

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Funktionelle Charakterisierung des Rho-Effektormoleküls PKN  
in einem transgenen Mausmodell

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

von

Andreas Fischer

aus Lutherstadt-Wittenberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. F. Theuring

2. Prof. Dr. F.-D. Böhmer

3. Priv.-Doz. Dr. med. H.-D. Royer

Datum der Promotion: 23.09.2007

---

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. Rho-GTPasen und ihre Stellung im Signaltransduktionsnetz der Zelle.....	1
1.2. Die Serin/Threoninkinase PKN als Rho-Effektormolekül.....	5
1.3. Die tight junction als Teil des apikalen Haftkomplexes .....	8
1.3.1. Struktur und Funktion des apikalen Haftkomplexes .....	8
1.3.2. Molekulare Architektur der tight junctions .....	10
1.4. Die murine Brustdrüse als Modellsystem in der Entwicklungs- und Zellbiologie .....	13
1.4.1. Der Entwicklungszyklus der murinen Brustdrüse.....	14
1.4.2. Regulation der tight junction Permeabilität in der Brustdrüse.....	16
1.5. Ziele und Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit.....	18
2. Material und Methoden .....	19
2.1. Materialien .....	19
2.1.1. Ausgewählte Chemikalien und Substanzen .....	19
2.1.2. Pufferlösungen und komplexe Reagenzien .....	20
2.1.3. Kits .....	20
2.1.4. Antikörper .....	21
2.1.5. PCR-Primer .....	21
2.1.6. Biologische Materialien .....	21
2.1.7. Ausgewählte Geräte .....	22
2.1.8. Ausgewählte Zusatzmaterialien .....	22
2.1.9. Software .....	22
2.2. Methoden.....	23
2.2.1. Molekularbiologische Methoden.....	23
2.2.1.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	23
2.2.1.2. Isolierung von DNA aus Schwanzbiopsien.....	23
2.2.1.3. Polymerasenkettenreaktion .....	23
2.2.1.4. Southern Blot Analyse .....	23
2.2.1.5. RNA-Isolierung.....	24
2.2.1.6. Northern Blot Analyse .....	25
2.2.1.7. RT-PCR.....	25
2.2.1.8. Microarray-Hybridisierungen.....	25
2.2.1.9. Immunpräzipitation und Western Blot.....	25

2.2.2. Tierexperimentelle Methoden .....	26
2.2.2.1. Tierhaltung und Gewebeentnahme.....	26
2.2.2.2. Intraduktale Injektion .....	27
2.2.3. Histologische Methoden.....	27
2.2.3.1. Paraffineinbettung, HE-Färbung und Elektronenmikroskopie.....	27
2.2.3.2. Ganzorganpräparate .....	28
2.2.3.3. <i>In situ</i> Hybridisierung.....	28
2.2.3.4. Immunhistochemie .....	29
2.2.4. Zellkulturtechniken .....	30
2.2.4.1. Allgemeine Zellkulturtechniken.....	30
2.2.4.2. Transfektion .....	31
2.2.4.3. Messung des transepithelialen Widerstands.....	31
2.2.4.4. Immunfluoreszenz.....	31
2.3. Statistische Auswertung .....	32
3. Ergebnisse .....	33
3.1. Etablierung und Grundcharakterisierung der transgenen Linien .....	33
3.1.1. Etablierung transgener Linien und Analyse der Transgenintegration.....	33
3.1.2. Analyse der Transgenexpression auf RNA Ebene .....	35
3.1.2.1. Identifizierung transgenexprimierender Linien.....	35
3.1.2.2. Analyse des zeitlichen Verlaufs der Transgenexpression in Linie 933 .....	36
3.1.2.3. Transgenexpression außerhalb der Brustdrüse.....	37
3.1.3. Transgensynthese auf Proteinebene .....	38
3.2. Analyse der Brustdrüsenfunktion in transgenen Tieren .....	39
3.3. Analyse der Brustdrüsenmorphologie in transgenen Tieren .....	40
3.3.1. Virgines Stadium und Trächtigkeit .....	40
3.3.2. Sekretorische Aktivierung und Laktation .....	43
3.3.3. Involution .....	49
3.3.4. Besonderheiten in Linie 995 .....	50
3.3.5. Morphologische Analyse anderer transgenexprimierender Gewebe in Linie 933 .....	51
3.4. Analyse der Transgenexpression <i>in situ</i> .....	53
3.5. Analyse der Milchproteinsynthese und -sekretion in transgenen Tieren .....	54
3.6. Involutionstypische Veränderungen in transgenen Tieren während der Laktation.....	58
3.6.1. Detektion apoptotischer Zellen <i>in situ</i> .....	58
3.6.2. Expression von Involutionsmarkern.....	60

3.7. Struktur und Funktion der <i>Zonulae occludentes</i> in transgenen Tieren .....	61
3.7.1. Analyse der tight junction Versiegelung <i>in vivo</i> .....	61
3.7.2. Analyse der tight junction Struktur <i>in vivo</i> .....	62
3.8. <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Modulation der parazellulären Permeabilität durch PKN....	65
3.8.1. Einfluss der PKN Aktivierung auf die tight junction Versiegelung <i>in vitro</i> .....	65
3.8.2. Einfluss der PKN Aktivierung auf die tight junction Struktur <i>in vitro</i> .....	68
4. Diskussion .....	70
4.1. Grundcharakterisierung des transgenen Modells .....	70
4.2. Phänotypische Veränderungen in Brustdrüsen transgener Tiere .....	74
4.2.1. Allgemeine Einordnung des beobachteten Phänotyps .....	74
4.2.2. Phänotypische Veränderungen in virginen und trächtigen Tieren .....	75
4.2.3. Phänotypische Veränderungen am Beginn der Laktation .....	76
4.2.4. Phänotypische Veränderungen im weiteren Verlauf der Laktation .....	77
4.3. Rolle der Proteinkinase N bei der Regulation der parazellulären Permeabilität.....	80
4.3.1. Allgemeine Einordnung des beobachteten Phänotyps .....	80
4.3.2. Rolle des Rho-Signaltransduktionsweges bei der Regulation der parazellulären Permeabilität.....	82
4.3.3. Hypothesen zur molekularen Vermittlung der PKN Effekte auf die Funktion der <i>Zonulae occludentes</i> .....	86
4.4. Phänotypische Effekte einer gestörten tight junction Versiegelung in der murinen Brustdrüse – ein hypothetisches Modell .....	88
4.5. Abschließende Bewertung und Einordnung des bearbeiteten Tiermodells .....	91
5. Zusammenfassung .....	93
5.1. Zusammenfassung .....	93
5.2. Abstract .....	95
6. Literaturverzeichnis.....	97
Abkürzungsverzeichnis .....	106
Danksagung.....	108
Lebenslauf .....	109
Publikationsliste .....	111
Eidesstattliche Erklärung.....	112

## 5. Zusammenfassung

### 5.1. Zusammenfassung

Die kleinen GTPasen der Rho-Familie nehmen eine zentrale Stellung im Signaltransduktionsnetz der Zelle ein und sind neben der Regulation des Aktin-Zytoskeletts an der Steuerung der Transkription sowie von Proliferation, Differenzierung und Membrantransportprozessen beteiligt. Diese Vielfalt zellbiologischer Funktionen wird durch die Aktivierung verschiedener Effektorproteine vermittelt, deren genaue Rolle im Rho-Signaltransduktionsweg aber bislang auf Grund des Fehlens relevanter *in vivo* Modelle häufig unbekannt ist.

Zur funktionellen Charakterisierung eines dieser Effektormoleküle, der ubiquitär exprimierten Serin/Threonin-Kinase PKN, wurde eine Tiermodell analysiert, in dem eine konstitutiv aktivierte Form dieses Moleküls unter der Kontrolle des MMTV-LTR-Promotors in den Brustdrüsen transgener Mäuse exprimiert wurde. Im Rahmen der Grundcharakterisierung dieses Tiermodells konnte dabei zunächst mit Hilfe von Northern Blot Hybridisierungen, RT-PCR, *in situ* Hybridisierung und Immunpräzipitationstechniken in zwei unabhängigen Linien die Expression der konstitutiv aktivierten Proteinkinase N im Mammaepithel nachgewiesen werden, wobei sich eine maximale Transgenexpression während der Laktation fand.

Jungtiere, die von transgenen Müttern gesäugt wurden, zeigten eine signifikante Wachstumsretardierung, die durch Austauschexperimente auf eine verminderte Laktationskompetenz transgener Weibchen zurückgeführt werden konnte. Als morphologisches Korrelat konnte in konventionell-histologischen und Ganzorganpräparaten von Brustdrüsen dieser Tiere ein Ausbleiben der alveolären Expansion am Beginn der Laktation mit luminaler Akkumulation eines viskösen Sekretionsprodukts gezeigt werden. Dabei fanden sich zu diesem Zeitpunkt zwischen transgenen Tieren und Kontrollweibchen keine signifikanten Unterschiede in der Expression der als Differenzierungsmarker fungierenden Milchproteine WAP,  $\beta$ -Casein, WDNM und  $\alpha$ -Laktalbumin; ultrastrukturell und immunhistochemisch stellte sich jedoch alveolär eine luminal und intrazelluläre Milchproteinretention dar, die im weiteren Verlauf der Laktation zu einem progredienten Verlust epithelialen Gewebes mit einem lipomatösen Umbau des Drüsenkörpers führte. Diese Geweberegression konnte durch Nachweis einer erhöhten Apoptoserate sowie der verstärkten Expression des Wachstumsfaktors TGF $\beta$ 3 und des IGF-bindenden Proteins IGFBP5 als vorzeitiges Einsetzen des physiologischen Involutionsprozesses charakterisiert werden.

Weiterhin konnte mit Hilfe der Injektion radioaktiv markierter Saccharose in den Milchgang laktierender Weibchen in transgenen Tieren eine erhöhte Permeabilität des Mammaepithels am Beginn der Laktation nachgewiesen werden, die jedoch auf ultrastruktureller Ebene nicht von Auffälligkeiten der tight junction Morphologie begleitet waren. Auch die mit den *Zonulae occludentes* assoziierten Proteine ZO-1 und Occludin zeigten eine regelrechte Lokalisation im Bereich der apikalen Interzellulärkontakte, wobei sich für ZO-1 eine fokale Signalverbreiterung darstellte. Um einen direkten Effekt der Proteinkinase N auf die tight junction Permeabilität zu untersuchen, wurden abschließend murine EpH4-Mammaepithelzellen mit der konstitutiv aktivierten Proteinkinase N stabil transfiziert. Auch hier zeigte sich eine signifikante Beeinträchtigung der hydrocortison-induzierten tight junction Versiegelung ohne Occludin- oder ZO-1-Dislokation. Zusammenfassend wird auf Grundlage der hier dargestellten Ergebnisse die Hypothese formuliert, dass die Proteinkinase N als Effektormolekül der kleinen GTPasen RhoA und Rac1 an der Regulation der parazellulären Permeabilität beteiligt ist und eine Störung der tight junction Versiegelung am Beginn der Laktation in der murinen Brustdrüse zu einer vorzeitigen Induktion der Involution führt.

## 5.2. Abstract

The Rho-family of small GTPases plays a pivotal role within the cellular signal transduction network and is implicated in the regulation of the actin cytoskeleton as well as in the activation of transcription and the regulation of cell proliferation, differentiation and membrane trafficking. These effects are mediated by a variety of downstream effector molecules, yet because of a lack of relevant *in vivo* models, the precise role of many of these molecules remains incompletely understood.

To elucidate the function of PKN, an ubiquitously expressed serin/threonin kinase acting downstream of the small GTPases RhoA and Rac1, transgenic animals expressing a constitutively activated form of this molecule under the regulation of the MMTV-LTR promoter in their mammary glands were analyzed. By employing Northern Blot hybridization, RT-PCR, *in situ* hybridization and immunoprecipitation techniques, the expression of the constitutively activated PKN was confirmed within the mammary epithelium in two independent transgenic lines with a maximum expression during lactation. Pups suckled by transgenic mothers displayed significant growth retardation reflecting impaired lactational competence in PKN transgenic females as confirmed by cross foster experiments. Histological sections as well as whole mount preparations revealed that transgenic alveoli had failed to expand at the onset of lactation and a thickened secretion product was observed within the alveolar lumina in these animals. Expression of the milk proteins WAP,  $\beta$ -casein, WDNM and  $\alpha$ -lactalbumin was not altered at the onset of lactation in transgenic animals, however, by employing electron microscopy as well as immunohistochemistry, a luminal and intracellular retention of milk proteins was demonstrated in the mammary gland of these mice that resulted in a progressive loss of epithelial tissue over the course of lactation that resembled changes seen during involution. This was further supported by demonstrating an increase in apoptosis as well as increased expression of TGF $\beta$ 3 and IGFBP5, two genes previously associated with mammary gland involution, therefore suggesting precocious involution in PKN transgenic mice.

In addition, paracellular permeability was increased within the mammary epithelium in PKN transgenic females at the onset of lactation as confirmed by injection of radio labeled sucrose into the milk duct. Mammary tight junctions displayed no morphological abnormalities when assessed by transmission electron microscopy and immunohistochemistry demonstrated the presence of both ZO-1 and occludin at the apical intercellular contacts with ZO-1 displaying a focally broadened staining pattern.



To investigate whether the increased paracellular permeability in PKN transgenic mice is the result of a direct action of PKN or rather reflects a secondary effect, EpH4 mammary epithelial cells were employed as an *in vitro* experimental system. Again, tight junction sealing in response to hydrocortisone was severely impaired in EpH4 cells stably transfected to express constitutively activated PKN without displacement of ZO-1 or occludin from the cell membrane. In conclusion, it is hypothesized that PKN acts downstream of RhoA and Rac1 to modulate paracellular permeability and that failure of mammary tight junctions to seal at secretory activation results in precocious involution in the mammary gland.

## Abkürzungsverzeichnis

ACC	<i>antiparallel coiled-coil</i>
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
$\beta$ -HMG-CoA	$\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-Coenzym-A
BSA	Rinderserum-Albumin
CREB	<i>cAMP response element binding</i>
CCD	<i>charge coupled device</i>
cDNA	komplementäre DNA
CDR62	<i>cerebellar degeneration-related protein 2</i>
CG-NAP	<i>centrosome and Golgi localized PKN-associated protein</i>
cpm	Signale pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrokarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DTT	1, 4-Dithioerythrol
ECL	elektrochemische Lumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiozyanat
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GDF	<i>GDI displacement factor</i>
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin

---

IGFBP	<i>insulin like growth factor binding protein</i>
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MAGUK	<i>membrane-associated guanylate kinase homologues</i>
MAP Kinase	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCP1	Monocyte chemoattractant protein-1
MMTV-LTR	<i>mouse mammary tumor virus long terminal repeat</i>
mRNA	messenger RNA
MOPS	Morpholinopropan-Sulfonsäure
NDRF	<i>neurogenic differentiation factor</i>
OPDA	Ortho-Phenyldiamine
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>
PKN	Proteinkinase N
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRK	<i>protein kinase C related kinase</i>
Prkcl	<i>protein kinase C like kinase</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	<i>Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase</i>
RT-PCR	reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TER	transepithelialer Widerstand ( <i>transepithelial electrical resistance</i> )
TGFβ	transformierender Wachstumsfaktor β ( <i>transforming growth factor β</i> )
TUNEL	terminale Desoxyribosyl-Transferase-vermitteltes dUTP-Nick End Labeling
WAP	<i>whey acidic protein</i>

## Danksagung

Die vorliegende Dissertationsschrift entstand am Institut für Pharmakologie der Charité Universitätsmedizin Berlin und wurde durch Herrn Prof. Dr. Franz Theuring betreut. Ihm möchte ich für die kontinuierliche Unterstützung und Förderung während der letzten sechs Jahre danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Heiko Stuckas, der mit der Generierung der transgenen Tiere nicht nur die Grundlage für diese Dissertation geschaffen hat, sondern mich in dieser Zeit ebenfalls als Lehrer und kompetenter Diskussionspartner begleitet hat. Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus Frau Prof. Dr. Margaret C. Neville, die mich für einen einjährigen Forschungsaufenthalt in ihr Labor am *Department of Physiology and Biophysics* des *University of Colorado Health Sciences Center*, Denver, aufnahm und mich in dieser Zeit in jeder erdenklichen Weise unterstützte.

Für die zur Verfügung gestellten biologischen Materialien danke ich Herrn Dr. Yasuhiro Ohashi, Osaka, dessen Vorarbeiten maßgeblich an der Entstehung dieser Dissertationsschrift beteiligt waren und der mit seinen konstruktiven Anregungen darüber hinaus dieses Projekt sehr bereicherte. Auch Frau Dr. Irene Fialka, Denver, und Herrn Prof. Dr. Jeffrey Pollard, New York, danke ich für die zur Verfügung gestellten Materialien. Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Sebastian Bachmann sowie Frau Petra Schrade am Institut für Anatomie der Charité Universitätsmedizin Berlin für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Präparate danken. Allen ehemaligen und aktuellen Kollegen am Institut für Pharmakologie und sowie am *University of Colorado Health Sciences Center* danke ich darüber hinaus für die zahlreichen Ratschläge und konstruktiven Diskussionen während der letzten sechs Jahre.

Für die finanzielle Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit danke ich der Kommission für Nachwuchsförderung und Weiterbildung der Charité Universitätsmedizin Berlin, insbesondere Herrn Prof. Dr. Roland Wauer, sowie dem *Biomedical Sciences Exchange Program Inc.*, namentlich Herrn Prof. Dr. Hilmar Stolte und Frau Birgit Heller.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, die mich nicht nur während der letzten sechs Jahre stets in jeder erdenklichen Form unterstützten sowie Steffi, nicht nur für ihre nahezu unerschöpfliche Geduld in dieser Zeit.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## Publikationsliste

### Originalarbeiten

Fischer A, Stuckas H, Gluth M, Russel TD, Rudolph MC, Beeman NE, Bachmann S, Umemura S, Ohashi Y, Neville MC and Theuring F. Impaired Tight Junction Sealing and Precocious Involution in Mammary Glands of PKN1 Transgenic Mice. *J Cell Sci* 2007; 120:2272-83.

Russel TD, Palmer CA, Orlicky DJ, Fischer A, Rudolph MC, Neville MC, McManaman JL. Cytoplasmic lipid droplet accumulation in developing mammary epithelial cells: roles of adipophilin and lipid metabolism. *J Lipid Res* 2007; 48: 1463-75.

Baumgart DC, Fischer A. 2007. Virchow's Node. *Lancet* (zur Veröffentlichung akzeptiert).

Russel TD, Fischer A, Beeman NE, Freed EF, Neville MC, Schaack J. Transduction of the Mammary Epithelium with Adenovirus Vectors In Vivo. *J Virol* 2003; 77: 5801-5809

### Abstracts und Poster

Fischer A, Stuckas H, Rudolph MC, Schrade P, Bachmann S, Ohashi Y, Theuring F and Neville MC. 2005. Impaired Mammary Gland Development in Transgenic Mice Expressing a Constitutively Activated Form of the RhoA Effector Molecule PKN. Abstract. First International CCR Symposium. Berlin.

Fischer A, Stuckas H, Rudolph MC, Schrade P, Bachmann S, Ohashi Y, Theuring F and Neville MC. 2003. Impaired Mammary Gland Development in Transgenic Mice Expressing a Constitutively Activated Form of the RhoA Effector Molecule PKN. Abstract. Gordon Conference on Mammary Gland Biology. Bristol, Rhode Island, USA.

Stuckas H, Petersen I, Fischer A, Ohashi Y, and Theuring F. 2001. Mammary gland specific RhoA transgene expression causes impaired lobuloalveolar development in transgenic mice. Abstract. 7th International Colloquium on Cellular Signal Recognition and Transduction. Berlin.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Andreas Fischer, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Funktionelle Charakterisierung des Rho-Effektormoleküls PKN in einem transgenen Mausmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Andreas Fischer