

4. Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit war die Grundcharakterisierung eines transgenen Tiermodells zum Studium des Rho-Effektormoleküls PKN *in vivo*. Dabei sollte zunächst die Frage beantwortet werden, ob die im Institut für Pharmakologie der Charité generierten Tiere zur funktionellen Charakterisierung dieses Moleküls geeignet sind. Mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Techniken konnte der Nachweis der PKN-Expression in zwei unabhängigen transgenen Linien geführt und mit einem funktionellen Defekt der Brustdrüse sowie charakteristischen histopathologischen Veränderungen korreliert werden. Damit wurden die Voraussetzungen dafür geschaffen, die Bedeutung der Proteinkinase N erstmals *in vivo* analysieren zu können. Die Untersuchung dieser Tiere sowie Experimente im *in vitro* System lieferten darüber hinaus erstmals Hinweise auf eine mögliche Bedeutung des Rho-Effektormoleküls PKN bei der Regulation der parazellulären Permeabilität.

Im Folgenden sollen die einzelnen Aspekte der molekularen Grundcharakterisierung des transgenen Tiermodells diskutiert werden. Es schließt sich eine Erörterung des beobachteten Phänotyps sowie die Diskussion möglicher Mechanismen der PKN-Wirkung auf die Funktion der *Zonulae occludentes* an. Abschließend wird ausgehend von der Gesamtheit der erhobenen Befunde ein Modell zur Interpretation des beobachteten Phänotyps vorgestellt und eine Einschätzung der Möglichkeiten und Grenzen des hier untersuchten Tiermodells gegeben.

4.1. Grundcharakterisierung des transgenen Modells

Die Charakterisierung grundlegender Parameter der Transgenintegration und –expression bildet die Voraussetzung für die Bewertung eines jeden transgenen Tiermodells. Ausgehend von den im Rahmen einer Dissertationsarbeit am Institut für Pharmakologie der Charité Universitätsmedizin Berlin erzeugten PKN transgenen Tieren (Stuckas, 2003) wurden zunächst die Linien 921, 924, 930, 933, 995 und 2501 etabliert und im Hinblick auf die Transgenintegration und –expression analysiert. Die genomische Integration der Transgensequenz konnte mit Hilfe einer spezifischen PCR-Analyse im Rahmen der Generierung dieser Mäuse nachgewiesen werden (Stuckas, 2003) und wurde in der vorliegenden Arbeit in Tieren der nachfolgenden Generationen bestätigt. Obgleich der genaue Ort der Transgenintegration unbekannt bleibt, belegt die durchgängig den mendelschen Gesetzen folgende und geschlechtsunabhängige Weitergabe des Transgens die autosomale Integration. Die Analyse der Transgenintegration wurde durch Southern Blot Hybridisierung in transgenen

Tieren der F1-Generationen vervollständigt, wobei sich keine Hinweise auf eine Mehrfachintegration der Transgensequenz ergaben. Damit konnte der Nachweis der erfolgreichen Etablierung von sechs transgenen Linien erbracht werden.

Im Rahmen der Expressionsanalyse wurde die Transkription der konstitutiv aktiven Proteinkinase N nur in zwei der sechs etablierten Linien nachgewiesen. Dabei kann naturgemäß nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Tiere der übrigen Linien das Transgen exprimieren, die Expressionsstärke hier aber unterhalb der Nachweisschwelle der verwendeten Analysemethoden liegt. Da mit der RT-PCR jedoch ein sehr sensitives Verfahren zur Detektion der Transgenexpression eingesetzt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass eine so nicht detektierbare Expression nur von geringer physiologischer Relevanz wäre, was ebenfalls durch das Fehlen phänotypischer Veränderungen in den Linien 921, 924, 931 und 2501 bestätigt wird. Die Beobachtung, dass die Transkription der konstitutiv aktiven Proteinkinase N nicht in allen etablierten Linien in gleichem Maße erfolgt, kann durch Positionseffekte als Resultat der ungerichteten Transgenintegration in das murine Genom erklärt werden. Hier existieren als Teil eines regulatorischen Netzwerks, das unter physiologischen Bedingungen die Genexpression kontrolliert, Elemente, die die Transkription eines Gens sowohl stimulieren (*Enhancer* Sequenzen) als auch inhibieren können (*Silencer* Sequenzen). Da die Transgensequenz nach Mikroinjektion in Vorkerne fertilisierter Eizellen an zufälliger Position des Mausgenoms integriert wird, kann sie unter den Einfluss solcher Regulationselemente geraten, so dass die effektive Transgenexpression in hohem Maße vom Integrationsort abhängig ist und zwischen verschiedenen transgenen Linien erheblich variieren kann (Übersicht bei Palmiter und Brinster, 1986). Die Beobachtung einer fehlenden oder nur sehr geringen Expression der konstitutiv aktiven Proteinkinase N in den Linien 921, 924, 931 und 2501 kann daher bei nachgewiesener Transgenintegration als charakteristische Folge der verwendeten Methode erklärt werden. Strategien, die beschriebenen Positionseffekte durch Einbringen spezifischer Kontrollsequenzen in das Transgenkonstrukt zu minimieren, wurden vorgeschlagen (Grosveld *et al.*, 1987), im hier bearbeiteten Modell aber nicht verwendet.

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Transgenexpression in Linie 933 zeigte eine Transkription der konstitutiv aktiven Proteinkinase N in allen Entwicklungsstadien der murinen Brustdrüse, wobei während der Laktation ein deutlich höheres Expressionsniveau beobachtet wurde. Dies steht in guter Übereinstimmung mit dem in anderen Modellen demonstrierten Expressionsprofil des MMTV-LTR-Promotors (Wagner *et al.*, 2001). Ursache hierfür ist ein

hormonsensibles Element in der Sequenz dieses Promotors, das nach Stimulation durch verschiedene Steroidhormone sowie Prolaktin zu einer Steigerung der Transkription MMTV-LTR-regulierter Transgene führt (Übersicht bei Günzburg und Salmons, 1992). Die erhöhte Expression der konstitutiv aktiven Proteinkinase N während der späten Trächtigkeit und Laktation ist daher Folge der in diesen Phasen erhöhten Progesteron- bzw. Prolaktinspiegel und entspricht den Erwartungen an ein MMTV-LTR-reguliertes Transgen.

Auch die Beobachtung, dass sich mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung Transkripte der konstitutiv aktiven Proteinkinase N innerhalb der Brustdrüse ausschließlich in epithelialen Zellen, nicht aber im Stroma, nachweisen ließen, steht in guter Übereinstimmung mit dem aus anderen Studien bekannten Expressionsprofil des MMTV-LTR-Promotors (Wagner *et al.*, 2001). Insbesondere die mosaikartige Expression, bei der transgene Transkripte nur in einer Auswahl von Mammaepithelzellen nachgewiesen werden können, stellt eine Grundeigenschaft dieses Promotors dar (Faraldo *et al.*, 1998). Als Ursachen für dieses Phänomen werden zellspezifische Transgeninaktivierungsmechanismen diskutiert, die im Zusammenhang mit dem Integrationsort, der Anzahl der an einem Ort integrierten Transgenkopien sowie zellspezifischen Methylierungsprozessen stehen (Übersicht bei Dobie *et al.*, 1997).

Obwohl der MMTV-LTR-Promotor häufig zur spezifischen Expression von Transgenkonstrukten in der Brustdrüse genutzt wird, zeigen zahlreiche Daten aus der Literatur, dass die Aktivität dieses Promotors nicht auf das Mammaepithel beschränkt ist. Neben Speicheldrüsen, Hoden, Epididymis und Vesicula seminalis konnte die Expression MMTV-LTR-gesteuerter Transgene so unter anderem auch in verschiedenen hämatopoetischen Zellen, Leber, Trachea und Gehirn nachgewiesen werden, wobei die räumliche Verteilung der Transgenexpression zwischen verschiedenen Linien variieren kann und offensichtlich im Zusammenhang mit dem Integrationsort des Transgens steht (Wagner *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Expression der konstitutiv aktiven Proteinkinase N neben der Brustdrüse auch in einer Auswahl anderer Organe untersucht, wobei sich ebenfalls Unterschiede zwischen den analysierten Linien fanden. So konnte in Tieren der Linie 995 weder mittels RT-PCR noch durch Northern Blot Hybridisierung eine Expression des Transgens außerhalb der Brustdrüse gesichert werden, während Tiere der Linie 933 die konstitutiv aktive Proteinkinase N auch in Organen des männlichen Reproduktionstrakts sowie in der Ohrspeicheldrüse exprimierten. Dabei fanden sich in der orientierenden histologischen Beurteilung dieser Organe mit Ausnahme des Nebenhodens keine Auffälligkeiten; die Existenz subtilerer Defekte kann ohne weiterführenden Analysen aber nicht ausgeschlossen werden. Die Relevanz der im

Epididymis transgener Männchen beobachteten Veränderungen war nicht Gegenstand dieser Arbeit und wurde daher zunächst nicht weiterführend analysiert; die fehlende Einschränkung der Fertilität dieser Tiere spricht jedoch gegen eine funktionelle Wirksamkeit dieser Defekte. Da die Transgenexpression außerhalb der Brustdrüse lediglich in einer Linie nachgewiesen werden konnte, kann bei der Beurteilung eventueller Veränderungen in diesen Organen der Stellenwert einer möglichen Integrationsmutagenese nicht in ausreichendem Maße beurteilt werden. Das hier bearbeitete Tiermodell ist daher zum gegenwärtigen Zeitpunkt zur Analyse von PKN-Effekten außerhalb der Brustdrüse nur bedingt geeignet. Stöcklin und Mitarbeiter demonstrierten jedoch, dass die Expression MMTV-LTR-regulierter Gene außerhalb der Brustdrüse nicht in jedem Fall an eine Transgenexpression im Mammaepithel gebunden ist (Stöcklin *et al.*, 1993), so dass eine Analyse der übrigen Linien im Hinblick auf eine mögliche PKN-Expression im epididymalen Epithel unter Umständen die Voraussetzungen für eine weiterführende Analyse liefern könnte.

Die Expressionsanalyse wurde durch die Untersuchung der Transgenexpression auf Proteinebene vervollständigt. Auf Grund der hohen Homologie zwischen der murinen und humanen Proteinkinase N ist ein selektiver Nachweis des Transgens durch Antikörper gegen die humane Proteinkinase N nicht sicher möglich. Daher wurde zur spezifischen Detektion des Transgens das N-terminal lokalisierte FLAG-Epitop genutzt. Die erhältlichen anti-FLAG-Antikörper zeigten im Western Blot eine nur unzureichende Spezifität, so dass in verschiedenen Konzentrationen sowohl in transgenen als auch in Kontrollbrustdrüsen eine ganze Reihe von Proteinen detektiert wurden. Ursache hierfür könnte eine zu geringe Konzentration der konstitutiv aktiven Proteinkinase N in den hergestellten Proteinextrakten sein, so dass ein sicherer Nachweis des Proteins durch den Antikörper verhindert wird. Darüber hinaus stellt die Isolierung eines endogenen Proteins der Ratte, dessen Aminosäuresequenz eine ausgeprägte Homologie zum FLAG Epitop zeigt, die Spezifität dieser Sequenz zur Markierung transgener Proteine in Frage (Schäfer und Braun, 1995). Daher wurde zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität der Nachweismethode ein Immunpräzipitationsansatz etabliert, in dem nur solche Proteine detektiert werden, die sowohl mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop als auch mit einem anti-PKN-Antikörper reagieren. Der so erfolgte selektive Nachweis eines Proteins der erwarteten Größe in den Linien, in denen die Expression des Transgens auf RNA-Ebene gezeigt wurde, lässt darauf schließen, dass Mammaepithelzellen in Tieren dieser Linien das transgene Protein auch translatieren. Mit dem Nachweis des transgenen Proteins in zwei unabhängigen Linien wurde damit die Voraussetzung zur funktionellen Analyse der Proteinkinase N *in vivo* geschaffen.

4.2. Phänotypische Veränderungen in Brustdrüsen transgener Tiere

4.2.1. Allgemeine Einordnung des beobachteten Phänotyps

Durch die Analyse der Gewichtsentwicklung von Jungtieren der Linien 933 und 995 sowie die durchgeführten Austauschexperimente konnte demonstriert werden, dass die Expression der konstitutiv aktiven Proteinkinase N im Mammaepithel transgener Tiere mit einer verminderten Laktationskompetenz assoziiert ist. Ein derartiger Laktationsdefekt ist eine häufige Beobachtung in Tieren, deren Brustdrüse genetisch modifiziert wurde, und kann grundsätzlich auf Störungen in jeder Phase der Brustdrüsenentwicklung zurückzuführen sein (Übersicht bei Hadsell, 2004). Obwohl eine potenzielle Rolle der Proteinkinase N bei der Regulation dieser Prozesse bislang nicht untersucht wurde, zeigt der Nachweis eines Laktationsdefekts in transgenen Tieren, die die konstitutiv aktive RhoA-Mutante RhoAV14 unter der regulatorischen Kontrolle des MMTV-LTR-Promotors exprimieren, dass Rho-abhängige Signaltransduktionsprozesse mit der Entwicklung der Brustdrüse interferieren können. Da sich aber in RhoAV14 transgenen Tieren bereits während der Trächtigkeit erste morphologische Veränderungen zeigten, die auf eine Störung von Differenzierungsprozessen während der lobuloalveolären Entwicklung hindeuteten (Stuckas, 2003), stellt das hier beschriebene Tiermodell keine phänotypische Kopie der RhoA-Aktivierung dar. Dies demonstriert, dass zumindest einzelne Aspekte der in RhoAV14 transgenen Tieren beschriebenen Veränderungen unabhängig von einer Aktivierung der Proteinkinase N vermittelt werden und unterstreicht die Stellung der kleinen GTPase RhoA als Divergenzpunkt im Signaltransduktionsnetz der Zelle. Eine gezielte Analyse der Rolle, die die Proteinkinase N in der Genese des Phänotyps RhoAV14 transgener Tiere spielt, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich, da die in diesen Tieren während der Trächtigkeit beobachtete Differenzierungsstörung zu einer Maskierung potenzieller PKN-Effekte am Beginn der Laktation führen würde. Die Entwicklung pharmakologischer Inhibitoren, die spezifisch mit einzelnen Rho-Effektoren interferieren, könnte einen wertvollen Beitrag zur weiteren Aufschlüsselung der Signaltransduktionsprozesse unterhalb von RhoA und ihrem Beitrag zu den beschriebenen phänotypischen Veränderungen leisten.

Auch für Rac3, eine Isoform des PKN aktivierenden Moleküls Rac1, wurde ein Einfluss auf Entwicklungsprozesse in der Brustdrüse beschrieben. Transgene Tiere, die unter der regulatorischen Kontrolle des MMTV-LTR-Promotors eine konstitutiv aktive Form dieses Moleküls exprimieren, zeigen ebenfalls eine verminderte Laktationskompetenz, deren Ursache jedoch bislang nicht geklärt werden konnte (Leung *et al.*, 2003). Morphologische Veränderungen, die mit diesem funktionellen Defekt assoziiert waren, wurden von den Autoren

nicht beschrieben und können daher nicht mit den phänotypischen Alterationen in PKN transgenen Tieren verglichen werden. Da die Rac3-Sequenz im Vergleich zu Rac1 jedoch Abweichungen im Bereich einiger Aminosäuren aufweist, die für die Rac1-PKN-Interaktion essenziell sind (Haeusler *et al.*, 2003), ist eine Aktivierung der Proteinkinase N durch Rac3 fraglich und bislang nicht belegt. Die in Rac3 transgenen Tieren beschriebene Verzögerung des Involutionsprozesses sowie die Ausbildung benigner Mammatumoren (Leung *et al.*, 2003) wurde im hier vorgestellten Tiermodell nicht beobachtet und ist damit vermutlich nicht die Folge einer deregulierten PKN-Aktivierung.

Im Folgenden sollen die während der verschiedenen Entwicklungsphasen in PKN transgenen Tieren beobachteten phänotypischen Veränderungen im Einzelnen interpretiert sowie mögliche Mechanismen ihrer Genese diskutiert werden.

4.2.2. Phänotypische Veränderungen in virginen und trächtigen Tieren

Obwohl transgene Tiere, wie in Abschnitt 3.1.2.2. am Beispiel der Linie 933 demonstriert, die konstitutiv aktive Proteinkinase N in allen Phasen der Brustdrüsenentwicklung exprimierten, konnte vor Beginn der Laktation auf morphologischer Ebene kein konsistenter Phänotyp nachgewiesen werden. Unregelmäßig nachweisbare Störungen der Differenzierung des Milchgangsystems in virginen Tieren der Linie 995 können nicht sicher einem spezifischen Effekt des Transgens zugeordnet werden, da entsprechende Veränderungen in Linie 933 fehlten. Wie bereits diskutiert deutet das isolierte Auftreten dieses Phänotyps in nur einer Linie mit Betonung in homozygot transgenen Tieren auf einen Einfluss des Transgenintegrationsortes hin. Ein inverser Effekt, in dem phänotypische Veränderungen in virginen Tieren der Linie 933 durch den Ort der Transgenintegration maskiert werden, erscheint demgegenüber sehr unwahrscheinlich. Die Verifizierung dieser Hypothese ist auf Basis der vorliegenden Daten nicht möglich.

Eine potenzielle Ursache für das Fehlen eines konsistent nachweisbaren Phänotyps in PKN transgenen Tieren vor Beginn der Laktation könnte in den spezifischen Eigenschaften des MMTV-LTR-Promotors liegen, da dieser, wie in Abschnitt 3.1.2.2. gezeigt, in virginen Tieren und während der ersten Hälfte der Trächtigkeit nur eine geringe Transgenexpression vermittelt. Daten aus der Literatur belegen jedoch, dass geeignete Transgene auch unter der Kontrolle dieses Promotors zu phänotypischen Effekten im virginen oder trächtigen Tier führen können (Jager *et al.*, 2003). Es erscheint daher wahrscheinlicher, dass die in frühen Stadien der Brustdrüsenentwicklung ablaufenden Vorgänge durch die Expression der konstitutiv aktiven

Proteinkinase N nicht gestört werden oder eine solche Störung zumindest ohne morphologische Auswirkungen bleibt. Auch in der Literatur fehlen Daten, die eine potenzielle Bedeutung der Proteinkinase N für der Regulation der Brustdrüsenentwicklung im virginalen Stadium oder während der Trächtigkeit beschreiben. Hier deuten die veröffentlichten Daten vielmehr darauf hin, dass der Einfluss der kleinen GTPase RhoA auf die Morphogenese des murinen Milchgangsystems über eine Signaltransduktionsachse vermittelt wird, die die Serin/Threonin-Kinase Rock, das Insulinrezeptorsubstrat IRS1 und den Transkriptionsfaktor CREB beinhaltet (Chakravarty *et al.*, 2003; Sordella *et al.*, 2002).

4.2.3. Phänotypische Veränderungen am Beginn der Laktation

Mit Beginn der Laktation zeigten transgene Tiere beider Linien deutliche morphologische Veränderungen. Wie in Abschnitt 3.3.2. beschrieben, wiesen diese eine ausgeprägte inter- und intraindividuelle Variabilität auf, die mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung mit lokalen Unterschieden der Transgenexpression korreliert werden konnten. Der Nachweis regelrecht differenzierter Areale innerhalb der Brustdrüsen PKN transgener Tiere spricht gegen die Hypothese, dass systemische Faktoren wie zum Beispiel die Konzentration laktogener Hormone primär an der Ausbildung des beobachteten Phänotyps beteiligt sind, da in diesem Fall eine uniforme Reaktion des Brustdrüsengewebes zu erwarten wäre. Gleiches würde für den unwahrscheinlichen Fall gelten, dass die Ausprägung der morphologischen Auffälligkeiten Folge einer in beiden Linien auftretenden Integrationsmutagenese mit Modifikation eines anderen Genlocus ist.

Wie beschrieben bildete die ausbleibende Expansion der Alveolen einen Kernbefund in transgenen Brustdrüsen am ersten Tag *post partum*. Ursache für die Erweiterung der alveolären Lumina ist unter physiologischen Bedingungen der Beginn der Milchsekretion, der zu einer Distension des Milchkompartiments führt. Der immunhistochemische Nachweis von β -Casein in den Lumina morphologisch veränderter Alveolen deutet darauf hin, dass auch in transgenen Tieren mit der Geburt der Jungtiere die Milchsekretion einsetzt. Auch die histologische Darstellung normal konfigurierter intrazellulärer Lipidtropfen sowie die unauffällige Expression der Milchproteine WAP, β -Casein, α -Laktalbumin und WDNM auf RNA-Ebene sprechen gegen eine generalisierte Differenzierungsstörung in genetisch modifizierten Mammaepithelzellen, so dass die fehlende alveoläre Expansion am Beginn der Laktation nicht das Resultat einer ausbleibenden Milchsekretion zu sein scheint. Eine zweite Voraussetzung für das Ablaufen dieses Prozesses ist die Versiegelung der *Zonulae occludentes* zwischen benachbarten

Mammaepithelzellen, da es erst durch eine intakte strukturelle Barriere zwischen Milchkompartiment und Interstitium zu einer mechanischen Distension der Alveolen kommen kann. Die in Abschnitt 3.7.1. demonstrierten Daten deuten auf eine Störung in der Formierung dieser Barriere hin. Obwohl die Konsequenzen einer beeinträchtigten tight junction Versiegelung auf morphologischer Ebene bislang nicht beschrieben wurden, erscheint es plausibel, von einem Efflux von Milchbestandteilen ins Interstitium auszugehen, der in einer ausbleibenden Expansion der alveolären Lumina resultieren würde. Der Nachweis kleinlumiger Alveolen in transgenen Tieren kann somit als Folge einer nur unzureichend ausgebildeten Barriere zwischen Milchkompartiment und Interstitium erklärt werden.

Als zweites Charakteristikum fand sich in Alveolen PKN transgener Weibchen während der Laktation ein kondensiert erscheinendes Sekretionsprodukt, das sich konventionell-histologisch als amorphe eosinophile Substanz darstellte. Das Erscheinungsbild dieses Sekretionsprodukts ähnelte dabei, wie in Abschnitt 3.3.2. gezeigt, akkumulierter Milch in Wildtyptieren während der Involution. Auch der Vergleich mit der immunhistochemischen β -Casein-Darstellung deutet darauf hin, dass Milchproteine einen wesentlichen Bestandteil der beschriebenen eosinophilen Ablagerungen in den Lumina nicht expandierter Alveolen bilden. Auch hier kann auf Basis einer Hypothese die gestörte Versiegelung der *Zonulae occludentes* zwischen benachbarten Mammaepithelzellen als Erklärungsansatz herangezogen werden. So würde in diesem Modell die nur unvollständig ausgeprägte Barriere zwischen den Kompartimenten der Brustdrüse zu einem Efflux von Wasser und niedermolekularen Milchbestandteilen ins Interstitium mit einer konsekutiven Änderung der physikochemischen Milcheigenschaften führen. Ob und in welcher Weise diese potenziell veränderten Milcheigenschaften für das Auftreten des intraluminal beobachteten kondensierten Sekretionsprodukts verantwortlich sind, konnte experimentell nicht geklärt werden; eine proteinbiochemische Analyse der Zusammensetzung des dargestellten viskösen Sekretionsprodukts könnte aber Gegenstand weiterführender Studien sein.

4.2.4. Phänotypische Veränderungen im weiteren Verlauf der Laktation

Die histologische Analyse zeigte in transgenen Tieren im weiteren Verlauf der Laktation einen progredienten Verlust epithelialen Gewebes, der von einem lipomatösen Umbau der Brustdrüse begleitet wurde. Diese Veränderungen wiesen auf morphologischer Ebene deutliche Parallelen zur physiologischen Rückbildung der Brustdrüse nach Abschluss der Laktation auf, so dass die Hypothese einer vorzeitig erfolgenden Involution aufgestellt wurde. In diesem Fall sollte die Abnahme der Anzahl epithelialer Zellen während des Laktationsprozesses auf eine erhöhte

Apoptoserate zurückzuführen sein. Übereinstimmend hiermit zeigten sich in den Lumina der Alveolen und Milchgänge transgener Tiere am zweiten Tag *post partum* gehäuft Apoptosekörperchen, während sich keine histologischen Hinweise auf einen nekrotischen Gewebeuntergang fanden. Insbesondere konnte histologisch kein entzündliches Begleitinfiltrat nachgewiesen werden. Die Quantifizierung apoptotischer Zellen mit Hilfe des TUNEL-Verfahrens bestätigte einen Anstieg der Apoptoseinzidenz in der Frühphase der Laktation, so dass die Gesamtheit dieser Befunde für eine wesentliche Rolle des programmierten Zelltods in der Genese des beobachteten Regressionsprozesses spricht. Der in transgenen Tieren am zweiten Tag *post partum* beobachtete Anteil von zirka 3,6 % apoptotischen Zellen liegt dabei im Bereich der Apoptoseraten, die in anderen Studien für Wildtyptiere während früher Involutionsphasen ermittelt wurden (Li *et al.*, 1997).

Die Frage, ob der beschriebene Anstieg der Apoptoseinzidenz eine direkte Folge der PKN-Expression ist oder als sekundäres Phänomen im Rahmen des stereotyp ablaufenden Involutionsprozesses gewertet werden muss, ist von entscheidender Bedeutung für die Interpretation des beobachteten Phänotyps. Eine direkte Induktion des programmierten Zelltods durch die konstitutive Aktivierung der Proteinkinase N würde unweigerlich auch zu einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität führen, womit in diesem Fall die Störung der tight junction Versiegelung in PKN transgenen Tieren lediglich die Folge des PKN-induzierten apoptotischen Zellsterbens wäre. In der Tat konnten Takahashi und Mitarbeiter zeigen, dass es im Rahmen des Apoptoseprozesses zu einer proteolytischen Spaltung der Proteinkinase N durch eine Caspase kommt und dabei ein konstitutiv aktives Fragment dieses Moleküls generiert wird, so dass über eine mögliche kausale Rolle der Proteinkinase N im Apoptoseprozess spekuliert wurde (Takahashi *et al.*, 1998). Zur Überprüfung dieser Hypothese untersuchten Ueyama und Mitarbeiter die Inzidenz des programmierten Zelltods in einem Rattenmodell nach Embolisierung der A. cerebri media. Obwohl hier hohe Konzentrationen des konstitutiv aktiven PKN Fragments nachgewiesen werden konnten, zeigten sich in der betroffenen Zellpopulation keine Hinweise auf eine gesteigerte Apoptoseinzidenz, so dass die Expression einer konstitutiv aktiven Form der Proteinkinase N *in vivo* nicht hinreichend für die Induktion des programmierten Zelltods ist und die Entstehung des beschriebenen konstitutiv aktiven Fragments eher als Epiphänomen im Rahmen des Apoptoseprozesses gewertet werden muss (Ueyama *et al.*, 2001).

Auch aus *in vitro* Studien wurden bislang keine Daten publiziert, die für eine aktive Rolle der Proteinkinase N bei der Initiierung des Apoptoseprozesses sprechen. Übereinstimmend hiermit zeigten EpH4-Zellen, die im Rahmen dieser Arbeit mit der konstitutiv aktiven Proteinkinase N

transfiziert wurden, keine Zeichen des programmierten Zelltods. Zusammenfassend wird damit die Hypothese eines PKN induzierten apoptotischen Zellsterbens in transgenen Tieren von den bislang veröffentlichten Daten nicht unterstützt. Weiterhin sprechen auch die erhobenen Daten zur Transgenexpression gegen eine solche Annahme: Wäre der am Beginn der Laktation beobachtete Anstieg der Apoptoserate direkt durch die Wirkung der konstitutiv aktiven Proteinkinase N bedingt, sollte es unter diesen Umständen zu einem überwiegenden Untergang transgenexprimierender Zellen kommen. Damit müsste jedoch aufgrund der Verminderung PKN-exprimierender Mammaepithelzellen bei überwiegender Erhalt von Zellen, die das Transgen nicht exprimieren, die relative Stärke der Transgenexpression im Verlauf der Laktation abnehmen. Dies ist, wie in Abschnitt 3.1.2.2. demonstriert, nicht der Fall. Dagegen deutet die relative Konstanz der Expressionsstärke während der Laktationsphase darauf hin, dass transgenexprimierende Zellen und solche Zellen, in denen es zu keiner Transkription der konstitutiv aktiven Proteinkinase N kommt, gleichermaßen vom Anstieg der Apoptoseinzidenz betroffen sind. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der in PKN transgenen Tieren beobachtete Anstieg des programmierten Zelltods keine direkte Konsequenz der Transgenexpression ist, sondern vielmehr als sekundäres Phänomen im Rahmen des vorzeitig ablaufenden Involutionsprozesses verstanden werden muss, der durch eine Störung in der Phase der Sekretionsaktivierung induziert wird. Der Involutionsprozess ist dabei analog zu den Beobachtungen in PKN transgenen Mäusen während der Laktation ebenfalls durch eine initiale Apoptosewelle gekennzeichnet, auf die eine Phase des lipomatösen Umbaus folgt, während derer die Inzidenz des programmierten Zelltods erneut auf basale Werte absinkt (Furth *et al.*, 1997).

Die Parallele zwischen den Veränderungen in PKN transgenen Tieren während der Laktation und dem physiologischen Involutionsprozess konnte auch auf Ebene der Genexpression bestätigt werden. Durch die Arbeiten von Nguyen und Pollard sowie Tonner und Mitarbeitern konnte die vermehrte Expression des Wachstumsfaktors TGF β 3 sowie des IGF-bindenden Proteins IGFBP5 als charakteristischer Indikator für eine frühe Phase der Involution identifiziert werden (Nguyen und Pollard, 2000; Tonner *et al.*, 1997). Konsistent mit der Hypothese einer vorzeitigen Involution fanden sich in PKN transgenen Tieren während früher Laktationsstadien für beide dieser Gene signifikant erhöhte Expressionsniveaus. Zusammenfassend zeigen PKN transgene Tiere damit während der Laktation Veränderungen, die sowohl morphologisch als auch funktionell und molekular deutliche Parallelen zum Involutionsprozess aufweisen. Es erscheint daher plausibel, dass in diesen Tieren eine Reaktionskaskade induziert wird, die den in Wildtyptieren während der Involution ablaufenden Vorgängen entspricht.

Auslöser für die physiologische Rückbildung der Brustdrüse ist die Akkumulation von Milch in den *Ductus lactiferi* und Alveolen nach Abschluss der Laktation, wenn die Jungtiere beginnen, ihre Ernährung umzustellen (Li *et al.*, 1997). Beobachtungen in Versuchstieren, deren Milchgang experimentell versiegelt wurde, zeigen, dass die Induktion des Involutionsprozesses allein durch Behinderung des Milchabflusses möglich ist (Li *et al.*, 1997). Konsistent mit diesem Bild zeigten auch Mäuse, in denen als Folge der Expression des myc-Onkogens die Milchsekretion bereits während der Trächtigkeit und damit in einer Phase einsetzt, in der der Milchabfluss nicht erfolgen kann, einen Phänotyp der vorzeitigen Involution (Blakely *et al.*, 2005). Wie beschrieben ergab die histologische Analyse der PKN transgenen Tiere ebenfalls deutliche Anhaltspunkte für eine Milchakkumulation und zeigt damit einen möglichen Erklärungsansatz zur Interpretation des beobachteten Phänotyps auf. Die Genese dieser postulierten Milchstase konnte experimentell nicht eindeutig geklärt werden; ausgehend von den im Folgenden diskutierten Beobachtungen wird jedoch im Abschnitt 4.4. ein Modell vorgestellt, das den in PKN transgenen Tieren beobachteten Phänotyp auf Basis einer Hypothese als Folge einer durch die PKN Expression gestörten tight junction Versiegelung erklärt.

4.3. Rolle der Proteinkinase N bei der Regulation der parazellulären Permeabilität

4.3.1. Allgemeine Einordnung des beobachteten Phänotyps

Mit Hilfe der intraduktalen Injektion radioaktiv markierter Saccharose, einer validen Methode zur Beurteilung der tight junction Funktionalität *in vivo* (Nguyen *et al.*, 2001), konnte am ersten Tag *post partum* der Nachweis einer erhöhten parazellulären Permeabilität im Mammaepithel PKN transgener Tiere erbracht werden. Grundsätzlich kann diese Beobachtung vor dem Hintergrund der demonstrierten Parallelen zwischen dem Phänotyp laktierender transgener Tiere und dem physiologischen Involutionsprozess als Folge der Brustdrüsenrückbildung interpretiert werden, bei der es im Zuge des apoptotischen Zelluntergangs auch zu einer Kompromittierung der interzellulären Barriere kommt. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, dass die demonstrierte Erhöhung der parazellulären Permeabilität in transgenen Tieren einen direkten Effekt der PKN-Aktivierung reflektiert und potenziell an der Induktion des Involutionsprozesses beteiligt ist. Zur Klärung dieser Frage wurde die Versiegelung der *Zonulae occludentes* auch in einem *in vitro* System studiert, in dem ein komplexer Prozess wie die Brustdrüseninvolution nicht ablaufen kann. Wie beschrieben hatte die PKN-Aktivierung in EpH4-Zellen keine Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten; Zeichen des programmierten Zelltods fanden sich nicht. Auch die in

Abwesenheit einer Glukokortikoidstimulation langsam ablaufende Formierung funktioneller tight junctions erfolgte in transfizierten und Kontrollzellen mit identischer Kinetik, so dass sich insgesamt keine Anhaltspunkte für eine gravierende Störung der Zellhomöostase durch die Aktivierung der Proteinkinase N ergaben. Die Beobachtung, dass PKN-transfizierte Zellen nach Glukokortikoidstimulation eine hochsignifikante Verminderung des transepithelialen Widerstandes zeigten, gibt damit einen deutlichen Hinweis auf einen selektiven Effekt der PKN-Aktivierung auf die induzierte Versiegelung der *Zonulae occludentes* und spricht gegen die Hypothese, dass die *in vivo* beobachtete Erhöhung der parazellulären Permeabilität nur Folge des vorzeitig ablaufenden Involutionsprozesses ist.

Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, dass trotz des hochsignifikanten Effekts der PKN Aktivierung auf die glukokortikoidinduzierte tight junction Versiegelung *in vitro* transfizierte EpH4 Zellen eine regelrechte Lokalisation der Proteine ZO-1 und Occludin im Bereich der apikalen Interzellulärkontakte zeigten. Dies spricht dafür, dass die PKN-Aktivierung primär mit dem Prozess der tight junction Versiegelung und weniger mit der Formierung der *Zonulae occludentes* interferiert. Auch *in vivo* war die demonstrierte Erhöhung der parazellulären Permeabilität im Mammaepithel transgener Tiere nicht von offensichtlichen Alterationen im ultrastrukturellen Erscheinungsbild der tight junctions begleitet. Dabei muss berücksichtigt werden, dass elektronenmikroskopisch nicht zwischen transgenexprimierenden Mammaepithelzellen und solchen Zellen unterschieden werden kann, die aufgrund der Eigenschaften des MMTV-LTR Promotors die konstitutiv aktive Proteinkinase N nicht exprimieren. Die gezielte Beurteilung der *Zonulae occludentes* in genetisch modifizierten Zellen war daher nicht sicher möglich. Da jedoch, wie in Abschnitt 3.4. gezeigt, die Mehrheit der Zellen in morphologisch veränderten Alveolen die konstitutiv aktive Proteinkinase N exprimieren, ist die Abwesenheit deutlicher Veränderungen in diesen Bereichen ein starker Indikator für einen fehlenden Einfluss der PKN-Aktivierung auf die ultrastrukturelle tight junction Morphologie. Ebenfalls muss berücksichtigt werden, dass auf Ebene der Ultradünnschnitte nur einige Aspekte der tight junction Ultrastruktur beurteilt werden können. So sind die funktionell sehr verschiedenen *Zonulae occludentes* trächtiger und laktierender Mäuse wie im Abschnitt 1.4.2. beschrieben durch ein identisches Erscheinungsbild in der Transmissionselektronenmikroskopie gekennzeichnet, während die Analyse von Gefrierbruchpräparaten hier deutliche Unterschiede offenbart (Pitelka *et al.*, 1973). Während also subtile Veränderungen der tight junction Architektur auf Ebene der Ultradünnschnitte nicht ausgeschlossen werden können, zeigt die Abwesenheit grober Alterationen in diesen Aufnahmen doch deutlich, dass die erhöhte parazelluläre Permeabilität in PKN transgenen Tieren am Beginn der Laktation nicht auf eine

vollständige Disruption der tight junction Strukturen zurückgeführt werden kann. Dies wird durch die Beobachtung einer unauffälligen subzellulären Occludinverteilung in transgenen Tieren bestätigt. Die ZO-1-Immunoreaktivität beschränkte sich *in vivo* ebenfalls auf den Bereich der apikalen Interzellulärkontakte, obgleich hier fokal eine Verbreiterung des Signals nachgewiesen werden konnte. Die Signifikanz dieser Beobachtung ist im Moment ungeklärt; analoge Veränderungen werden jedoch regelhaft im Epithel von Wildtyptieren während der Trächtigkeit beobachtet (Prof. Margaret C. Neville, Denver, persönliche Mitteilung). Aufgrund der Unzuverlässigkeit der erhältlichen anti-FLAG-Antikörper in der Immunhistochemie war der Versuch, diese Veränderungen mit der Expression der konstitutiv aktiven Proteinkinase N zu korrelieren, nicht erfolgreich. Die Beobachtung, dass sich eine Verbreiterung des ZO-1-Signals in transgenen Tieren, nicht aber *in vitro*, nachweisen ließ, könnte auf eine komplexere Regulation der ZO-1-Lokalisation *in vivo* hinweisen, aber auch auf Unterschiede in der Expressionsstärke der konstitutiv aktiven Proteinkinase N zwischen beiden experimentellen Systemen zurückzuführen sein. Eine Validierung dieser beiden Interpretationsansätze ist auf Basis der vorliegenden Daten nicht möglich. Zusammenfassend deuten jedoch sowohl die Beobachtungen in EpH4 Zellen als auch in PKN-transgenen Tieren darauf hin, dass die Aktivierung der Proteinkinase N die Regulation der parazellulären Permeabilität beeinflusst, während der Prozess der tight junction Formierung primär nicht gestört zu werden scheint. Im Folgenden soll diese Hypothese anhand von Studien aus anderen *in vitro* Systemen diskutiert werden.

4.3.2. Rolle des Rho-Signaltransduktionsweges bei der Regulation der parazellulären Permeabilität

Beobachtungen in verschiedenen Modellsystemen belegen, dass die parazelluläre Permeabilität durch kleine GTPasen der Rho Familie moduliert werden kann; die molekularen Mechanismen, die diesen Effekten zu Grunde liegen, sind jedoch komplex und bislang nur unvollständig verstanden. Initiale Beobachtungen, dass eine Störung der koordinierten Rho-Aktivierung durch bakterielle Toxine aus *Escherichia coli*, *Clostridium difficile* und *Clostridium botulinum* mit der Formierung funktioneller *Zonulae occludentes* interferiert (Gerhard *et al.*, 1998; Hopkins *et al.*, 2003; Nusrat *et al.*, 2001), konnten in einer Reihe von Studien auch mit Hilfe der induzierten Expression konstitutiv aktiver und dominant negativer Mutanten verschiedener Rho-GTPasen bestätigt werden (Bruewer *et al.*, 2004; Jou *et al.*, 1998). Dabei zeigte sich, dass sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung dieser Moleküle zu einer Störung der tight junction

Funktion führen kann, so dass ein sorgfältig reguliertes Gleichgewicht der Rho-Aktivierung als essenzielle Voraussetzung für eine intakte Barrierefunktion postuliert wurde. Ein Teil der Rho-Effekte auf die parazelluläre Permeabilität wird hierbei über Wechselwirkungen mit dem Aktin-Zytoskelett und den kortikalen Aktinring vermittelt, während andere Aspekte der Rho-Wirkung wie die Modulation der Occludinphosphorylierung unabhängig vom Zytoskelett zu sein scheinen (Übersicht bei Matter und Balda, 2003). Die Beziehung zwischen den GTPasen der Rho-Familie und der Struktur und Funktion der *Zonulae occludentes* wird weiterhin dadurch kompliziert, dass in verschiedenen Modellsystemen zum Teil divergente Beobachtungen beschrieben wurden, so dass in Analogie zu den ebenfalls verschiedenen Effekten, die die Rho-Aktivierung in epithelialen und endothelialen Zellen auf die Formierung cadherinabhängiger adherens junctions hat, auch von einer Zelltypabhängigkeit des Rho-Einflusses auf die tight junction Funktion ausgegangen werden muss (Braga *et al.*, 1999; Matter und Balda, 2003). Ein mögliches Korrelat dieser Beobachtung könnten zelltypspezifische Unterschiede in der Expression einzelner Rho-Effektormoleküle darstellen, deren Bedeutung für die Regulation der Interzellulärkontakte aber bislang kaum untersucht wurde.

Hinweise auf einen möglichen Einfluss des RhoA-Signaltransduktionsweges auf die Regulation der tight junction Versiegelung in der Brustdrüse geben zwei Studien aus unterschiedlichen Modellsystemen. Rubenstein und Mitarbeiter beobachteten, dass es in der Zelllinie con8, die aus einem Mammakarzinom der Ratte gewonnen wurde, im Zuge der glukokortikoidinduzierten Formierung funktioneller *Zonulae occludentes* zu einer verminderten RhoA-Expression kommt. Wurde dieser Effekt durch Expression der konstitutiv aktiven RhoA-Mutante RhoAV14 antagonisiert, blieb der nach Dexamethason-Stimulation in Kontrollzellen beobachtete Anstieg des transepithelialen Widerstands aus. Weiterhin zeigte sich in diesem Fall eine Störung der ZO-1-Rekrutierung an die Zellmembran (Rubenstein *et al.*, 2003), die aber unter dem Aspekt bewertet werden muss, dass dieses Molekül im con8-System, anders als in Eph4-Zellen und der Situation *in vivo*, zytoplasmatisch lokalisiert ist und erst nach Glukokortikoid-Stimulation an die Zellmembran transloziert wird. Obwohl damit con8-Zellen zur *in vitro* Simulation der in der Brustdrüse ablaufenden tight junction Versiegelung nur bedingt geeignet sind, deuten die beschriebenen Daten doch auf einen inhibitorischen Effekt der RhoA-Aktivierung auf die tight junction Funktion in Mammaepithelzellen hin.

Eine interessante Parallele zu den in der Brustdrüse beobachteten Prozessen zeigte auch die Arbeit von Jou *et al.*, in der die Auswirkungen der RhoA-Aktivierung in MDCK-Zellen untersucht wurden (Jou *et al.*, 1998). Hier konnte demonstriert werden, dass die induzierte

Expression der konstitutiv aktiven RhoA-Mutante RhoAV14 zu einer gravierenden Störung der Ausbildung funktioneller *Zonulae occludentes* führt. Dabei zeigte sich, wie Abbildung 4.1. verdeutlicht, in Gefrierbruchpräparaten dieser Zellen eine verminderte Anzahl von tight junction Strängen sowie eine Reduktion der ausgebildeten Querverbindungen mit Auftreten blind endender Stränge; eine Situation, die an das im Abschnitt 1.4.2. beschriebene Erscheinungsbild der *Zonulae occludentes* in der Brustdrüse während der Trächtigkeit erinnert (vergleiche Abbildung 1.9).

Obwohl der Einfluss der Proteinkinase N auf die Regulation der parazellulären Permeabilität bislang nicht direkt untersucht wurde, stützen Beobachtungen aus einigen Studien die Hypothese, dass dieses Molekül an der Kontrolle der tight junction Funktion beteiligt sein könnte. So demonstrierten Stamatovic und Mitarbeiter in kultivierten murinen Endothelzellen eine Erhöhung der parazellulären Permeabilität durch das Chemokin MCP1 und zeigten, dass dieser Effekt durch den Rock-Inhibitor Y-27632 antagonisierbar ist (Stamatovic *et al.*, 2003).

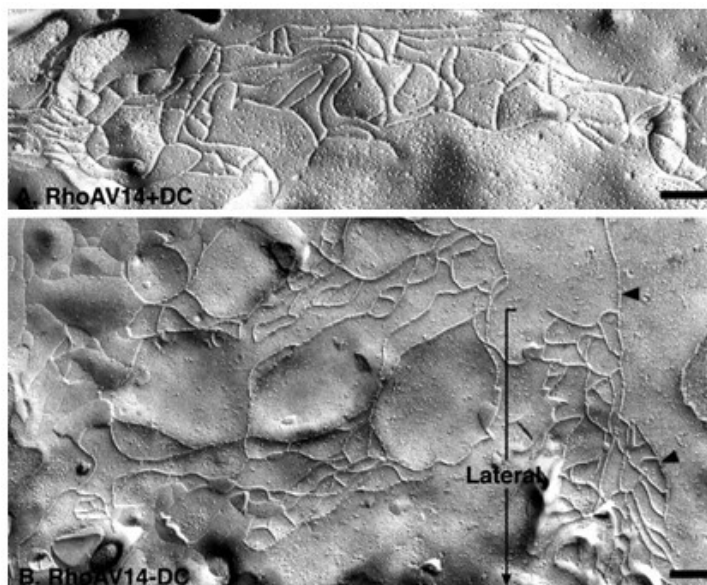


Abbildung 4.1: Effekte der RhoA-Aktivierung in MDCK-Zellen. Der obere Teil der Abbildung zeigt die exoplasmatische Seite eines Gefrierbruchpräparates in MDCK-Zellen, die die konstitutiv aktive RhoA-Mutante nicht exprimieren. Es stellt sich ein Netzwerk paralleler Stränge dar, die untereinander Querverbindungen aufweisen und dem Erscheinungsbild der *Zonulae occludentes* in der Brustdrüse während der Laktation ähneln. (Pitelka *et al.*, 1973, vgl. Abbildung 1.9). Im unteren Teil der Abbildung ist die exoplasmatische Seite eines Gefrierbruchpräparates aus RhoAV14-exprimierenden Zellen dargestellt. Die tight junction Stränge sind in ihrer Anzahl reduziert und bilden weniger Querverbindungen aus. Es finden sich blind endende tight junction Stränge, die sich auch auf die laterale Membranseite ausdehnen; Parallelen zur tight junction Architektur in der Brustdrüse während der Trächtigkeit werden deutlich (vgl. Abbildung 1.9). Abbildung aus Jou *et al.*, 1998.

Sorgfältige Analysen widerlegen jedoch die Spezifität dieses Inhibitors für die Kinasen der Rock-Familie. So konnte insbesondere gezeigt werden, dass auch die Mitglieder der PKN-Familie durch Y-27632 effektiv gehemmt werden (Davies *et al.*, 2000 und Dr. Yasuhiro Ohashi, Osaka, persönliche Mitteilung). Dies lässt den Schluss zu, dass der beobachtete Effekt von MCP-1 auf die parazelluläre Permeabilität in diesem Modell nicht zwangsläufig durch den Rho-Effektor Rock vermittelt werden muss, sondern PKN oder eine seiner Isoformen hier eine Rolle spielen könnte. In ähnlicher Weise konnte in zwei weiteren Modellsystemen eine Antagonisierbarkeit der thrombininduzierten Permeabilitätssteigerung durch Y-27632 gezeigt werden (Kawkitinarong *et al.*, 2004; Wojciak-Stothard *et al.*, 2001); Hirase und Mitarbeiter demonstrierten darüber hinaus, dass diese Substanz die durch Lysophosphatidylsäure induzierte Steigerung der parazellulären Permeabilität in ECV304-Zellen inhibieren kann. (Hirase *et al.*, 2001). Zur Beurteilung einer möglichen Beteiligung der PKN-Kinasen bei der Vermittlung dieser Effekte ist die Entwicklung selektiver Inhibitoren einzelner Rho-Effektormoleküle notwendig.

Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Rolle der Proteinkinase N in der Kontrolle der parazellulären Permeabilität stammt aus Beobachtungen in MDCKII-Zellen. Hasegawa und Mitarbeiter machten hier die überraschenden Beobachtung, dass die induzierte Expression einer konstitutiv aktiven RhoA-Mutante zu einer Erhöhung des transepithelialen Widerstands führte, dabei aber gleichzeitig die parazelluläre Permeabilität gegenüber Mannitol erhöhte (Hasegawa *et al.*, 1999). Die Ursachen der diskrepanten Effekte auf diese beiden Parameter der tight junction Funktion wurden bislang nicht geklärt, die beschriebenen Beobachtungen stützen jedoch die Hypothese, dass die parazelluläre Permeabilität gegenüber ionischen und nicht-ionischen Stoffen differenziell reguliert sein könnte (Balda *et al.*, 1996). In Folgexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Einführung von Punktmutationen an den Positionen 40 bzw. 42 des RhoA-Moleküls den beobachteten Effekt auf den transepithelialen Widerstand inhibiert (Fujita *et al.*, 2000). Interessanterweise heben beide dieser Mutationen die Interaktion zwischen RhoA und der Proteinkinase N auf (Sahai *et al.*, 1998), so dass auch in dieser Studie eine Beteiligung von PKN an der Vermittlung der beobachteten Rho-Effekte auf die tight junction Funktion möglich erscheint. Im folgenden Abschnitt sollen auf der Basis von Hypothesen potenzielle Mechanismen diskutiert werden, über die eine Aktivierung der Proteinkinase N auf molekularer Ebene die parazelluläre Permeabilität beeinflussen könnte.

4.3.3. Hypothesen zur molekularen Vermittlung der PKN Effekte auf die Funktion der *Zonulae occludentes*

Obwohl die tight junction Versiegelung zwischen benachbarten Mammaepithelzellen am Beginn der Laktation in verschiedenen Spezies demonstriert werden konnte, bleiben die molekularen Hintergründe dieses Phänomens bislang ungeklärt (Übersicht bei Nguyen und Neville, 1998). Voraussetzung für das Ablaufen dieses Prozesses ist der Abfall der systemischen Progesteronkonzentration am Ende der Trächtigkeit (Nguyen *et al.*, 2001). Da Metzger und Mitarbeiter *in vitro* eine ligandenabhängige Superaktivierung des Progesteronrezeptors nach Expression der konstitutiv aktiven Proteinkinase N demonstrieren konnten (Metzger *et al.*, 2003), besteht die Möglichkeit, dass hierdurch im Mammaepithel PKN transgener Tiere der Abfall der systemischen Progesteronkonzentration am Beginn der Laktation kompensiert wird. Damit ließe sich die Störung der tight junction Versiegelung in diesem Modell als Folge einer nicht suffizienten Reprimierung progesteronabhängiger Gene interpretieren. Die Beobachtungen in EpH4 Zellen können mit dieser Hypothese allerdings nicht unmittelbar erklärt werden, da hier die tight junction Versiegelung nicht an einen Abfall der Progesteronkonzentration gebunden ist, sondern durch Glukokortikoide induziert wird. Spekulationen über eine potenzielle Wechselwirkung der verschiedenen nukleären Rezeptoren im Mammaepithel, die eine Beziehung zwischen diesen beiden Hormonachsen herstellen könnte, fehlt bislang eine valide Datengrundlage.

Ein Einfluss von Glukokortikoiden auf die tight junction Versiegelung im Mammaepithel konnte in verschiedenen Spezies *in vivo* (Nguyen *et al.*, 2001; Stelwagen *et al.*, 1998) sowie in einer Reihe von *in vitro* Modellen demonstriert werden (Buse *et al.*, 1995; Zettl *et al.*, 1992). Analoge Beobachtungen in Hepatom- (Porvaznik *et al.*, 1979), Darmepithel- (Quaroni *et al.*, 1999) und Endothelzellen (Forster *et al.*, 2005) weisen darüber hinaus darauf hin, dass ein stimulierender Effekt der Glukokortikoide auf die Formierung und Versiegelung der *Zonulae occludentes* nicht auf das Mammaepithel beschränkt ist; die diesen Beobachtungen zu Grunde liegenden molekularen Hintergründe konnten indes bislang nicht geklärt werden. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die gut validierten Steroideffekte auf die tight junction Funktion in der Brustdrüse nicht ausschließlich über den Glukokortikoidrezeptor vermittelt werden, da Mäuse, deren Glukokortikoidrezeptor mit Hilfe eines Cre-loxP-Systems spezifisch im Mammaepithel inaktiviert wurde, keine Einschränkung ihrer Laktationskompetenz zeigen (Wintermantel *et al.*, 2005). Es wurde daher vorgeschlagen, dass auch der Mineralokortikoidrezeptor eine Rolle in der Vermittlung dieser Steroideffekte spielen könnte (Kingsley-Kallesen *et al.*, 2002). Dies könnte

auch für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Beobachtungen in EpH4-Zellen von Bedeutung sein, da das zur Induktion der tight junction Versiegelung verwendete Hydrokortison eine deutliche Affinität zum Mineralokortikoidrezeptor aufweist (Rang *et al.*, 2003). Da durch Metzger und Mitarbeiter *in vitro* ebenfalls eine Interaktion zwischen PKN und dem Mineralokortikoidrezeptor gezeigt wurde und die PKN-Aktivierung in diesem System zu einer ligandenabhängigen Superaktivierung dieses Rezeptors führte (Metzger *et al.*, 2003), bildet die Interferenz mit der mineralokortikoiden Signalachse einen potenziellen Angriffspunkt zur Erklärung der beobachteten PKN-Effekte.

Unabhängig von einer potenziellen Interaktion mit nukleären Rezeptoren ist ein direkter Einfluss der Proteinkinase N auf die Regulation der parazellulären Permeabilität auch auf Ebene der Genexpression denkbar, da aus verschiedenen Modellsystemen Hinweise auf eine Funktion dieses Moleküls bei der Transkriptionskontrolle existieren (Übersicht bei Mukai, 2003). Hierbei sind insbesondere Proteine von Interesse, die mit den *Zonulae occludentes* assoziiert sind. Die Analyse der erhobenen *Microarray*-Daten zeigte in diesem Zusammenhang signifikante Abweichungen in der Expression zweier Mitglieder der Claudin-Familie, die jedoch auf Proteinebene bislang nicht validiert wurden (Daten nicht gezeigt). Wie in Abschnitt 1.3.2. dargestellt, spielen die einzelnen Claudine eine wesentliche Rolle in der Regulation der parazellulären Permeabilität; aufgrund der Komplexität dieser Genfamilie ist der genaue Beitrag ihrer einzelnen Mitglieder in der Kontrolle der tight junction Funktion innerhalb des Mammaepithels jedoch bislang nur unvollständig verstanden. Zur Überprüfung einer möglichen Bedeutung der beobachteten Expressionsunterschiede ist daher neben der Validierung auf Proteinebene auch eine gezielte Analyse einzelner Claudine während des Entwicklungszyklus der Brustdrüse notwendig.

Schließlich besteht die Möglichkeit, dass die Proteinkinase N die parazelluläre Permeabilität durch direkte Phosphorylierung tight junction assoziierter Proteine reguliert. So konnte für verschiedene Mitglieder der Claudin-Familie gezeigt werden, dass die Phosphorylierung dieser Proteine die tight junction Funktion beeinflusst (Fujibe *et al.*, 2004; Le Moellic *et al.*, 2005). Die an diesen Prozessen beteiligten Kinasen sind nicht bekannt. Da bislang keine Konsensussequenzen für Substrate der Proteinkinase N identifiziert werden konnten, ist eine *in silico* Analyse der verschiedenen Claudine zur Identifizierung potenzieller PKN-Phosphorylierungsstellen zur Zeit nicht möglich.

Auch die Occludin-Phosphorylierung wurde in verschiedenen *in vitro* Systemen mit der Regulation der parazellulären Permeabilität in Verbindung gebracht (Übersicht bei Feldman *et al.*, 2005). Bislang unveröffentlichte Daten zeigen darüber hinaus, dass der Prozess der tight

junction Versiegelung in der Brustdrüse auch *in vivo* von einer Änderung der Occludinphosphorylierung begleitet ist (Prof. Margaret C. Neville, Denver, persönliche Mitteilung). Dabei existiert im Occludinmolekül ein komplexes Phosphorylierungsmuster, an dem sowohl Serin- und Threonin- als auch Tyrosinreste beteiligt sind. Die funktionelle Bedeutung spezifischer Phosphorylierungsstellen ist bisher nicht geklärt. Hinweise aus verschiedenen *in vitro* Systemen deuten darauf hin, dass Mitglieder der Proteinkinase C Familie eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Occludinphosphorylierung spielen und diese sowohl direkt als auch indirekt beeinflussen können (Übersicht bei Feldman *et al.*, 2005). Da die PKN-Kinasedomäne eine deutliche Homologie zu den Mitgliedern der PKC-Familie aufweist, erscheint ein potenzieller Einfluss auf die Occludinphosphorylierung als attraktive Hypothese zur Erklärung der beobachteten PKN-Effekte. In ECV304-Zellen konnte darüber hinaus eine direkte Verbindung zwischen Elementen des RhoA-Signaltransduktionswegs und der Occludinphosphorylierung gezeigt werden: In diesem System wurde sowohl die Erhöhung der parazellulären Permeabilität nach Stimulation mit Lysophosphatidylsäure als auch die phosphorylierungsbedingte Änderung der Migrationsgeschwindigkeit des Occludins im SDS Gel durch Expression einer dominant-negativen RhoA-Mutante sowie durch den Kinaseinhibitor Y-27632 antagonisiert (Hirase *et al.*, 2001). Da wie bereits diskutiert Y-27632 keine ausschließliche Spezifität für die Kinasen der Rock-Familie aufweist, ist eine potenzielle Rolle der Proteinkinase N in der Regulation der Occludinphosphorylierung mit diesen Beobachtungen vereinbar. Die Beobachtung, dass eine histamininduzierte Veränderung der Occludinmigration im SDS-Gel weder durch eine dominant negative RhoA-Mutante noch durch Y-27632 beeinflusst wurde, zeigt jedoch, dass ebenfalls Rho-unabhängige Mechanismen zur Regulation der Occludinphosphorylierung existieren (Hirase *et al.*, 2001).

4.4. Phänotypische Effekte einer gestörten tight junction Versiegelung in der murinen Brustdrüse – ein hypothetisches Modell

Wie bereits diskutiert, deuten die *in vivo* gemachten Beobachtungen darauf hin, dass es in PKN transgenen Tieren zu einer vorzeitigen Involutionsinduktion kommt, die als sekundäre Reaktion auf eine Störung interpretiert werden kann, die sich auf morphologischer Ebene erstmals am Beginn der Laktation manifestiert. Gleichzeitig zeigten die beschriebenen Experimente sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einen inhibitorischen Effekt der PKN-Aktivierung auf die Versiegelung der *Zonulae occludentes*, die in der Brustdrüse unter physiologischen Bedingungen im Rahmen der Sekretionsaktivierung erfolgt. Damit stellt sich die Frage, ob eine Störung der tight junction

Versiegelung für das beobachtete vorzeitige Ablaufen der Involution verantwortlich sein könnte. Eine solche kausale Beziehung kann aus den experimentell erhobenen Daten nicht sicher abgeleitet werden, da die direkten Auswirkungen einer erhöhten parazellulären Permeabilität auf den Laktationsprozess nicht analysiert wurden und bislang auch in der Literatur Studien fehlen, die diesen Zusammenhang untersuchen. Es erscheint jedoch bemerkenswert, dass auch Mäuse, deren Gen für das tight junction assoziierte Protein Occludin in der Keimbahn inaktiviert wurde, eine verminderte Laktationskompetenz zeigen (Saitou *et al.*, 2000). Morphologische Einzelheiten dieses Phänotyps wurden allerdings bislang nicht beschrieben, so dass im Moment nicht geklärt werden kann, ob auch in diesen Tieren eine vorzeitige Induktion des Involutionsprozesses für den beobachteten Laktationsdefekt verantwortlich ist. Da die Genese des in PKN transgenen Tieren beobachteten Phänotyps damit auf Basis der vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden kann, soll im Folgenden ein hypothetisches Modell vorgestellt werden, das einen Zusammenhang zwischen einer Störung der tight junction Versiegelung und dem vorzeitigen Ablaufen des Involutionsprozesses in PKN transgenen Tieren herstellt:

Hierbei führt die konstitutive Aktivierung der Proteinkinase N im Mammaepithel transgener Tiere primär zu einer Störung der tight junction Versiegelung. Als Resultat der insuffizienten Barriere zwischen den Kompartimenten der Brustdrüse kommt es mit Beginn der Milchsekretion in Alveolen, die einen hohen Anteil transgenexprimierender Zellen aufweisen, zu einem Efflux von Wasser und niedermolekularen Milchbestandteilen ins Interstitium und einem Ausbleiben der alveolären Expansion. Hieraus resultiert eine Änderung der physikochemischen Milcheigenschaften, die bildlich als Eindickung beschrieben werden kann und sich histologisch im Nachweis eines eosinophilen Sekretionsprodukts manifestiert. Die erhöhte Viskosität des Sekretionsprodukts führt weiterhin zu einer Störung der Milchpassage durch das System der *Ductus lactiferi*, so dass distal der initial betroffenen Drüsenabschnitte eine lokale Milchstase resultiert. Dies stellt einen potenten Stimulus zur lokalen Induktion des Involutionsprozesses dar, so dass es in den betroffenen Drüsenabschnitten zu einem Anstieg der Apoptoserate, der Induktion involutionsassoziiierter Gene und schließlich zu einer lipomatösen Umstrukturierung kommt. Sind von den initialen Veränderungen, die in Abhängigkeit von der Verteilung transgenexprimierender Zellen auftreten, primär Alveolen betroffen, die im Bereich höhergradiger Verzweigungen des Milchgangsystems liegen, zeigen sich als Resultat segmental über den Drüsenkörper angeordnete Involutionszonen, wie sie in einigen transgenen Tieren beobachtet wurden. Ist der primär betroffene Abschnitt hingegen im Bereich einer Hauptverzweigung des Milchgangsystems lokalisiert, resultiert dies im Untergang größerer Drüsenabschnitte, was dem im linken Teil der Abbildung 3.17 gezeigten Befund entspricht. Als

Extremfall ist eine Situation denkbar, bei der primär auch Bereiche in unmittelbarer Nachbarschaft der Milchgangsmündung betroffen sind; dies würde der experimentellen Versiegelung einer kompletten Brustdrüse entsprechen und hätte den Untergang dieser Drüse zur Folge, während andere Brustdrüsen des selben Tieres unter Umständen nur sporadisch verteilte Regressionszonen aufweisen könnten. Abbildung 4.2 zeigt am Beispiel eines transgenen Tieres der Linie 933 vom zehnten Tag *post partum* den in diesem Fall zu erwartenden Befund.

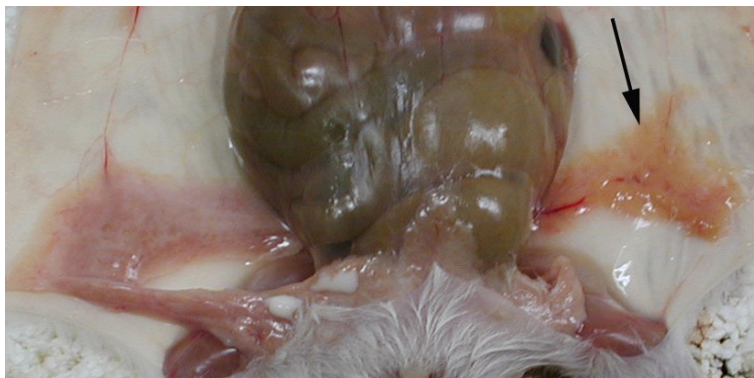


Abbildung 4.2: Makroskopischer Aspekt der Brustdrüsenentwicklung in einem transgenen Tier der Linie 933 am zehnten Tag *post partum*. Während die rechte inguinale Brustdrüse ein dem Entwicklungsstadium entsprechendes äußeres Erscheinungsbild zeigt, wird linksseitig (Pfeilmarkierung) schon auf makroskopischer Ebene eine ausgeprägte Regression des Parenchyms deutlich.

Mit Hilfe dieses Modells lässt sich damit der in PKN transgenen Tieren beobachtete Phänotyp als Resultat einer gestörten tight junction Versiegelung am Beginn der Laktation interpretieren. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass der hier postulierte Zusammenhang lediglich den Charakter einer Hypothese trägt und experimentell nicht als gesichert betrachtet werden kann. Zur Überprüfung des hier vorgestellten Modells sind Experimente notwendig, die die Effekte einer gezielten Kompromittierung der interzellulären Barriere in der Brustdrüse *in vivo* untersuchen. Hier böte sich beispielsweise die Injektion einer EDTA-Lösung in den Milchgang lactierender Versuchstiere an, die zu einer Disruption der *Zonulae occludentes* führt, was im Fall der Richtigkeit der hier aufgestellten Hypothese in der Involutionsinduktion resultieren sollte.

4.5. Abschließende Bewertung und Einordnung des bearbeiteten Tiermodells

Die Aufklärung der komplexen Signaltransduktionsprozesse, die durch kleine GTPasen der Rho-Familie reguliert werden, ist Voraussetzung für das Verständnis zahlreicher zellbiologischer Prozesse und deren potenzielle pharmakologische Modulierung. Das hier vorgestellte Tiermodell bietet erstmals die Möglichkeit, die Funktion des Rho-Effektormoleküls PKN *in vivo* zu analysieren und ist daher in der Lage, einen wertvollen Beitrag zur Charakterisierung Rho-abhängiger Signaltransduktionsprozesse zu leisten. Insbesondere die Beobachtung einer erhöhten parazellulären Permeabilität in PKN transgenen Tieren und Mammaepithelzellen, die eine konstitutiv aktive Form der Proteinkinase N exprimieren, gibt erstmals einen Hinweis auf eine mögliche Rolle dieses Moleküls bei der Vermittlung der bislang nur unvollständig verstandenen Rho-Effekte auf die Struktur und Funktion der *Zonulae occludentes*.

Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Überexpression eines transgenen Proteins sowohl *in vitro* als auch *in vivo* grundsätzlich ein artifizielles System darstellt, in dem auch Interaktionen mit Proteinen beobachtet werden können, für die unter physiologischen Bedingungen nur eine geringe Affinität besteht. Gleichzeitig ist im hier vorgestellten Tiermodell mit dem Verlust physiologischer Interaktionspartner zu rechnen, da die konstitutive Aktivierung der Proteinkinase N durch Deletion des aminoterminalen Abschnitts erreicht wurde, der beispielsweise die Bindungsdomäne für das Adapterprotein CG-NAP beinhaltet (Takahashi *et al.*, 1999). Auch der Verlust spezifischer Domänen, die die subzelluläre Lokalisation des Proteins determinieren, ist auf Grund der n-terminalen Trunkierung möglich. So findet sich zwar mit Hilfe der Immunfluoreszenz sowohl für die intakte Proteinkinase N als auch deren isolierte katalytische Domäne eine überwiegend diffus-zytoplasmatische Verteilung; die Beobachtungen von Mellor und Mitarbeitern zeigen jedoch, dass eine Subpopulation der PKN-Moleküle auch an ein endosomales Kompartiment transloziert werden kann und dieser Prozess an die aminoterminal lokalisierten ACC Domänen gebunden ist (Mellor *et al.*, 1998). Das im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte Tiermodell kann damit zwar wertvolle Hinweise auf mögliche Funktionen der Proteinkinase N geben; zur Bestimmung der exakten Bedeutung dieses Molekül unter physiologischen Umständen ist aber die Nutzung zusätzlicher experimenteller Strategien notwendig. Auch die Frage, in welcher Weise PKN und der Rho-Signaltransduktionsweg Entwicklungsprozesse in der Brustdrüse beeinflussen, kann mit Hilfe der PKN transgenen Tiere nicht abschließend geklärt werden.

Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen hat sich das hier vorgestellte transgene Modell jedoch als wichtige Ergänzung des Spektrums grundlagenwissenschaftlicher Methoden zur

Aufklärung Rho-vermittelter Signaltransduktionsprozesse erwiesen und sollte auch in zukünftigen Experimenten in der Lage sein, einen wertvollen Beitrag zur Charakterisierung dieser Prozesse zu liefern.