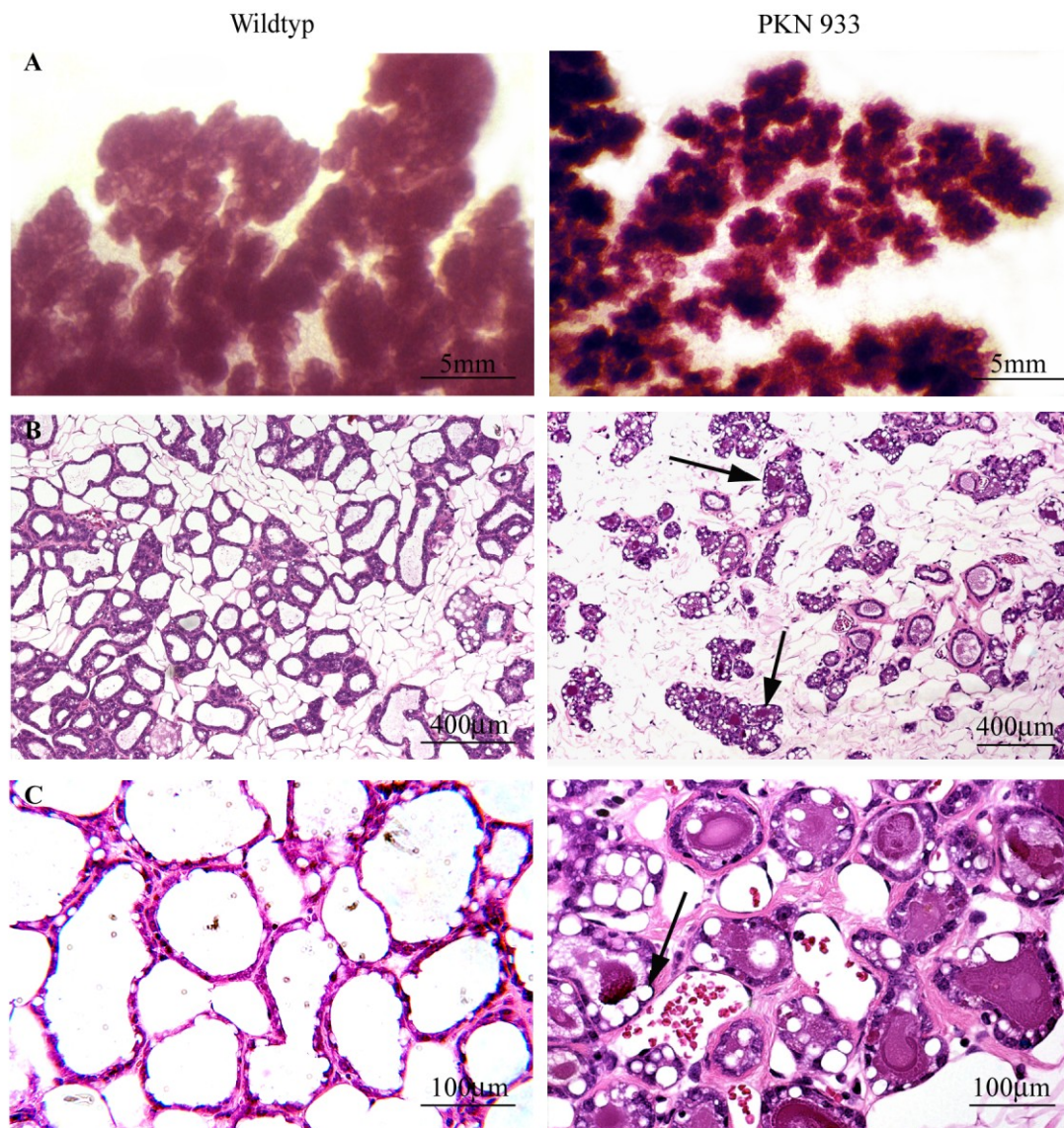


Abbildung 3.12: Brustdrüsenmorphologie am ersten Tag *post partum*

A: Ganzorganpräparat, Detailansicht.

B: HE gefärbter Gewebeschnitt, 25fache Vergrößerung. Alveolen mit luminal kondensiertem Sekretionsprodukt sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

C: HE gefärbter Gewebeschnitt, 400fache Vergrößerung. Der Pfeil kennzeichnet intrazelluläre Lipidvesikel.

Abbildung 3.13 zeigt die typische Morphologie der laktierenden Brustdrüse in transgenen Weibchen und Kontrolltieren am zweiten Tag *post partum*. In genetisch nicht modifizierten Mäusen stellte sich auf Ebene der Ganzorganpräparate ein dichtes Organ dar, welches die detaillierte Beurteilung einzelner Strukturen kaum noch zuließ (Abbildung 3.13A). Im Gegensatz dazu zeigten PKN transgene Brustdrüsen weiterhin nur spärlich entwickelte Alveolen, die dem Erscheinungsbild während der lobuloalveolären Phase der Trächtigkeit ähnelten.

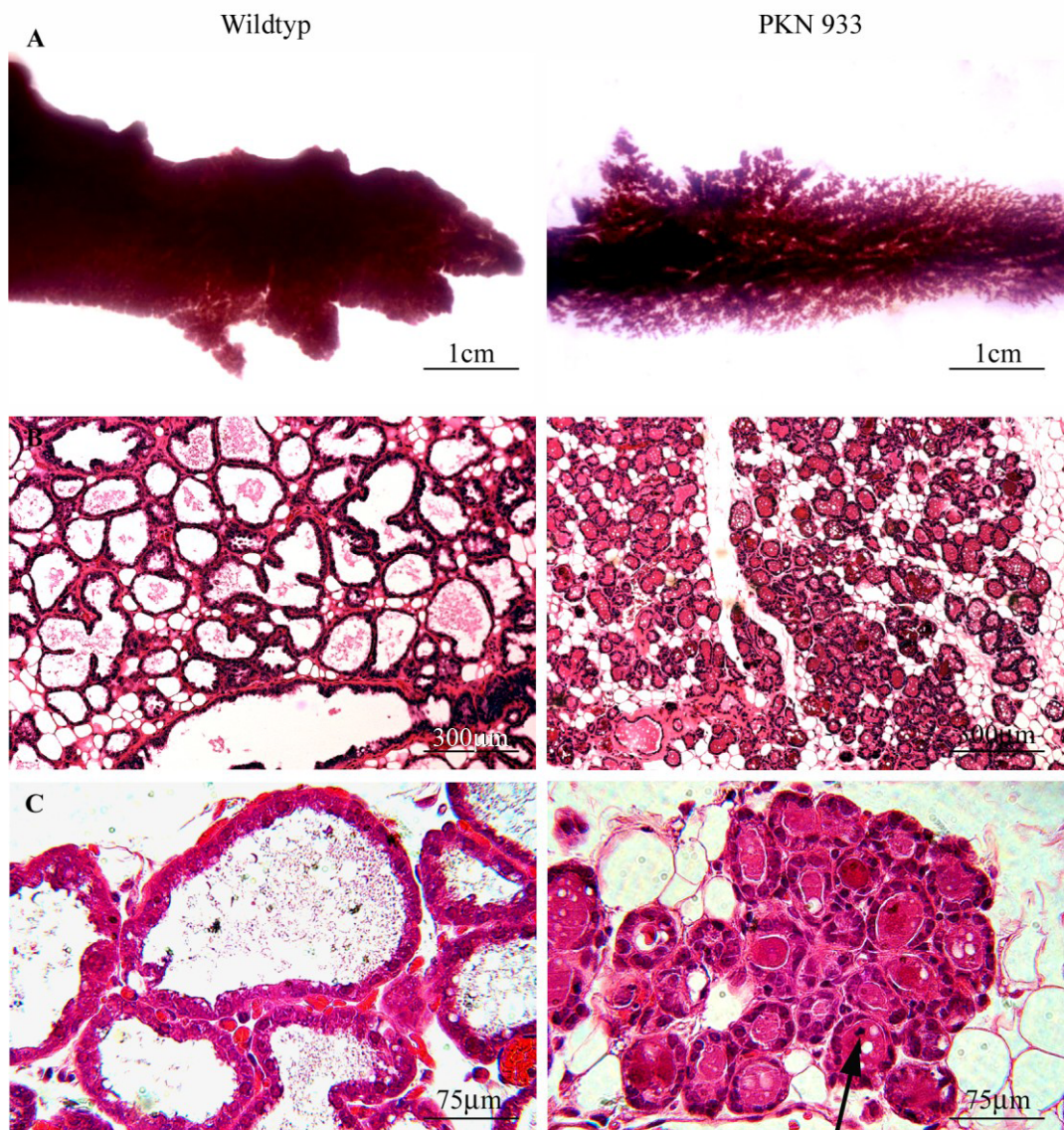


Abbildung 3.13: Brustdrüsenmorphologie am zweiten Tag *post partum*

A: Ganzorganpräparat, Übersicht

B: HE gefärbter Gewebeschnitt, 25fache Vergrößerung.

C: HE gefärbter Gewebeschnitt, 400fache Vergrößerung. Im transgenen Schnitt ist ein Apoptosekörper innerhalb des alveolären Lumens mit einem Pfeil markiert

Konsistent hiermit fand sich in genetisch modifizierten Brustdrüsen ein erhöhter Fettgewebsanteil, während sich in Folge der nun etablierten Lipidmetabolisierung in Kontrolltieren nur noch wenige Adipozyten darstellen ließen.

Abbildung 3.13B demonstriert darüber hinaus die Persistenz kleinlumiger Alveolen in transgenen Tieren; das bereits bei Beginn der Laktation beschriebene intraluminal lokalisierte amorphe eosinophile Sekretionsprodukt war zu diesem Zeitpunkt in deutlich ausgeprägterem Maße nachweisbar. Zusätzlich fanden sich nun in den *Ductus lactiferi* und alveolären Lumina

häufig Apoptosekörperchen (Pfeil in Abbildung 3.13C). Wie schon am Beginn der Laktation waren die Alveolen in beiden Gruppen von einer einfachen Lage flacher Mammapithelzellen ausgekleidet; atypische Veränderungen des alveolären oder duktales Epithels wurden nicht beobachtet.

Die beschriebenen Veränderungen in der Anfangsphase der Laktation fanden sich in unterschiedlicher Ausprägung in allen untersuchten Tieren beider transgener Linien. Der Nachweis kleinlumiger Alveolen, die mit einer dichten amorphen eosinophilen Substanz gefüllt waren, bildete dabei einen Kernbefund in transgenen Tieren. Ähnlich konfigurierte Alveolen waren in laktierenden Kontrolltieren zu keinem Zeitpunkt zu beobachten, wiesen aber, wie Abbildung 3.14 demonstriert, deutliche Parallelen zur Morphologie nichttransgener Kontrollbrustdrüsen während einer frühen Phase der Involution auf. Hier zeigte sich in Weibchen, die während der Laktation von ihren Jungtieren getrennt wurden, nach 48 Stunden als Zeichen der beginnenden Involution ebenfalls ein kondensiertes Sekretionsprodukt im Lumen der Alveolen, deren Durchmesser im Vergleich zum Laktationsstadium deutlich reduziert war. Weiterhin stellten sich in diesem Stadium ebenfalls vermehrt Apoptosekörperchen in den Lumina der Milchgängen und Alveolen dar. Damit bestehen auf morphologischer Ebene deutliche Parallelen zwischen transgenen Tieren am Beginn der Laktation und Kontrolltieren in einem frühen Involutionsstadium.

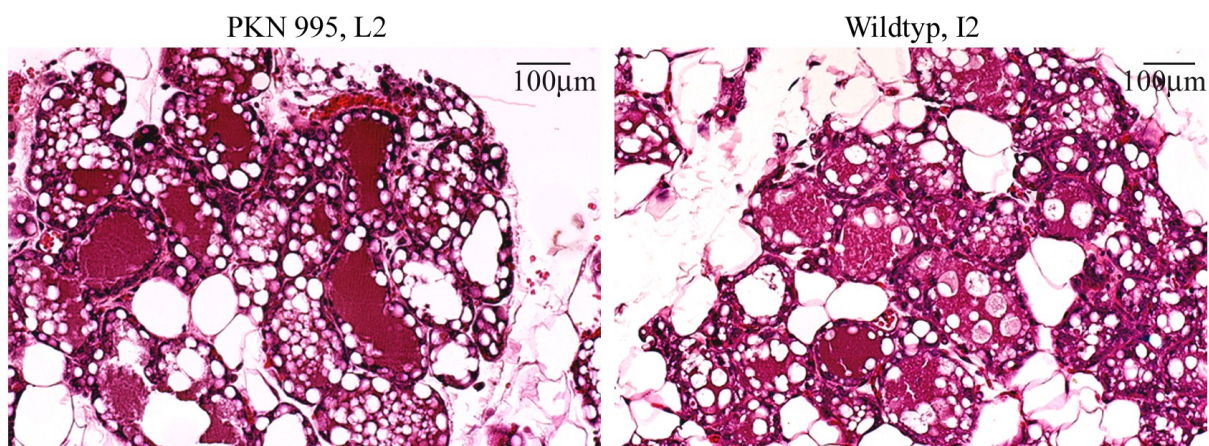


Abbildung 3.14: Vergleich der Brustdrüsenmorphologie zwischen laktierenden transgenen Tieren und Kontrolltieren in einem frühen Stadium der Involution.

Gezeigt sind mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Gewebeschnitte eines transgenen Tieres der Linie 995 am zweiten Tag *post partum* (L2) sowie einer Kontrollbrustdrüse 48 Stunden nach Trennung der Jungtiere von der laktierenden Mutter (I2) in 200facher Vergrößerung.

Obwohl sich Tiere der Linien 933 und 995 im beobachteten Phänotyp während der Laktation nicht grundsätzlich unterschieden, war innerhalb beider Linien eine erhebliche inter- und intraindividuelle Variabilität zu beobachten. So wiesen transgene Weibchen die beschriebenen Veränderungen oft nur in einem Teil der Alveolen auf; andere Bereiche der Brustdrüsen zeigten dann eine unauffällige Entwicklung. Abbildung 3.15 verdeutlicht am Beispiel eines transgenen Tieres der Linie 933 diese intraindividuelle Variabilität. Hier fanden sich am zweiten Tag *post partum* in unmittelbarer Nachbarschaft von kleinlumigen Alveolen, die als typisches histopathologisches Zeichen die beschriebenen intraluminalen Sekretverdichtungen aufwiesen (Pfeilkopf in Abbildung 3.15.), auch regelrecht konfigurierte Alveolen, in denen am Beginn der Laktation die Expansion erfolgt war und die in ihrem Lumen lediglich Reste eines lockeren Sekretionsprodukts zeigten (Pfeil in Abbildung 3.15). Der Anteil pathologisch veränderter Alveolen unterschied sich zwischen einzelnen transgenen Tieren und reichte von einem fast vollständigen Überwiegen bis zu nur fokal ausgeprägten Veränderungen, so dass innerhalb beider untersuchter Linien eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität des histopathologischen Phänotyps zu beobachten war.

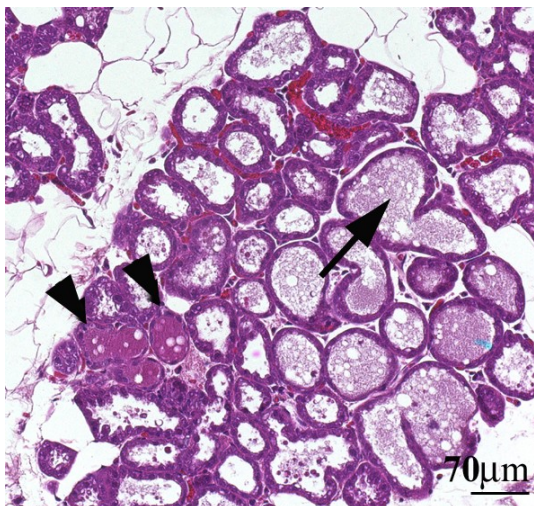


Abbildung 3.15: Intraindividuelle Variabilität des beobachteten Phänotyps. Gezeigt ist ein mit Hämatoxylin und Eosin gefärbter Gewebeschnitt eines transgenen Weibchens der Linie 933 in 200facher Vergrößerung. Am zweiten Tag *post partum* finden sich neben kleinlumigen Alveolen, die ein kondensiertes Sekretionsprodukt enthalten (Pfeilköpfe) in unmittelbarer Nachbarschaft auch Alveolen, die unauffällig konfiguriert sind (Pfeil).

Die gezeigten morphologischen Parallelen zwischen laktierenden transgenen Tieren und Kontrolltieren während der Involution ließ sich im weiteren Verlauf der Laktation bestätigen. Hier zeigte sich in transgenen Tieren ein progredienter Verlust epithelialen Gewebes, der mit einem lipomatösen Umbau des Drüsenkörpers verbunden war. Fünf Tage nach Beginn der Laktation fanden sich histologisch erste Zeichen für eine fokale Lockerung des Mammaparenchyms; hierbei kam es wie in Abbildung 3.16 demonstriert zum Auftreten multivakuolären Fettgewebes, welches als charakteristisches Zeichen des Involutionsprozesses gilt (Richert *et al.*, 2000).

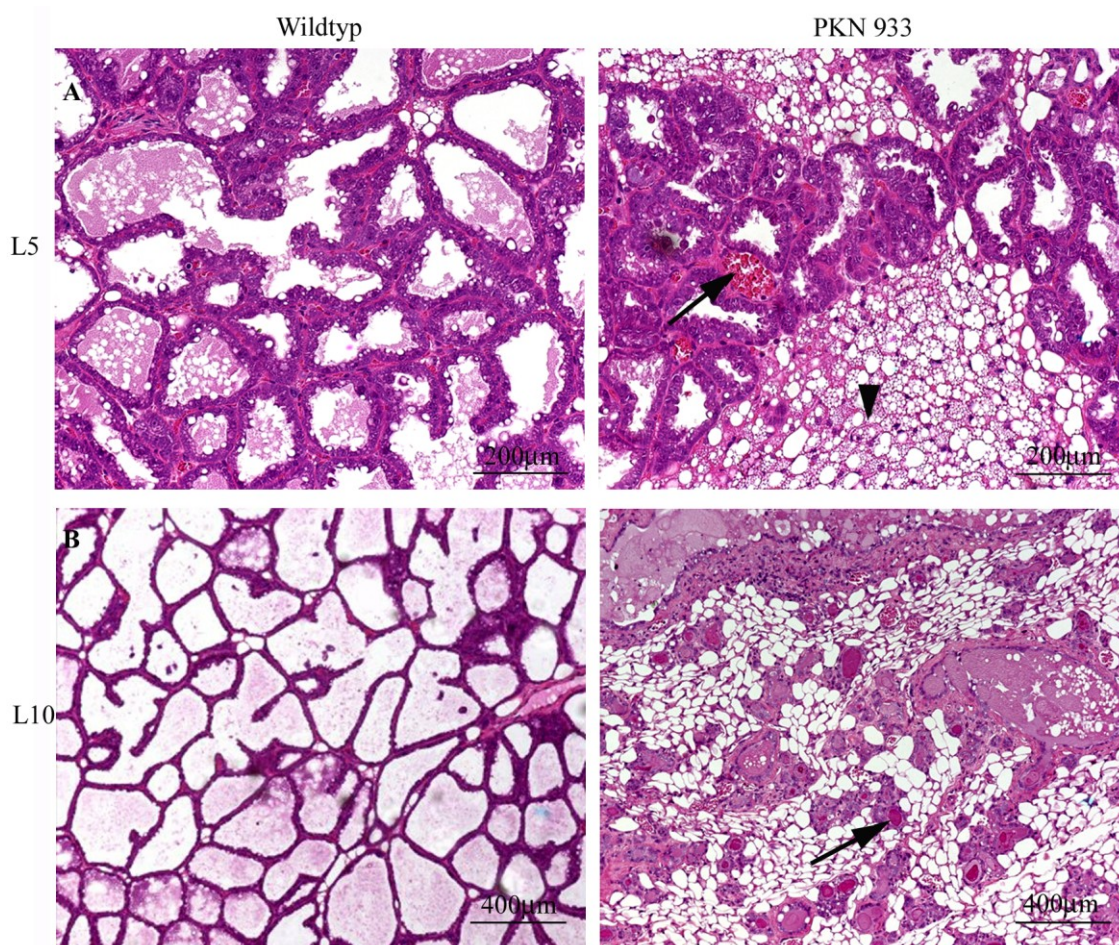


Abbildung 3.16: Brustdrüsenmorphologie während der Laktation, Hämatoxylin-Eosin gefärbte Gewebeschnitte.

A: Fünfter Tag *post partum* (L5); 200fache Vergrößerung. Multivakuoläres Fettgewebe im transgenen Gewebeschnitt ist mit einem Pfeilkopf gekennzeichnet; der Pfeil bezeichnet eine angeschnittene Kapillare mit intraluminale Erythrozyten.

B: Zehnter Tag *post partum* (L10); 25fache Vergrößerung. Intraluminale Sekretverdichtungen im transgenen Gewebeschnitt sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Als Resultat fand sich am zehnten Tag *post partum* in einigen Bereichen transgener Brustdrüsen eine ausgeprägte Regression des Mammaparenchyms mit einem deutlichen Überwiegen des stromalen Kompartiments. Wie schon in frühen Laktationsstadien beobachtet, waren diese Veränderungen oft nur fokal ausgeprägt; Areale, in denen ein weitgehender Untergang des Drüsenparenchyms erfolgt war, zeigten dabei häufig, wie in Abbildung 3.17A verdeutlicht, eine segmentale Verteilung. Andere Bereiche der Brustdrüsen blieben hingegen weitgehend erhalten, so dass sich innerhalb der einzelnen Brustdrüsen häufig ein Nebeneinander von stark regredierten und unauffällig konfigurierten Abschnitten fand (Abbildung 3.17B).

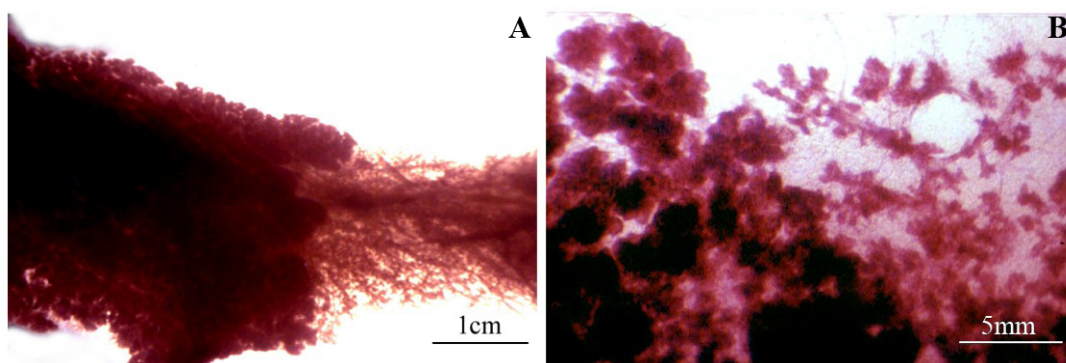


Abbildung 3.17: Brustdrüsenmorphologie am zehnten Tag der Laktation; Ganzorganpräparate. Gezeigt sind zwei transgene Tiere der Linie 933 in einer Übersichts- bzw. Detailaufnahme.

3.3.3. Involution

Abschließend wurde die Morphologie der Brustdrüsen in transgenen und nicht transgenen Kontrolltieren nach erfolgter Involution verglichen. Zwei Monate nach Ende der Laktation fand sich in beiden Gruppen eine vollständige Rückbildung der Alveolen; wie in Abbildung 3.18 demonstriert, zeigten Ganzorganpräparate zu diesem Zeitpunkt in transgenen Weibchen und Wildtyptieren ein Erscheinungsbild, das ausgereiften Brustdrüsen in virginen Tieren ähnelte. Zusammenfassend ergab damit die Analyse der Brustdrüsenmorphologie während der verschiedenen Entwicklungsstadien in Linie 933 einen Phänotyp, der auf die Zeit der Laktation beschränkt war. Wie beschrieben fanden sich in dieser Phase entsprechende Veränderungen auch in Tieren der Linie 995. Die Beobachtung eines identischen Phänotyps in zwei unabhängigen transgenen Linien weist darauf hin, dass die beschriebenen Veränderungen unabhängig vom Integrationsort des Transgens sind und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen Effekt der konstitutiv aktiven Protein Kinase N zurückgeführt werden können.

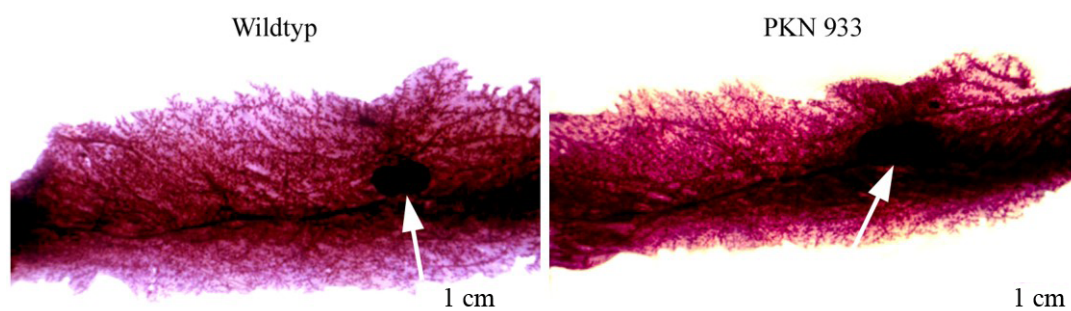


Abbildung 3.18: Brustdrüsenmorphologie 2 Monate nach Ende der Laktation. Ganzorganpräparate, Übersichtsaufnahme. Die Pfeile kennzeichnen jeweils einen Lymphknoten im Drüsenkörper.

3.3.4. Besonderheiten in Linie 995

In Ergänzung zu den bereits beschriebenen Veränderungen zeigten transgene Tiere der Linie 995 ebenfalls einen Phänotyp im virginen Entwicklungsstadium. Dieser wies nur eine inkomplette Penetranz auf und war somit nur in einigen der untersuchten Tiere nachweisbar. Die hier beobachteten Veränderungen waren vielfältig und sind im Überblick in Abbildung 3.19 dargestellt. Vor allem in homozygot transgenen Tieren dieser Linie fand sich ein ausgeprägter Defekt im Auswachsen des Milchgangsystems, der sich in einer nur unvollständigen Penetration des Brustdrüsenfettkörpers manifestierte (Abbildung 3.19A). Häufig waren terminale Endknospen auch noch im Alter von zwei Monaten nachweisbar (Abbildung 3.19A und 3.19C); weiterhin fanden sich in variablem Ausmaß Störungen im Grad der Verzweigungen des Milchgangsystems (Abbildung 3.19B) sowie in der Ausprägung alveolärer Knospen, die zum Teil völlig fehlten (Abbildung 3.19B), zum Teil aber auch regelrecht ausgeprägt waren (Abbildung 3.19D, vergleiche hierzu Abbildung 3.10A). Dies resultierte in einem sehr heterogenen morphologischen Bild in späteren Entwicklungsstadien. Derartige Veränderungen wurden weder in Wildtypmäusen noch in virginen Weibchen der Linie 933 beobachtet.

Der Nachweis eines Phänotyps in nur einer Linie mit Betonung in homozygot transgenen Tieren deutet auf einen Effekt hin, der durch den Integrationsort des Transgens bedingt und mit der Disruption eines anderen Gens in Verbindung stehen könnte. Da im Gegensatz hierzu der beschriebene Phänotyp während der Laktation in beiden transgenen Linien dokumentiert werden konnte, wurden die ausschließlich in Linie 995 beobachteten Veränderungen in virginen Tieren im Rahmen dieser Arbeit nicht weitergehend untersucht und der Schwerpunkt auf die Analyse des Phänotyps während der Laktation gelegt. Aufgrund des homogeneren morphologischen Bildes während dieses Stadiums wurden dazu Tiere der Linie 933 genutzt.

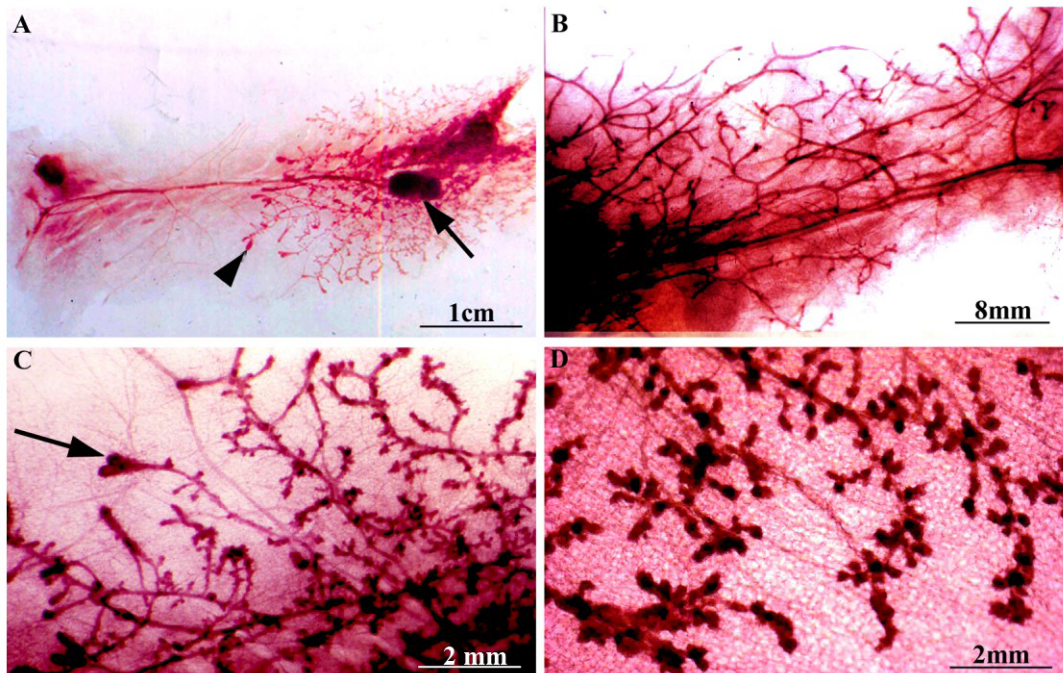


Abbildung 3.19: Übersicht über die in Linie 995 beobachteten Veränderungen in virginen Tieren im Alter von mindestens zwei Monaten. Ganzorganpräparate, verschiedene Vergrößerungen.

A: Inkomplette Penetration des Brustdrüsenfettkörpers in einem homozygot transgenen Tier. Persistenz terminaler Endknospen (Pfeilkopf); der Pfeil kennzeichnet einen Lymphknoten.

B: Reduktion im Grad der Verzweigung des Milchgangsystems und völliges Fehlen alveolärer Knospen in einem homozygoten Tier.

C: Persistenz terminaler Endknospen in einem heterozygoten Tier (Pfeil). Unvollständige Ausbildung alveolärer Knospen.

D: Regelrecht differenzierte alveoläre Knospen in einem heterozygot transgenen Weibchen.

3.3.5. Morphologische Analyse anderer transgenexprimierender Gewebe in Linie 933

Wie in Abschnitt 3.1.2.3. beschrieben, exprimierten Tiere der Linie 933 die konstitutiv aktive Proteinkinase N neben der Brustdrüse auch in der Glandula parotidea, der Vesicula seminalis sowie in Hoden und Nebenhoden. Daher erfolgte in dieser Linie ebenfalls eine orientierende histologische Beurteilung dieser Gewebe an Hand HE-gefärbter Gewebeschnitte. Hierbei fanden sich weder in der Ohrspeicheldrüse noch in Hoden oder Vesiculae seminales auffällige pathologische Veränderungen (Daten nicht gezeigt). Hingegen zeigten Schnitte aus dem Epididymis transgener Männchen eine Reihe von Auffälligkeiten, die in Abbildung 3.20 im Überblick dargestellt sind. Im Vergleich zu Wildtypmännchen imponierte in transgenen Tieren eine ausgeprägte Vakuolisierung des Nebenhodenepithels, die vor allem in den basalen Zellabschnitten ausgeprägt war und zu einer Verdrängung der unter physiologischen Bedingungen basal lokalisierten Zellkerne nach apikal führte.

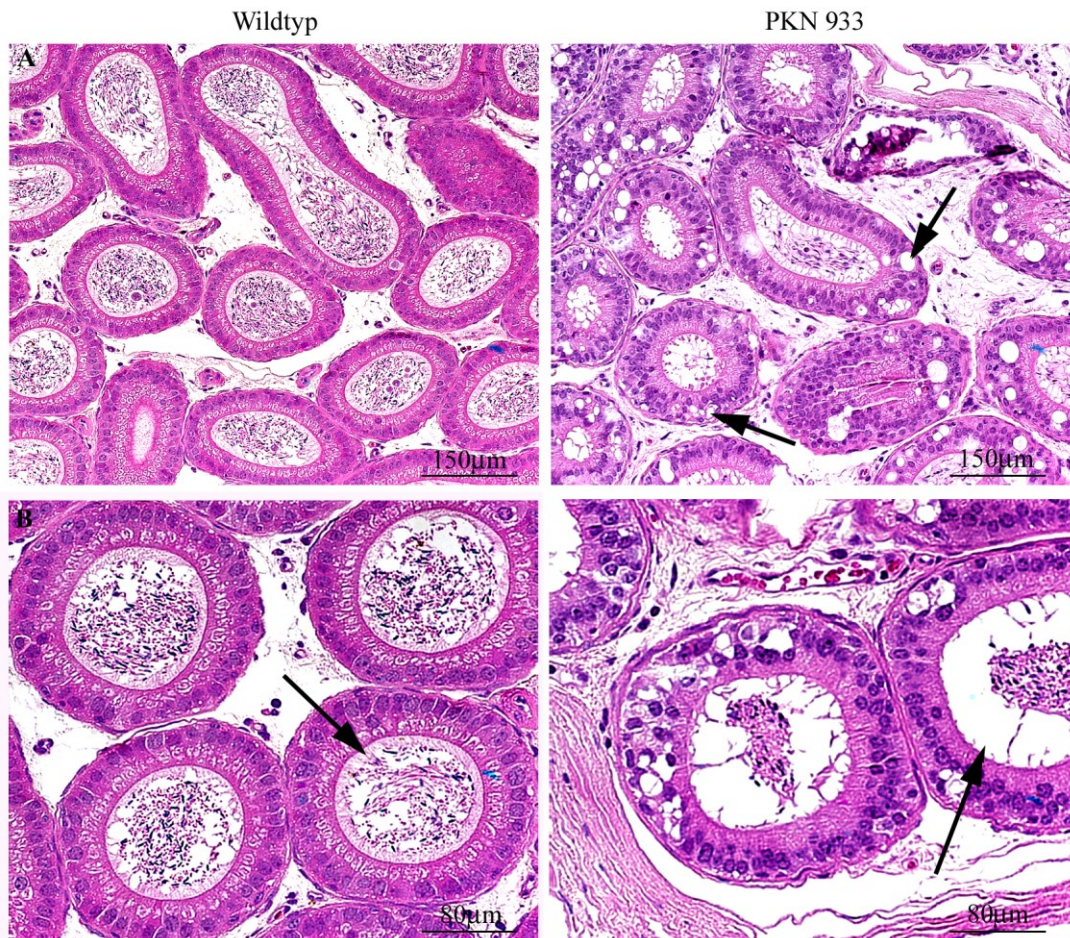


Abbildung 3.20: Nebenhodenmorphologie in PKN transgenen Männchen. HE gefärbte Gewebeschnitte.

A: 200fache Vergrößerung. Der Pfeil kennzeichnet basal lokalisierte intrazelluläre Vakuolen im Nebenhodenepithel PKN transgener Männchen.

B: 400fache Vergrößerung. In transgenen Tieren zeigt sich eine deutliche Reduktion des apikalen Stereozilienbesatzes (Pfeile).

Als Resultat erschien die epitheliale Organisation bei grundsätzlich erhaltener Zweireihigkeit gestört. Auch hier waren ähnlich wie in den Brustdrüsen transgener Tiere nicht alle Organabschnitte in gleichem Maße betroffen, sondern die Veränderungen fokal ausgeprägt. In phänotypisch auffälligen Bereichen des Nebenhodens zeigte sich weiterhin eine deutliche Reduktion des epithelialen Stereozilienbesatzes (Pfeil in Abbildung 3.20B). Luminal fanden sich sowohl in Wildtyptieren als auch in transgenen Männchen Spermien; Hinweise auf eine eingeschränkte Fertilität PKN transgener Männchen ergaben sich nicht. Eine weitergehende Charakterisierung dieser Veränderungen erfolgte zunächst nicht, da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Analyse und Interpretation des Phänotyps in den Brustdrüsen PKN transgener Tiere liegt.

3.4. Analyse der Transgenexpression *in situ*

Eine bekannte Eigenschaft MMTV regulierter Gene besteht darin, dass diese nicht in allen Zellen des Mammaepithels in gleichem Maße exprimiert werden, sondern eine mosaikartige Verteilung zeigen (Wagner *et al.*, 2001). Wie beschrieben waren auch die während der Laktation beobachteten phänotypischen Veränderungen innerhalb PKN transgener Brustdrüsen nicht gleichmäßig verteilt, so dass untersucht wurde, ob das Auftreten dieser Veränderungen in Zellen des Mammaepithels mit der Expression der konstitutiv aktiven Proteinkinase N korreliert. Dazu wurden die Transgentranskripte mit Hilfe einer *in situ* Hybridisierung in Gewebeschnitten dargestellt. Als Sonde wurde hierfür ein Fragment aus dem transkribierten Anteil der SV40-Polyadenylierungssequenz gewählt, welches im Genom der Maus keine Entsprechung findet und daher zum spezifischen Nachweis transgenexprimierender Zellen geeignet ist (Stuckas, 2003).

Die Transkription der Sonde erfolgte *in vitro* sowohl in 3'-5'- (*sense*) als auch in 5'-3'-Richtung (*antisense*), wobei eine Hybridisierung nur zwischen Transgentranskript und *antisense*-Sonde erfolgen kann, während die *sense*-Sonde zur Kontrolle unspezifischer Signale diente.

Es wurden insgesamt sechs laktierende transgene Weibchen sowie zwei Wildtyptiere untersucht, wobei in Kontrolltieren erwartungsgemäß weder mit der *sense* noch mit der *antisense* Sonde ein Hybridisierungssignal erhalten wurde (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse in transgenen Weibchen am zweiten Tag *post partum* zeigt Abbildung 3.21 anhand eines repräsentativen Beispiels. Transkripte der konstitutiv aktiven Protein Kinase N konnten sowohl im lobulären als auch im duktalem Mammaepithel nachgewiesen werden; Zellen des Brustdrüsenstromas zeigten hingegen in keinem Fall ein Hybridisierungssignal.

Transkripte der konstitutiv aktiven Proteinkinase N waren nicht in allen Mammaepithelzellen nachweisbar, sondern zeigten eine mosaikartige Verteilung. Dabei fand sich in kleinumigen Alveolen, deren Expansion am Beginn der Laktation ausgeblieben war, ein hoher Anteil transgenexprimierender Zellen (Pfeilkopf in Abbildung 3.21B). Im Gegensatz dazu überwogen in unauffällig konfigurierten Alveolen transgener Brustdrüsen Epithelzellen, die kein Hybridisierungssignal zeigten und demzufolge das Transgen nicht exprimierten (Pfeil in Abbildung 3.21B). Damit korrelierte auf Ebene der Gewebeschnitte die Expression der konstitutiv aktiven Proteinkinase N mit dem Auftreten der beobachteten histopathologischen Veränderungen.

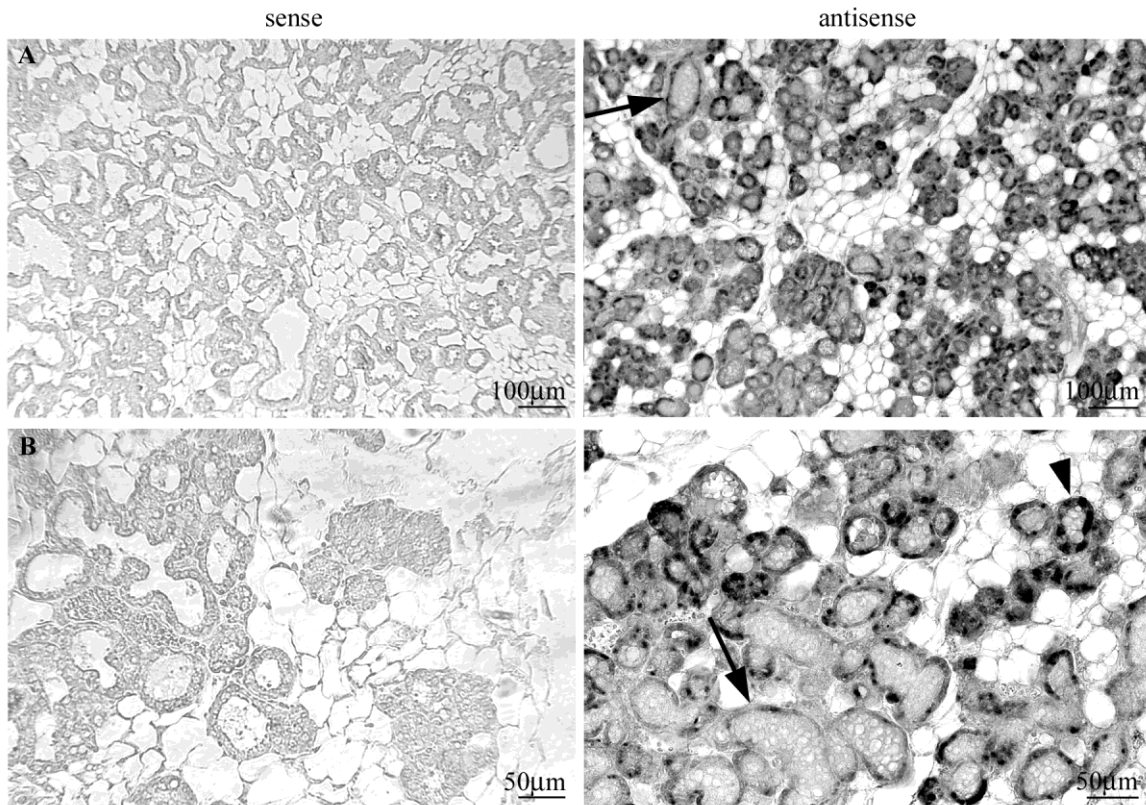


Abbildung 3.21: Nachweis der Transgenexpression durch *in situ* Hybridisierung.

A: 100fache Vergrößerung. Der Pfeil kennzeichnet eine transgenexprimierende des duktales Epithels.

B: 200fache Vergrößerung. Kondensierte Alveolen zeigen einen erhöhten Anteil transgenexprimierender Zellen (Pfeilkopf), während expandierte Alveolen überwiegend von nicht transgenexprimierenden Zellen gebildet werden (Pfeil).

3.5. Analyse der Milchproteinsynthese und -sekretion in transgenen Tieren

Die Fähigkeit zur Synthese und Sekretion von Milchproteinen stellt eine der definierenden Eigenschaften von Mammaepithelzellen in der Phase der Laktation dar und kann als Surrogatmarker zur Beurteilung des Differenzierungsgrads solcher Zellen genutzt werden. Um zu klären, ob die beobachteten morphologischen Veränderungen PKN transgener Brustdrüsen am Beginn der Laktation das Resultat einer mangelhaften Zelldifferenzierung in diesem Entwicklungsstadium sind, wurde die Expression einiger Milchproteine mit Hilfe von *Microarray*-Hybridisierungen auf RNA Ebene untersucht. Die Expressionsniveaus von WAP, β -Casein, α -Laktalbumin und WDNM wurden hierbei in jeweils drei transgenen Weibchen und drei Kontrolltiere am ersten Tag der Laktation bestimmt; Abbildung 3.22A gibt einen Überblick über die so erhaltenen Rohdaten. Die statistische Auswertung lieferte für keines der analysierten Milchproteine einen Anhalt für signifikante Abweichungen zwischen transgenen Weibchen und Kontrolltieren.

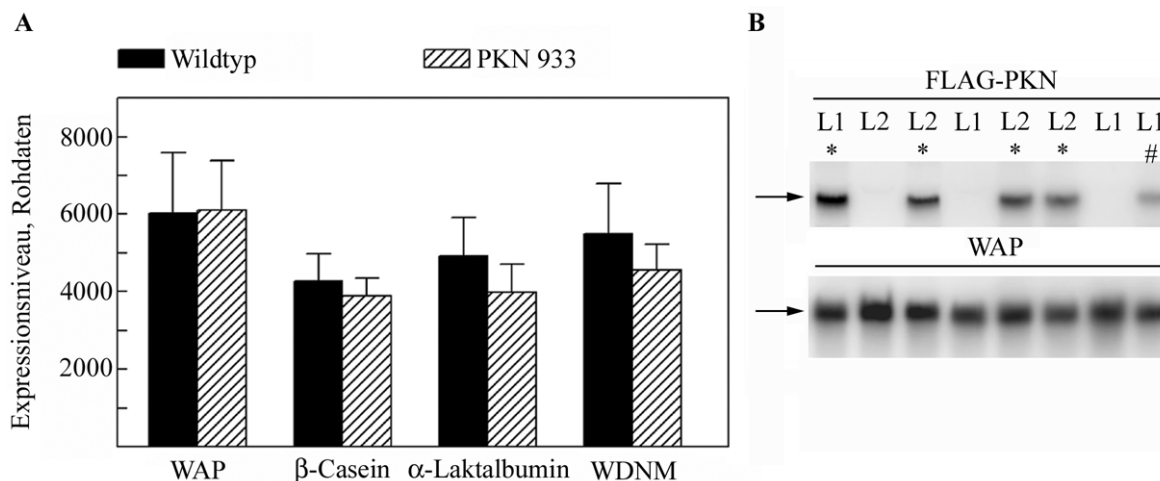


Abbildung 3.22: Analyse der Milchproteinexpression auf RNA Ebene in PKN transgenen Mäusen.

A: Expressionsniveaus verschiedener Milchproteine am ersten Tag *post partum*. *Microarray*-Hybridisierungen, Darstellung der Rohdaten. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardmessfehler. Es ergab sich kein Hinweis auf signifikanten Abweichungen zwischen transgenen Weibchen und Kontrolltieren.

B: Northern Blot Hybridisierung zum Nachweis der WAP Expression; erster (L1) und zweiter (L2) Tag *post partum*. Transgene Tiere der Linie 933 sind durch „*“ gekennzeichnet; „#“ bezeichnet ein transgenes Tier der Linie 995. Im oberen Teil der Abbildung ist das Ergebnis der Hybridisierung mit einer Sonde gegen die Kinasedomäne der humanen PKN dargestellt, der untere Teil zeigt das Ergebnis der Hybridisierung des selben Blots mit einer Sonde gegen das murine WAP Transkript. Spezifische Signale sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Zur Validierung der Ergebnisse aus den *Microarray*-Hybridisierungen wurde exemplarisch die Expression des Milchproteins WAP ebenfalls durch Northern Blotting untersucht. Wie Abbildung 3.22B zeigt, konnte so die Expression dieses Milchproteins am ersten und zweiten Tag *post partum* in transgenen Weibchen und Kontrollbrustdrüsen nachgewiesen werden. Die Intensität des erhaltenen Hybridisierungssignals lag dabei in beiden Gruppen in einer vergleichbaren Größenordnung; eine quantitative Auswertung der Daten ist nicht erfolgt. Auf Ebene der RNA ergaben sich somit keine Hinweise auf eine global gestörte Expression von Milchproteinen in PKN transgenen Brustdrüsen.

Da, wie in Abschnitt 3.4 gezeigt, nicht alle Epithelzellen transgener Brustdrüsen die konstitutiv aktive Proteinkinase N exprimieren, besteht grundsätzlich die Möglichkeit, dass potentiell vorhandene Unterschiede der Milchproteinexpression durch eine hohe Hintergrundaktivität aus genetisch nicht modifizierten Zellen maskiert werden. Daher wurde beispielhaft das Milchprotein β -Casein immunhistochemisch in Gewebeschnitten dargestellt, um eine gezielte Beurteilung der Zellen in morphologisch veränderten Alveolen zu ermöglichen. Gleichzeitig konnten so Aussagen über die β -Casein-Synthese auf Proteinebene getroffen werden.

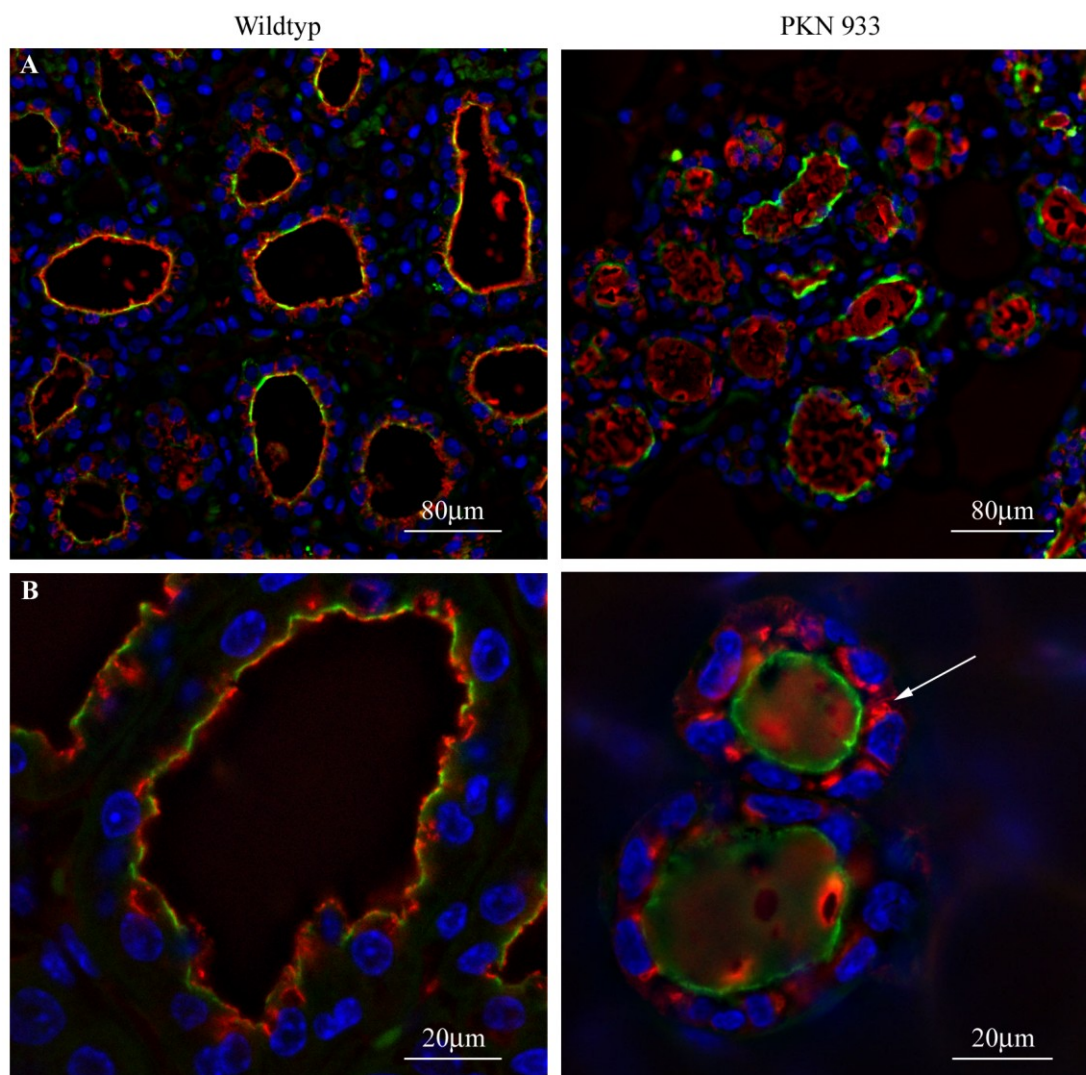


Abbildung 3.23: Immunhistochemische Darstellung des Milchproteins β -Casein in Gewebeschnitten vom zweiten Tag der Laktation. Die Darstellung des β -Caseins erfolgte mit einem an das rote Fluorophor Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper; zur besseren Orientierung wurden Zellkerne mit blau fluoreszierendem DAPI dargestellt und die luminalen Seite des alveolären Epithels mit Weizenkeimagglutinin markiert, welches an das grüne Fluorophor Oregon Green 488 gebunden war.

A. 200fache Vergrößerung.

B: 600fache Vergrößerung, Ölimmersion. Der Pfeil kennzeichnet intrazellulär akkumuliertes β -Casein im transgenen Tier.

Insgesamt wurden acht transgene Brustdrüsen und acht Kontrolltiere während der Laktation untersucht. Abbildung 3.23 demonstriert an einem repräsentativen Beispiel vom zweiten Tag *post partum*, dass so in transgenen Tieren eine homogene Expression des Milchproteins β -Casein nachgewiesen werden konnte. Dabei zeigten auch Zellen in morphologisch veränderten Alveolen als Zeichen der erhaltenen Fähigkeit zur β -Casein-Synthese eine deutliche Immunreaktivität.

Luminal fanden sich dabei in diesen Alveolen häufig große signalintensive Areale, die akkumulierten β -Casein-Depots entsprechen. Neben diesen intraluminalen Milchproteindepots zeigte die 600fache Vergrößerung, wie in Abbildung 3.23 verdeutlicht, darüber hinaus eine veränderte subzelluläre β -Casein-Lokalisation in Mammaepithelzellen transgener Tiere. Hier stellten sich über weite Bereiche des Zytoplasmas deutlich positive Signale dar, während in Wildtyptieren die β -Casein-Immunreaktivität auf den apikalen Zellpol beschränkt war. Im Zusammenhang mit den beobachteten luminalen β -Casein-Depots deuten diese Befunde auf eine Akkumulation des Milchproteins sowohl extra- als auch intrazellulär hin.

Diese Beobachtung wurde auch auf ultrastruktureller Ebene bestätigt. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen, die durch Mitarbeiter des Instituts für Anatomie der Charité Universitätsmedizin Berlin angefertigt wurden, zeigten in transgenen Mammaepithelzellen am zweiten Tag *post partum* eine deutlich größere Zahl intrazellulär lokalisierter Caseinvesikel als in Zellen genetisch nicht modifizierter Tiere (Abbildung 3.24).

Auch in der Konfiguration intrazellulärer Lipidvesikel stellten sich ultrastrukturell Unterschiede zwischen transgenen Tieren und Kontrollweibchen dar. Im glatten endoplasmatischen Retikulum lactierender Mammaepithelzellen werden kontinuierlich Lipide synthetisiert, die als Mikrolipidtropfen ins Zytoplasma abgegeben und gerichtet zum apikalen Zellpol transportiert werden.

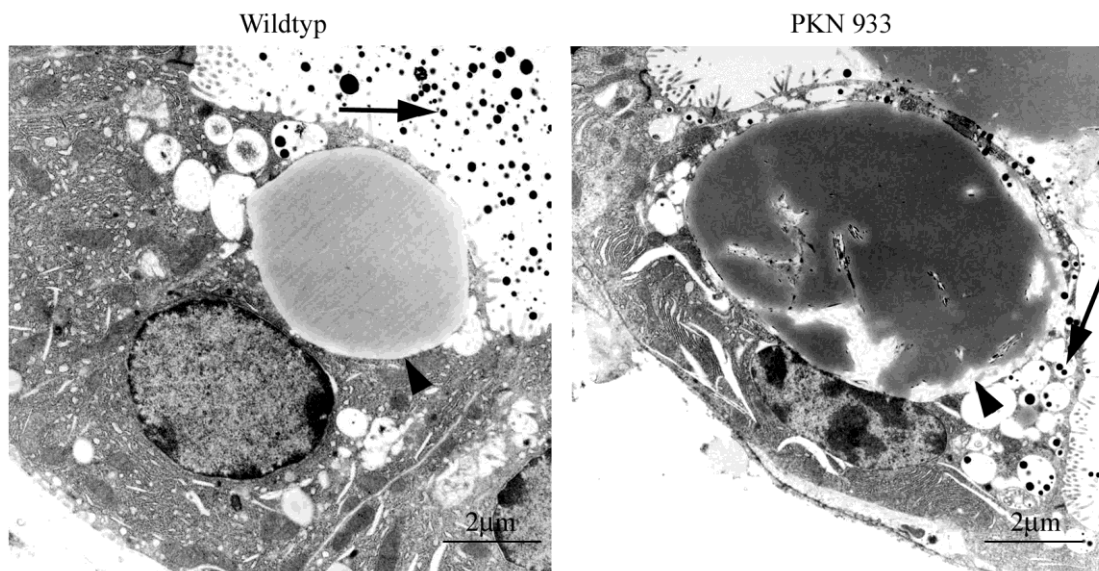


Abbildung 3.24: Darstellung lactierender Mammaepithelzellen in Kontrolltieren und transgenen Weibchen durch Transmissionselektronenmikroskopie. Die gezeigten Aufnahmen stammen vom zweiten Tag *post partum* und wurden durch Mitarbeiter des Instituts für Anatomie der Charité Universitätsmedizin Berlin angefertigt. Die Pfeile kennzeichnen β -Casein Partikel; Lipidvesikel sind durch einen Pfeilkopf markiert. 6000fache Vergrößerung.

Während dieses Prozesses verschmelzen zahlreiche dieser Mikrolipidtropfen zu größeren Lipidvesikeln, die schließlich mit der Zellmembran fusionieren und von einer Lipiddoppelschicht umgeben sezerniert werden (Mather und Keenan, 1998). Entsprechend fanden sich in Wildtyptieren größere Lipidvesikel ausschließlich am apikalen Zellpol und in unmittelbarer Nachbarschaft zur Zellmembran. Abbildung 3.24 zeigt im Wildtyptier ein solches Vesikel während der Sekretion. Im Gegensatz dazu stellten sich in Mammaepithelzellen transgener Tiere große Lipidvesikel auch ohne direkten Kontakt zur apikalen Plasmamembran dar (Pfeilkopf in Abbildung 3.24). Dies deutet in Analogie zur veränderten intrazellulären β -Casein-Verteilung auf eine Akkumulation lipidhaltiger Vesikel im Zytoplasma hin. Unter physiologischen Umständen finden sich derartige ultrastrukturelle Veränderungen typischerweise in einem frühen Stadium der Involution (Furth *et al.*, 1997). Da wie beschrieben auch die konventionelle histologische Charakterisierung Hinweise auf eine verfrüht einsetzende Involution in transgenen Tieren lieferte, wurde diese Hypothese im Weiteren mit Hilfe zusätzlicher experimenteller Techniken geprüft.

3.6. Involutionstypische Veränderungen in transgenen Tieren während der Laktation

3.6.1. Detektion apoptotischer Zellen *in situ*

Im Rahmen des Involutionsprozesses kommt es nach Beendigung der Laktation in der murinen Brustdrüse initial zu einem massiven apoptotischen Zellsterben, dem eine Phase des lipomatösen Umbaus der Drüse folgt (Furth *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997). Um zu untersuchen, ob auch in PKN transgenen Mäusen eine erhöhte Inzidenz des programmierten Zelltods dem während der Laktation beobachteten Verlust epithelialen Gewebes vorangeht, wurden mit Hilfe der TUNEL Methode das Auftreten apoptotischer Zellen in Gewebeschnitten analysiert. Dieses Verfahren ermöglicht die Darstellung von Einzelstrangbrüchen der genomischen DNA, die durch die apoptoseinduzierte Aktivierung spezifischer Endonukleasen entstehen und in der vorliegenden Arbeit mit dem grünen Fluorophor FITC markiert wurden. Eine Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit blau fluoreszierendem DAPI. Zur Quantifizierung wurde in Gewebeschnitten der Anteil TUNEL-positiver Epithelzellen an der Gesamtheit aller dargestellten Epithelzellen erfasst und als Apoptoserate bezeichnet. Um eine eventuelle Zeitabhängigkeit der Apoptoseinzidenz zu erfassen, erfolgte die Analyse am 18. Tag der Trächtigkeit sowie am ersten, zweiten und zehnten Tag *post partum*; dabei wurden jeweils pro Genotyp zwischen drei und fünf Tiere untersucht und in Gewebeschnitten für jedes analysierte Tier zwischen 1000 und 2500 Kerne ausgezählt.

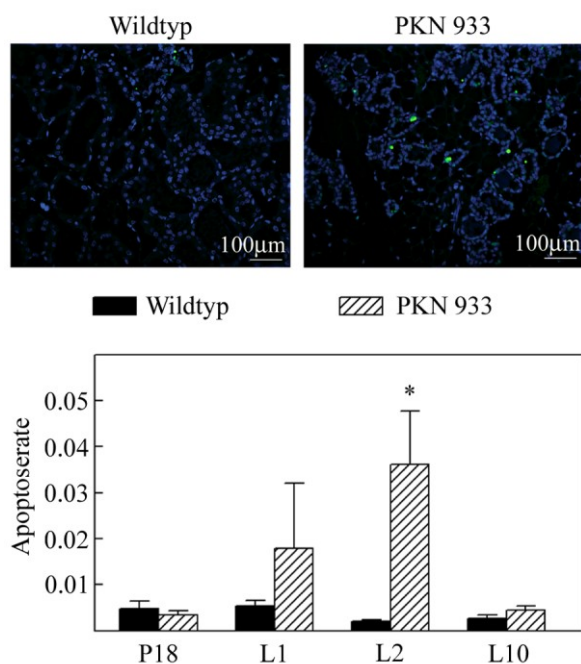


Abbildung 3.25: Detektion apoptotischer Zellen *in situ*. Die obere Abbildung zeigt beispielhaft Gewebeschnitte eines transgenen Weibchens und eines Kontrolltieres vom zweiten Tag *post partum*. TUNEL positive Epithelzellen zeigen eine grüne Fluoreszenz; die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI.

Der untere Teil der Abbildung stellt die ermittelten Apoptoseraten in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium und Genotyp dar. Die Fehlerbalken markieren den Standardmessfehler.

*: $p < 0,05$; P18: 18. Tag der Trächtigkeit. L1, L2, L10: Erster, zweiter bzw. zehnter Tag *post partum*.

Abbildung 3.25 gibt einen Überblick über die Inzidenz des programmierten Zelltods in den untersuchten Entwicklungsstadien. Da es sich bei den ermittelten Apoptoseraten um Mittelwerte relativer Häufigkeiten handelt, erfolgte die Auswertung nach Arcus-Sinus-Transformation der Messwerte (Sachs, 2004). Es zeigte sich, dass der Anteil apoptotischer Zellen während einer späten Trächtigkeitsphase in transgenen Weibchen (mittlere Apoptoserate 0,60 %; 95 %-Konfidenzintervall 0,31 % - 0,88 %) und Kontrolltieren (mittlere Apoptoserate 0,33 %, 95 %-Konfidenzintervall 0,15 % - 0,51 %) gleichermaßen gering war. Während aber im Verlauf der sich anschließenden Laktation die Apoptoserate in Kontrolltieren weiter auf diesem Ausgangsniveau blieb, zeigten PKN transgene Weibchen am Beginn der Laktationsphase einen Anstieg der Zahl apoptotischer Zellen, der am zweiten Tag mit durchschnittlich 3,6 % (95 %-Konfidenzintervall 1,4 % - 5,9 %) signifikant höher als in nichttransgenen Kontrolltieren lag (0,2 %; 95 %-Konfidenzintervall 0,15 % - 0,26 %; $p < 0,05$). Dieser Anstieg der Apoptoseinzidenz blieb auf das frühe Laktationsstadium begrenzt; am zehnten Tag *post partum* fand sich auch in Brustdrüsen transgener Weibchen wieder eine niedrige Apoptoserate (0,44 %; 95 %-Konfidenzintervall 0,12 % - 0,40 %), die der in Kontrolltieren entsprach (0,26 %; 95 %-Konfidenzintervall 0,12 % - 0,40 %; nicht signifikant). Somit ergibt sich aus dem engen zeitliche Fenster, in dem sich in laktierenden transgenen Mäusen ein Anstieg des programmierten Zelltods nachweisen ließ, eine weitere Parallele zum physiologischen Involutionsprozess, bei dem sich ebenfalls ein zeitlich beschränkter Anstieg der Apoptoserate findet.

3.6.2. Expression von Involutionenmarkern

Neben einer erhöhten Inzidenz des programmierten Zelltods ist die initiale Phase der Involution auch von charakteristischen Veränderungen auf Ebene der Genexpression begleitet. So konnte gezeigt werden, dass der Wachstumsfaktor TGF β 3 sowie IGFBP5, ein IGF-bindendes Protein, in dieser Phase verstärkt transkribiert werden. Die Veränderungen der Genexpression werden dabei ausschließlich von lokalen Faktoren induziert und sind unabhängig von Veränderungen systemischer Hormonspiegel (Nguyen und Pollard, 2000; Tonner *et al.*, 1997). Damit ist die Analyse des Expressionsniveaus dieser Gene geeignet, die Hypothese einer vorzeitigen Involution in PKN transgenen Mäusen zu überprüfen. Abbildung 3.26 zeigt die mit Hilfe von *Microarray*-Hybridisierungen gewonnenen Rohdaten zur Expression von TGF β 3 und IGFBP5 in Wildtypmäusen und transgenen Tieren am ersten Tag der Laktation. Wie auch schon in den vorangegangenen Experimenten wurden hierfür jeweils drei transgene Weibchen und drei Kontrolltiere untersucht.

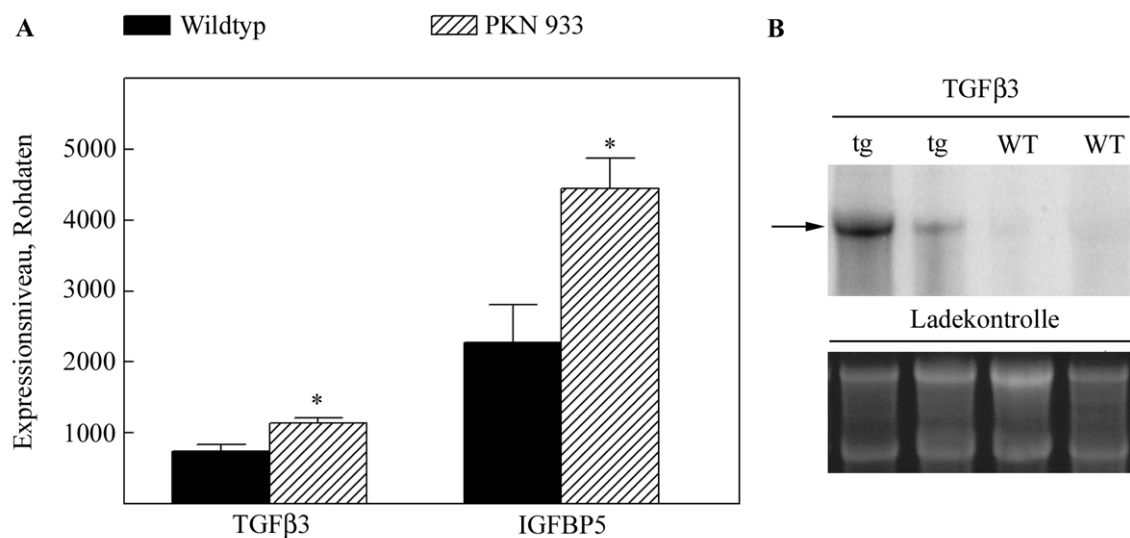


Abbildung 3.26: Expression involutionsassoziierter Gene am Beginn der Laktation.

A: TGF β 3- und IGFBP5-Expressionsniveaus am ersten Tag *post partum*, *Microarray*-Hybridisierung, Rohdaten. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardmessfehler.; *: $p < 0,05$

B: Northern Blot Hybridisierung zum Nachweis des Wachstumsfaktors TGF β 3 in transgenen (tg) und Wildtyptieren (WT) am zweiten Tag *post partum*. Der Pfeil kennzeichnet das spezifische Hybridisierungssignal; als Ladekontrolle ist im unteren Abschnitt die mit Ethidiumbromid gefärbte 18S und 28S RNA nach Northern Blot Transfer dargestellt.

Konsistent mit der Hypothese einer verfrüht einsetzenden Involution zeigten transgene Tiere mit einem durchschnittlichen Expressionsniveau von 1100 (95 %-Konfidenzintervall 990-1300) eine signifikant höhere Expression des Wachstumsfaktors TGF β 3 als Wildtypweibchen (durchschnittliche Rohexpression 740; 95 %-Konfidenzintervall 550 – 940; $p < 0,05$). Auch IGFBP5 war in PKN transgenen Brustdrüsen signifikant heraufreguliert (durchschnittliche Rohexpression 4500 vs. 2300, 95 %-Konfidenzintervalle 3600 – 5300 bzw. 1200 – 3300; $p < 0,05$).

Exemplarisch erfolgte die Validierung dieser Daten für den Wachstumsfaktor TGF β 3 durch Northern Blot Hybridisierung. Hierbei wurde Gewebe vom zweiten Tag der Laktation untersucht. Übereinstimmend mit Daten aus der Literatur lag die Expression von TGF β 3 in Wildtyptieren dieses Entwicklungsstadiums unterhalb der Nachweisschwelle einer Northern Blot Hybridisierung (Nguyen und Pollard, 2000). Wie Abbildung 3.26B demonstriert, zeigten im Gegensatz dazu transgene Tiere am zweiten Tag der Laktation deutliche Signale für dieses Gen. Die Parallelen zwischen dem Phänotyp PKN transgener Tiere während der Laktation und dem physiologischen Involutionsprozess konnten damit auch auf Ebene der Genexpression bestätigt werden.

3.7. Struktur und Funktion der *Zonulae occludentes* in transgenen Tieren

3.7.1. Analyse der tight junction Versiegelung *in vivo*

Die Versiegelung der *Zonulae occludentes* zwischen benachbarten Mammaepithelzellen konnte als Schlüsselkomponente im Prozess der Sekretionsaktivierung identifiziert werden und gilt als Voraussetzung für die Etablierung der Laktation (Itoh und Bissell, 2003; Nguyen und Neville, 1998). Da sich die frühesten morphologischen Veränderungen in PKN transgenen Tieren am ersten Tag *post partum* fanden, wurde untersucht, ob es in diesen Tieren zu einer Störung des tight junction Verschlusses kommt. Hierzu wurde die Technik der intraduktalen Injektion genutzt, bei der als Tracersubstanz radioaktiv markierte Saccharose in den Milchgang eingebracht wird (Nguyen *et al.*, 2001).

Da im Brustdrüsenepithel keine aktiven Transportmechanismen für Saccharose existieren, beschränken impermeable tight junctions die Verteilung der Markierungssubstanz auf das System der Milchgänge und Alveolen, während offene *Zonulae occludentes* zu einer Diffusion in das Interstitium mit nachfolgendem Übertritt in die systemische Zirkulation führen.

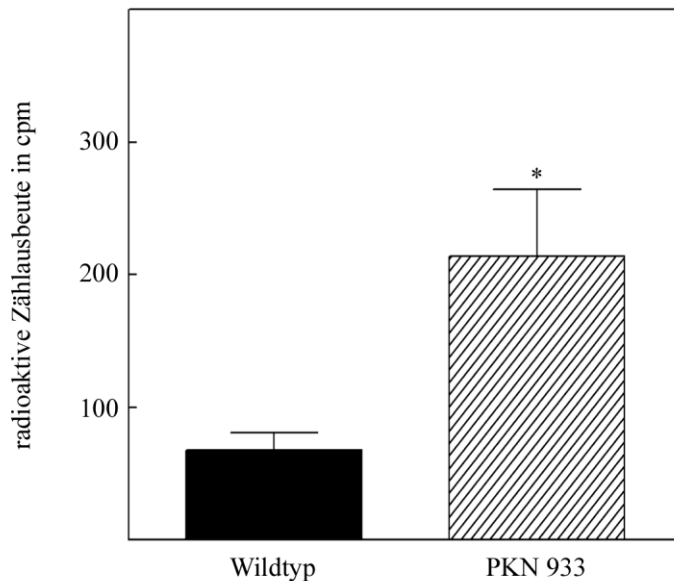


Abbildung 3.27: Tight junction Permeabilität *in vivo*. Dargestellt ist die mit einem Szintillationsdetektor bestimmte Zählausbeute in Blutproben nach intraduktaler Injektion von ^{14}C -markierter Saccharose. Die Fehlerbalken markieren den Standardmessfehler. *: $p < 0,05$

Die Radioaktivität in Blutproben der Versuchstiere dient dann als Indikator für die parazelluläre Permeabilität des Mammaepithels. Insgesamt wurden fünf transgene Weibchen und vier Kontrolltiere am ersten Tag *post partum* untersucht. Abbildung 3.27 stellt die radioaktive Zählausbeute, die mit Hilfe eines Szintillationsdetektors in Blutproben bestimmt wurde, in Abhängigkeit vom Genotyp dieser Tiere dar.

Es zeigte sich, dass transgene Weibchen mit einer durchschnittlichen Zählausbeute von 210cpm (95 %-Konfidenzintervall 120cpm – 310cpm) am ersten Tag der Laktation signifikant höhere Tracerkonzentrationen in der systemischen Zirkulation aufwiesen als Tiere der Vergleichsgruppe (durchschnittliche radioaktive Zählausbeute 68cpm, 95 %-Konfidenzintervall 42cpm – 94cpm, $p < 0,05$). Dies deutet auf eine funktionelle Beeinträchtigung der tight junction Versiegelung am Beginn der Laktationsphase in diesen Tieren hin. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob dieser funktionelle Defekt auch von strukturellen Alterationen der *Zonulae occludentes* begleitet war.

3.7.2. Analyse der tight junction Struktur *in vivo*

Die Morphologie der tight junctions in transgenen und genetisch nicht modifizierten Brustdrüsen wurde zunächst mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Hierzu wurden Aufnahmen genutzt, die durch Mitarbeiter des Instituts für Anatomie der Charité Universitätsmedizin Berlin angefertigt wurden.

Die *Zonulae occludentes* stellten sich hier als Bereiche am apikalen Zellpol dar, in denen der Interzellulärraum vollständig aufgehoben erscheint, wobei das dieser Morphologie zugrundeliegende Netzwerk anastomosierender Stränge nur in Gefrierbruchpräparaten sichtbar wird (Mitic und Anderson, 1998). Die Untersuchung PKN transgener Brustdrüsen am zweiten und zehnten Tag *post partum* ergab auf ultrastruktureller Ebene keine Hinweise auf eine Störung der tight junction Architektur. Dabei wurden für beide Zeitpunkte jeweils zwei transgene Weibchen und zwei Kontrolltiere analysiert.

Abbildung 3.28 demonstriert die Anwesenheit regelrecht konfigurierte *Zonulae occludentes* in Mammaepithelzellen transgener Tiere. Insbesondere Zellen in morphologisch veränderten Alveolen zeigten keinen Anhalt für pathologische Veränderungen der tight junction Architektur; eine Erweiterung des Interzellulärraums wurde auch in diesen Bereichen nicht beobachtet. Auch die weiter basal lokalisierten *Zonulae adherentes* sowie die Desmosomen zeigten in transgenen Brustdrüsen keine Auffälligkeiten. Dies deutet darauf hin, dass die demonstrierte Erhöhung der parazellulären Permeabilität in diesen Tieren nicht auf das völlige Fehlen von tight junctions in der Brustdrüse zurückgeführt werden kann.

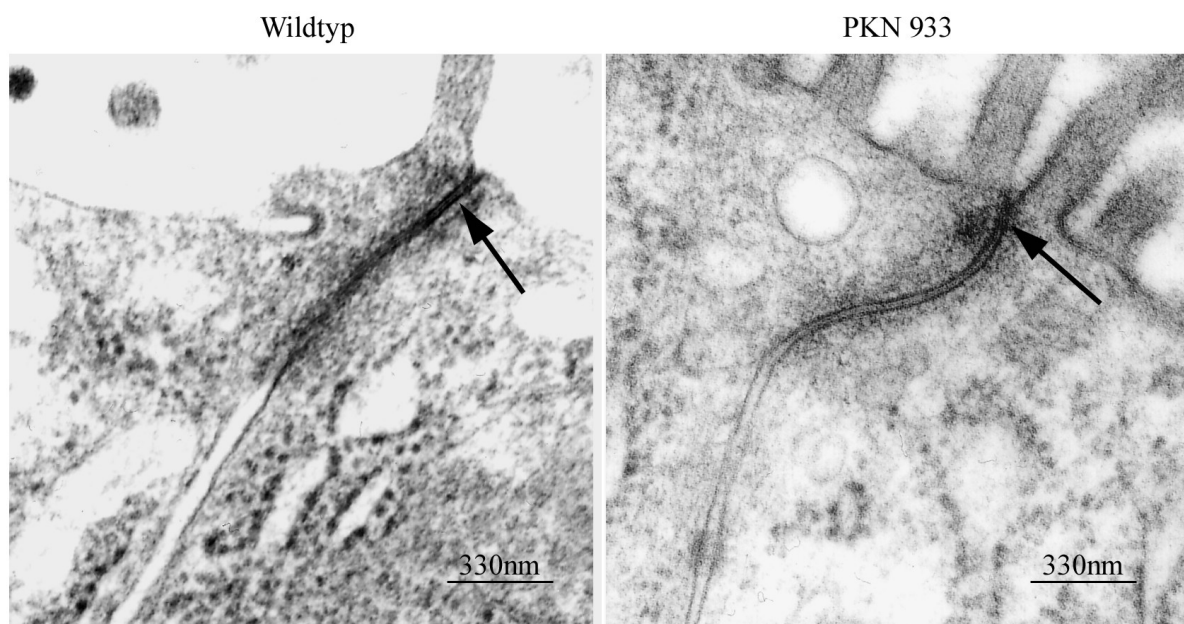


Abbildung 3.28: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung der apikalen Haftkomplexe am zweiten Tag *post partum*. Die Anfertigung dieser Aufnahmen erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts für Anatomie der Charité Universitätsmedizin Berlin. Die tight junction Strukturen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Um die Architektur der *Zonulae occludentes* auf molekularer Ebene zu beurteilen, wurde das tight junction assoziierte Protein ZO-1 mit Hilfe der Immunfluoreszenz in Brustdrüsengefrierschnitten vom ersten Tag *post partum* dargestellt. Hierfür wurden fünf transgenen Weibchen und fünf Kontrolltiere untersucht. Wie Abbildung 3.29 demonstriert, war ZO-1 dabei in beiden Gruppen im Bereich der apikalen Interzellulärverbindungen lokalisiert. In transgenen Brustdrüsen fanden sich fokale Areale eines im Vergleich zu Kontrolltieren verbreiterten ZO-1 Signals (Pfeil in Abbildung 3.29). Diese Areale waren ungleichmäßig über die analysierten Gewebeschnitte verteilt und nicht auf Alveolen beschränkt, deren Expansion am Beginn der Laktation ausgeblieben war. Eine generalisierte ZO-1 Umverteilung ins Zytoplasma konnte in keinem der untersuchten Gefrierschnitte beobachtet werden. Auch die subzelluläre Verteilung des im Bereich der *Zonulae occludentes* lokalisierten Transmembranproteins Occludin war in transgenen Tieren und Wildtypweibchen identisch (Daten nicht gezeigt).

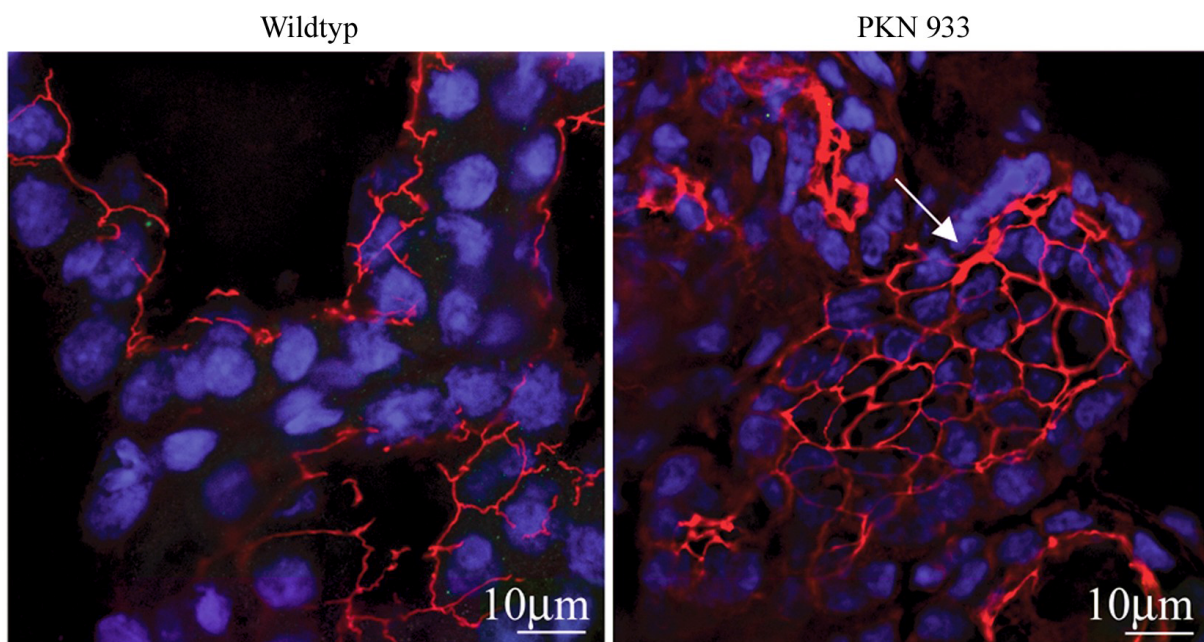


Abbildung 3.29: Immunhistochemische Darstellung des tight junction assoziierten Proteins ZO-1 in Brustdrüsengefrierschnitten vom ersten Tag *post partum*. ZO-1 wurde mit einem Cy3-gekoppelten Sekundäntikörper detektiert (rote Fluoreszenz); die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blaue Fluoreszenz). Um Fokusartefakte zu vermeiden wurden mehrere Aufnahmen entlang der z-Achse in 2 Ebenen projiziert; anschließend erfolgte eine elektronische Dekonvolution. 400fache Vergrößerung. Der Pfeil kennzeichnet Bereiche eines verbreiterten ZO-1 Signals in Mammaepithelzellen eines transgenen Tieres.

3.8. *In vitro* Untersuchungen zur Modulation der parazellulären Permeabilität durch PKN

3.8.1. Einfluss der PKN Aktivierung auf die tight junction Versiegelung *in vitro*

Die bisher beschriebenen Beobachtungen im *in vivo* System deuten darauf hin, dass die Expression der konstitutiv aktiven Proteinkinase N in der Brustdrüse zu einer Störung der tight junction Versiegelung am Beginn der Laktation führt. Da es sich bei der genetisch manipulierten Brustdrüse um ein hochkomplexes System handelt, besteht jedoch die Möglichkeit, dass dieser Effekt nicht primär Folge der Aktivierung der Protein Kinase N ist, sondern eine unspezifische Reaktion des biologischen Systems auf eine Störung der Homöostase durch die Expression eines Fremdproteins darstellt. Auch eine Vermittlung des Phänotyps über komplexe Wechselwirkungen zwischen genetisch manipulierten Zellen und Gewebestroma kann mit den bislang erhaltenen Daten nicht ausgeschlossen werden. Es wurde daher untersucht, ob sich die beobachteten Effekte der PKN Aktivierung auf die parazelluläre Permeabilität auch in einem einfacheren experimentellen System *in vitro* reproduzieren lassen. Als Zellkulturmodell wurden hierfür EpH4 Zellen gewählt, die auf einer spontan immortalisierten murinen Mammaepithelzelllinie basieren (Lopez-Barahona *et al.*, 1995; Reichmann *et al.*, 1992). Dieses System ist zum Studium der tight junction Versiegelung besonders geeignet, da sich dieser Prozess hier durch Zugabe von Glukokortikoiden zum Wachstumsmedium induzieren lässt (Prof. Margaret C. Neville, Denver, persönliche Mitteilung). Als Parameter zur Beurteilung der parazellulären Permeabilität diente die Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstands über einer Lage konfluenter Epithelzellen. Befinden sich die tight junctions in einem impermeablen Zustand, ist nach Anlage einer elektrischen Spannung die Ionenbewegung und damit der Stromfluss über einer solche Zellschicht eingeschränkt, was dem ohmschen Gesetz folgend in einem hohen transepithelialen Widerstand resultiert. Ist die parazelluläre Permeabilität hingegen hoch, führt die Anlage einer Spannung zu einem höheren Strom mit demzufolge geringerem transepithelialen Widerstand, so dass die parazelluläre Permeabilität negativ mit der Höhe des transepithelialen Widerstands korreliert.

Um die Effekte der PKN Aktivierung *in vitro* zu analysieren, wurden EpH4 Zellen stabil mit der konstitutiv aktiven Form der Proteinkinase N transfiziert. Hierzu wurde der Vektor pRC/RSV-PKN genutzt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Yasuhiro Ohashi, Osaka), der die mit dem FLAG-Epitop markierte Kinasedomäne der humanen PKN unter regulatorischer Kontrolle des RSV-Promotors sowie ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Neomycin enthält. Die Selektion stabil transfizierter Zellen erfolgte durch Zugabe des Neomycin-

Analogons G418 zum Wachstumsmedium der Zellen, wobei eine optimierte Konzentration verwendet wurde, die zum Untergang nicht transfizierter Zellen innerhalb von 10 Tagen führte. Kontrollzellen wurden analog nach Transfizierung des leeren pRC/RSV Vektors und Selektion mit G418 erhalten.

Um den Transfektionserfolg zu prüfen, wurde die Expression der konstitutiv aktiven Proteinkinase N mit Hilfe einer RT-PCR untersucht. Als Primer fanden wiederum die Sequenzen FLAG.for und PKN.rev Verwendung, die in transfizierten Zellen ein Fragment von 508 Basenpaaren amplifizierten (Abbildung 3.30). In den mit dem leeren Vektor transfizierten Kontrollzellen wurde hingegen kein Amplifizierungssignal detektiert. Zur Kontrolle der reversen Transkription zeigt Abbildung 3.30 ebenfalls ein amplifiziertes Fragment des murinen β -Aktin Gens. Zwischen PKN transfizierten EpH4 Zellen und Kontrollzellen bestanden weder morphologisch noch im Bezug auf das Wachstumsverhalten Unterschiede.

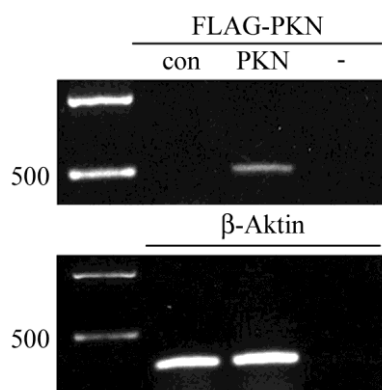


Abbildung 3.30: Nachweis der konstitutiv aktivierten Proteinkinase N in stabil transfizierten EpH4 Zellen. Im oberen Teil der Abbildung ist eine RT-PCR unter Verwendung der Primer FLAG.for und PKN.rev dargestellt, die ein spezifisches Fragment von 508 Basenpaaren amplifizieren. con: Kontrollzellen, PKN: transfizierte Zellen, -: Wasser als Negativkontrolle. Zur Kontrolle der reversen Transkription zeigt der untere Teil der Abbildung eine PCR unter Verwendung von Primern für das murine β -Aktin-Transkript. Alle Größenangaben in Basenpaaren.

Zur Untersuchung des Effektes einer PKN Aktivierung auf die tight junction Versiegelung wurde der transepitheliale Widerstand in transfizierte Zellen und Kontrollzellen mit und ohne Zugabe von Hydrokortison zum Wachstumsmedium bestimmt. Abbildung 3.31 gibt einen Überblick über die so in 3 unabhängigen Experimenten erhaltenen Ergebnisse, wobei in jeder Gruppe 12 (ohne Hydrokortisonzusatz) bzw. 15 (mit Hydrokortisonzusatz) Zellfilter ausgewertet wurden.

In Abwesenheit einer Glukokortikoidstimulation zeigte sich in beiden Gruppen ein langsamer Anstieg des transepithelialen Widerstandes, der nach 6 Tagen durchschnittlich Werte von $1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ in Kontrollzellen (95%-Konfidenzintervall $1200 \Omega \cdot \text{cm}^2 - 1900 \Omega \cdot \text{cm}^2$) bzw. $1700 \Omega \cdot \text{cm}^2$ in PKN transfizierte Zellen (95%-Konfidenzintervall $1300 \Omega \cdot \text{cm}^2 - 2100 \Omega \cdot \text{cm}^2$) erreichte.

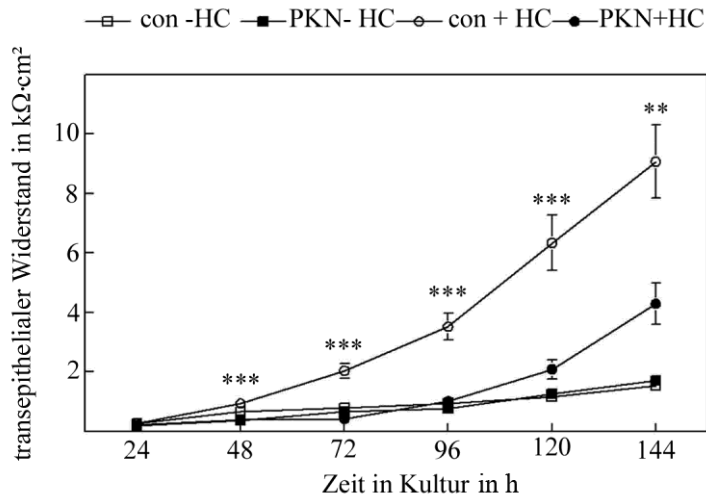


Abbildung 3.31: Effekt der PKN Aktivierung auf die parazelluläre Permeabilität *in vitro*.

Dargestellt ist der transepitheliale elektrische Widerstand in Abhängigkeit von der Zeit in PKN transfizierten und Kontrollzellen jeweils mit und ohne Hydrokortisonstimulation. Die Sterne kennzeichnen die Signifikanzniveaus hydrokortisonstimulierter Kontrollzellen gegenüber stimulierten Zellen, die die konstitutiv aktive Proteinkinase N exprimieren (***: $p < 0,0005$; **: $p < 0,005$).

con – HC: Kontrollzellen, keine Hydrokortisonstimulation. PKN – HC: PKN transfizierte EpH4 Zellen, keine Hydrokortisonstimulation. con + HC: Kontrollzellen, Hydrokortisonstimulation. PKN + HC: PKN transfizierte EpH4 Zellen, Hydrokortisonstimulation.

Dieser spontane Anstieg des transepithelialen Widerstandes reflektiert die ohne Glukokortikoidinduktion nur langsam ablaufende Versiegelung der *Zonulae occludentes* und konnte in Kontrollzellen und transfizierten Zellen mit identischer Kinetik beobachtet werden. Zu keinem Zeitpunkt der Analyse fanden sich hier statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Die Anreicherung des Wachstumsmediums mit Hydrokortison führte in Kontrollzellen zu einem schnellen Anstieg des transepithelialen Widerstandes, der bereits nach 48 Stunden signifikant über den in unstimulierten Zellen gemessenen Werten lag und als Zeichen der akzelerierten tight junction Versiegelung nach 6 Tagen Werte von durchschnittlich $9100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ erreichte (95%-Konfidenzintervall $6600 \Omega \cdot \text{cm}^2 - 11500 \Omega \cdot \text{cm}^2$). In PKN transfizierten Zellen blieb dieser stimulatorische Effekt des Hydrokortisons hingegen innerhalb der ersten 96 Stunden aus; ab dem fünften Tag nach Zugabe des Glukokortikoids wurde dann auch hier ein Anstieg des transepithelialen Widerstandes registriert, der aber erst 144 Stunden nach Glukokortikoidstimulation statistische Signifikanz gegenüber den nicht stimulierten Zellen erreichte und mit durchschnittlich $4300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (95%-Konfidenzintervall $2900 \Omega \cdot \text{cm}^2 - 5700$

$\Omega \cdot \text{cm}^2$) weiterhin deutlich unter den Werten in stimulierten Kontrollzellen lag. Der statistische Vergleich zwischen Kontrollzellen und PKN transfizierten Zellen zeigte ab 48 Stunden nach Beginn der Induktion durchgängig hochsignifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen, die in Abbildung 3.31 verdeutlicht sind. Die erhobenen Daten geben damit einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Aktivierung der Proteinkinase N die induzierte tight junction Versiegelung von Mammaepithelzellen *in vitro* inhibiert.

3.8.2. Einfluss der PKN Aktivierung auf die tight junction Struktur *in vitro*

Um zu überprüfen, welche Effekte die Expression der konstitutiv aktivierten Protein Kinase N in EpH4 Zellen auf die molekulare tight junction Architektur hat, wurde die Lokalisation der mit den *Zonulae occludentes* assoziierten Proteine Occludin und ZO-1 mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz analysiert. Hierzu wurden jeweils fünf Filter transfizierter und nicht transfizierter Zellen am zweiten und fünften Tag nach Beginn der Hydrokortisonstimulation untersucht. Zu keinem dieser Zeitpunkte fanden sich hierbei Unterschiede in der Lokalisation dieser Proteine. Wie Abbildung 3.32 an repräsentativen Beispielen demonstriert, blieben die Signale für ZO-1 und Occludin sowohl in Kontrollzellen als auch in PKN transfizierten EpH4 Zellen auf eine schmale Zone im Bereich der apikalen Interzellulärkontakte beschränkt. Eine Umverteilung dieser Proteine ins Zytoplasma transfizierter Zellen konnte in keinem Fall beobachtet werden; die *in vivo* dargestellte Verbreiterung des ZO-1 Signals fand sich *in vitro* nicht. Es ergaben sich damit keine Hinweise auf eine Störung der tight junction Formation als Korrelat der in PKN transfizierten Zellen beobachteten erhöhten parazellulären Permeabilität.

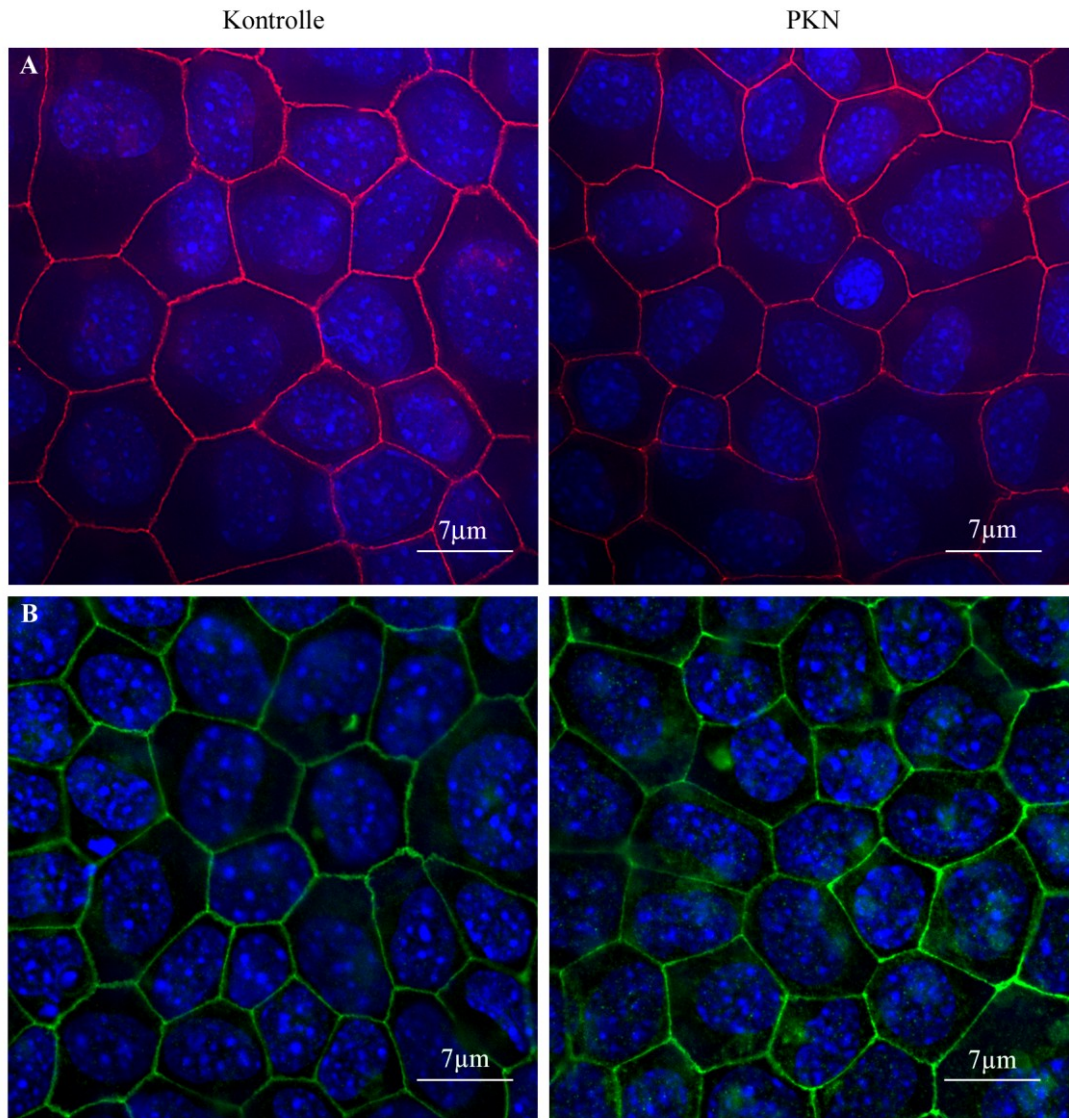


Abbildung 3.32: Immunzytochemische Analyse der molekularen tight junction Architektur in EpH4 Zellen nach Hydrokortisonstimulation für 120 Stunden.

A: Darstellung des tight junction assoziierten Proteins ZO-1 mit einem an das rote Fluorophor Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper. Kernfärbung mit DAPI (blaue Fluoreszenz). 600fache Vergrößerung, Ölimmersion.

B: Darstellung des tight junction Transmembranproteins Occludin mit einem an das grüne Fluorophor FITC gekoppelten Sekundärantikörper. Kernfärbung mit DAPI. 600fache Vergrößerung, Ölimmersion.