

Funktionelle Analyse der atypischen Protein Kinase C

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Judit Kovac

geboren am 20. März 1965 in Hildesheim

2006

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2003 bis Juni 2006 am Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie in Hannover unter der Betreuung von Prof. Dr. Gregor Eichele und Dr. Michael Leitges angefertigt.

Referent:

Prof. Dr. Gregor Eichele

Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie, Hannover

Korreferent:

Prof. Dr. Walter Müller

Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion:

29. August 2006

Meiner Mutter

Zusammenfassung

Die atypischen Protein Kinase C-Isoformen PKC ν/λ und ζ repräsentieren die dritte Klasse der Serin/Threonin-phosphorylierenden PKC-Familie. Obwohl gezeigt werden konnte, dass aPKCs zahlreiche biologische Prozesse regulieren, bleibt es aufgrund ihrer hohen Homologie in Aminosäuresequenz und Domänenstruktur bis heute schwierig, den beiden aPKCs biochemische Funktionen zuzuwenden. Zahlreiche Studien bestätigten ihr redundantes Zusammenwirken in zellphysiologischen Prozessen, insbesondere bei der Etablierung epithelialer Zellpolarität. Die unterschiedlichen Phänotypen aPKC-defizienter Mäuse zeigen jedoch, dass spezifische Funktionen vorhanden sind. Während der Verlust des PKC ζ -Gens zu einem vergleichsweise milden Phänotyp führt, resultiert die PKC ν/λ -Defizienz in einer frühen embryonalen Letalität.

Um diese Diskrepanz aufzuklären, wurden die aPKCs zunächst auf ihre spatio-temporale Expression während der Embryogenese untersucht. Hinweise auf ihr mögliches funktionell-redundantes Wirken konnten insbesondere in den frühen Stadien der Embryonalentwicklung erbracht werden, in denen die aPKCs in überlappenden Domänen präsent waren, wobei PKC ζ allerdings deutlich schwächer exprimiert war. In der zweiten Hälfte der Embryonalentwicklung entwickelten die aPKCs ein hochdifferenziertes Expressionsmuster in verschiedenen Gewebekompartimenten des Gehirns und des Körpers, so dass sich hierdurch wichtige Anhaltspunkte auf spezifische Funktionen ableiten lassen.

Eine morphologische Analyse PKC ν/λ -defizienter Mausembryonen des Embryonalaltages 7.5 ergab, dass ein klar definierter einschichtiger Epithelverband des Ektoderms nicht mehr vorhanden war. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten Defekte in der apiko-basalen Zellpolarität sowie der epithelialen Barrierefunktion aufgrund fehlender *tight junctions*, *adherens junctions* und Desmosomen festgestellt werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde durch die Generierung und Analyse einer PKC ν/λ *knockout*/ PKC ζ *knockin*-Mauslinie das funktionell-redundante Zusammenwirken der aPKCs während der Embryogenese untersucht. Die PKC ζ -Expression unter Kontrolle des PKC ν/λ -Promotors konnte die embryonale Letalität der ν/λ -Defizienz verhindern und deutet darauf hin, dass in diesen Stadien beide aPKCs redundant wirksam sind. Dass diese funktionelle Austauschbarkeit der aPKCs allerdings nicht vollständig ist, sondern auch spezifische Funktionen eine Rolle spielen, beweist die hohe postnatale Letalität der homozygoten *knockout/knockin*-Maus. Nahezu alle Tiere sterben innerhalb der ersten beiden Lebensstage. Überlebende Tiere zeigen eine hohe Varianz in ihrem Phänotyp mit vor allem motorischen Defekten.

Schlagwörter: atypische PKC, Zellpolarität, Zellkontakte, Gastrulation, Embryogenese, *gene targeting*, *knockout/knockin*, funktionelle Redundanz

Abstract

The atypical protein kinase C isoforms PKC $\nu\lambda$ and ζ represent the third class of the PKC family of serine/threonine kinases. Despite the fact that aPKCs have been shown to regulate numerous biological processes it remains difficult to assign specific biochemical functions to both isoforms due to their high homology in amino acid sequences and domain structure. Various studies indicate aPKC redundancy in physiological processes including the establishment of cell polarity. On the other hand differences in the phenotypes of aPKC-deficient mice clearly suggest isoform-specific functions. The lack of PKC ζ results in a mild phenotype when compared to the early embryonic lethality observed in PKC $\nu\lambda$ -deficient mice.

In order to resolve these discrepancies, the spatio-temporal aPKC expression pattern was examined during mouse embryogenesis. Evidences for possible functional-redundant correlation comes mostly from expression analysis at early stages, when aPKCs show highly overlapping expression domains. However, PKC ζ RNA abundance is rather low at all stages. In the second phase of gestation both aPKCs show a more differentiated expression pattern in diverse tissues and compartments of the brain and the body, suggesting specific functionality.

A morphological analysis of PKC $\nu\lambda$ -deficient embryos at embryonic stage 7.5 revealed abnormal embryonic epithelial organisation without organized association of cells. Defects in apico-basal cell polarity and selective barrier function were most likely results of the absence of tight junctions, adherens junctions and desmosomes as observed by electron microscopy.

Finally, functional redundancy of aPKCs during embryogenesis was examined by the generation and analysis of a PKC $\nu\lambda$ *knockout*/ PKC ζ *knockin* mouse strain. In these animals, PKC ζ expression under the control of the PKC $\nu\lambda$ promoter was able to rescue the embryonic lethality caused by the $\nu\lambda$ deficiency, indicating that at this stages both aPKCs act in a redundant manner. However, the functional redundancy is not perfect, but specific functions became apparent by the high postnatal lethality of homozygous *knockout/knockin* animals. Almost all these mice die within the first two days after birth. Surviving animals display a variance of phenotypes with prominent motoric defects.

Key words: atypical PKC, cell polarity, cell-cell contacts, gastrulation, embryogenesis, *gene targeting*, *knockout/knockin*, functional redundancy

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	4
ABSTRACT	5
INHALTSVERZEICHNIS	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG	10
1.1 PROTEIN KINASE C.....	10
1.1.1 Domänenstruktur	10
1.1.2 Die atypischen Isoformen PKC ι/λ und PKC ζ	12
1.1.2.1 Regulierung von aPKCs.....	13
1.1.2.2 PKC-Deletionen in der Maus	14
1.2 ZELLPOLARITÄT	15
1.2.1 Zellkontakte und Zellverbindungsstellen	16
1.2.2 Regulation der Zellpolarisierung.....	18
1.2.3 aPKC Knockout bei Invertebraten	19
1.3 EMBRYONALE GASTRULATION	20
1.4 APKC-REDUNDANZ WÄHREND DER POLARISIERUNG VON EPITHELIALEN SÄUGERZELLEN	21
1.5 ZIELSETZUNG	22
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 BEHANDLUNG UND HALTUNG DER VERSUCHSTIERE	23
2.1.1 Gewinnung von Embryonen.....	23
2.2 HISTOLOGISCHE METHODEN.....	23
2.2.1 Präparation von Embryo-Gewebe	23
2.2.2 In situ Hybridisierung (ISH).....	24
2.2.3 Mikroskopie und Bildbearbeitung.....	24
2.2.4 HE-Färbung	24
2.2.5 Transelektronenmikroskopische Technik (TEM-Technik).....	25
2.2.6 TUNEL-Assay.....	25
2.2.7 Ki67-Assay.....	26
2.3 GENERIERUNG VON cDNA UND APKC PLASMIDEN	27
2.3.1 Generierung von cDNA.....	27
2.3.2 Generierung isoformspezifischer aPKC Plasmide	27
2.4 HERSTELLUNG ISOFORMSPEZIFISCHER POLYKLONALER ANTIKÖRPER FÜR APKCS	27
2.4.1 Klonierung der Peptide in pGEX-6P-Expressionsvektoren.....	27
2.4.2 Expression von aPKC-GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	27

2.4.3	<i>Immunisierung von Kaninchen</i>	28
2.5	WESTERN BLOT ANALYSE	28
2.5.1	<i>Proteinextraktion aus Gewebe</i>	28
2.5.2	<i>Western Blot mit polyklonalen aPKC Antikörpern</i>	29
2.6	QUANTITATIVE RT-PCR (QPCR)	30
2.7	GENE TARGETING/KNOCK OUT TECHNOLOGIE	31
2.7.1	<i>Klonierung der Targeting Vektoren TV/tag und TV/GFP</i>	31
2.7.2	<i>Modifizierungen an den beteiligten Ausgangsplasmiden</i>	31
2.7.2.1	<i>piota 1.2 Spe</i>	31
2.7.2.2	<i>pzeta6</i>	32
2.7.2.3	<i>3'UTRi(4)</i>	32
2.7.2.4	<i>Isolierung des IRES-EGFP Fragments und der Neomycinresistenz-Kassette</i>	33
2.7.3	<i>Klonierungsstrategie im Ausgangsplasmid iMutSal + Adapter Sma-(3)</i>	33
2.7.4	<i>Finale Klonierung zur Generierung der Targeting-Vektoren TV/tag und TV/GFP</i>	34
2.7.5	<i>Kultivierung von Embryonalen Stammzellen</i>	34
2.7.6	<i>Transfektion der Targeting-Vektoren in ES-Zellen, ES-Zell-Selektion und Analyse</i>	35
2.7.7	<i>Blastozysteninjektion</i>	36
2.7.8	<i>Keimbahnchimären</i>	36
2.8	SOUTHERN BLOT GENOTYPISIERUNG	37
2.8.1	<i>Präparation genomischer DNA aus ES-Zellen</i>	37
2.8.2	<i>Gelaufreinigung und Blotting</i>	37
2.8.3	<i>Sondensynthese und Hybridisierung</i>	37
2.9	DNA-EXTRAKTION AUS SCHWANZBIOPSIEN	38
2.9.1	<i>Präparation (extra-) embryonaler DNA zur Genotypisierung von Mausembryonen</i>	39
2.10	PCR-BASIERTES GENOTYPISIEREN	39
2.11	GEN BANK ID	39
2.12	OLIGONUKLEOTIDE	40
2.13	PLASMIDE UND VEKTOREN	42
2.14	ANTIKÖRPER	43
2.15	KITS	44
3	ERGEBNISSE	45
3.1	GENERIERUNG SPEZIFISCHER aPKC-ANTIKÖRPER	45
3.1.1	<i>Klonierung der Peptide in Expressionsvektoren, Proteinexpression und Analyse der aPKC-Antikörperspezifität</i>	45
3.2	EXPRESSIONSANALYSE VON PKC ι/λ UND ζ WÄHREND DER EMBRYOGENESE DER MAUS.....	48
3.2.1	<i>PKC ι/λ und PKC ζ Expression an den embryonalen Tagen E7.5 bis E10.5</i>	49
3.2.2	<i>PKC ι/λ- und PKC ζ-Expression am embryonalen Tag E12.5</i>	51
3.2.3	<i>PKC ι/λ- und PKC ζ-Expression am embryonalen Tag E14.5</i>	53
3.2.4	<i>PKC ι/λ- und PKC ζ-Expression am embryonalen Tag E16.5</i>	56
3.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR PHÄNOTYPISCHEN CHARAKTERISIERUNG DER PKC ι/λ - DEFIZIENTEN MAUS .	61
3.3.1	<i>Morphologische Untersuchung des E7.5-Embryos</i>	61

3.3.2	<i>Untersuchungen zu Proliferation und Apoptose</i>	62
3.3.3	<i>Elektronenmikroskopische Untersuchungen</i>	64
3.4	GENERIERUNG EINER PKC ι/λ <i>KNOCKOUT</i> /PKC Z-CDNA <i>KNOCKIN</i> MAUS (<i>RESCUE</i> -MAUS)	66
3.4.1	<i>Klonierung der Targeting-Vektoren</i>	66
3.4.2	<i>Etablierung und Analyse der 4 ES-Zell-Linien mit zielgerichtetem Rescue-Allel</i>	70
3.4.3	<i>Etablierung und Zucht der mutanten Mauslinie</i>	76
3.5	UNTERSUCHUNG DES PHÄNOTYPS DER PKC ι/λ <i>KNOCKOUT</i> /PKC Z CDNA <i>KNOCKIN</i> -MAUS	77
3.5.1	<i>Untersuchungen während der Embryogenese</i>	77
3.5.2	<i>Statistische Verteilung bei juvenilen Nachkommen</i>	77
3.5.3	<i>Analyse der neonatalen Nachkommen</i>	78
3.5.4	<i>Anomalien bei adulten Homozygoten</i>	79
4	DISKUSSION	81
4.1	DIE EXPRESSION VON PKC ι/λ UND Z IN DER EMBRYOGENESE DER MAUS	81
4.2	DER EINFLUSS VON PKC ι/λ WÄHREND DER GASTRULATION	83
4.3	DIE PKC ι/λ <i>KNOCKOUT</i> /PKC Z-CDNA <i>KNOCKIN</i> -MAUS (<i>RESCUE</i> -MAUS).....	85
4.3.1	<i>Das Potential der ES-Zell-Linien $\iota\Delta/rescue_tag$ und $\iota\Delta/rescue_GFP$</i>	91
5	LITERATUR	93
6	ANHANG	102
6.1	PKC ι/λ - UND PKC Z-AMINOSÄURESEQUENZ-ALIGNMENT	102
6.2	NUKLEOTID- UND AMINOSÄURESEQUENZBEREICHE FÜR DIE GENERIERUNG ISOFORMSPEZIFISCHER POLYKLONALER APKC-ANTIKÖRPER.....	103
6.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	104
	ERKLÄRUNG	106
	DANKSAGUNG	107
	PUBLIKATIONEN	108
	LEBENS LAUF	109

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 PKC-Domänenstruktur.....	11
Abb. 1.2 Epitheliale Zellkontakte.....	17
Abb. 3.1 Isoformspezifische Aminosäuresequenzen der aPKC-Isoformen.....	46
Abb. 3.2 Restriktionsanalyse der für die Generierung der aPKC-spezifischen Peptide korrespondierenden Nukleotidsequenzen, die in den Expressionsvektor pGex-6P kloniert wurden.....	46
Abb. 3.3 Eluate der rekombinanten aPKC-Peptide in einem Coomassie-gefärbten Gel.	47
Abb. 3.4 Western Blot zur Überprüfung der Spezifität der polyklonalen Antikörper gegen PKC ι/λ und ζ	48
Abb. 3.5 Expression von PKC ι/λ und ζ in frühen Embryonalstadien.....	50
Abb. 3.6 Expression von PKC ι/λ und ζ am Embryonaltag E12.5.	52
Abb. 3.7 Expression von PKC ι/λ und ζ am Embryonaltag E14.5.	55
Abb. 3.8 Expression von PKC ι/λ und ζ am Embryonaltag E16.5.	58
Abb. 3.9 Morphologische Untersuchung des PKC ι/λ -defizienten E7.5-Embryos.....	62
Abb. 3.10 Analyse der Proliferation und Apoptose im PKC ι/λ -defizienten Embryo (E7.5).....	63
Abb. 3.11 Elektronenmikroskopie der Zell-Zellkontakte im Ektoderm von Wildtyp und PKC ι/λ -defizienten E7.5 Embryonen.....	65
Abb. 3.12 Veränderungen der Aminosäuresequenz im Bereich des PKC ι/λ und ζ - Genfusion.	67
Abb. 3.13 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie.	69
Abb. 3.14 Schematische Darstellung der Southern Blot-Analyse der vier ES-Zell-Linien.	73
Abb. 3.15 Southern Blot Analyse von ES-Zell-Klonen.....	74
Abb. 3.16 Expression des chimären PKC ι/λ - ζ -Proteins in Klonen der ES-Zell-Linien +/rescue_tag und $\iota\Delta$ /rescue_tag.....	75
Abb. 3.17 Expression des chimären PKC ι/λ - ζ -Proteins der ES-Zell-Linie +/rescue_GFP.....	76
Abb. 3.18 Überlebenskurve zweier Würfe doppelt-heterozygoter Verpaarungen.	79
Abb. 3.19 Fußabdrücke der beiden homozygoten adulten Nachkommen im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern.	80
Abb. 3.20 Schematische Darstellung der Fußabdrücke adulter Tiere.....	80

1 Einleitung

1.1 Protein Kinase C

1.1.1 Domänenstruktur

Die Entwicklung und Organisation eines vielzelligen Organismus erfordert von einer Einzelzelle, auf extrazelluläre Signale mit einer spezifischen Expression von Genen zu reagieren. Für die Regulation intrazellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose existiert ein Netzwerk aus verschiedenen Signaltransduktionswegen, welche die Verarbeitung externer Signale nach ihrer Bindung an membranständige Rezeptoren über die Aktivierung intrazellulärer Mediatoren und die transkriptionelle Regulierung von Genen ermöglichen.

Die Protein Kinase C (PKC) nimmt eine zentrale Rolle als Mediator innerhalb dieser Signalübermittlungskaskaden ein. Ihre katalytische Aktivierung erfolgt klassischerweise nach Bindung eines Signalmoleküls an membranständige monomere Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), die daraufhin dimerisieren und an ihren zytoplasmatischen Domänen autophosphoryliert werden (Schlessinger, 2000). Die dadurch an die Membran translozierte Phospholipase C hydrolysiert Phosphoinositidyl-4,5-bisphosphat zu den als *second messenger* wirkenden Produkten Inositol-3-4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) (Nishizuka, 1995). Die Akkummulation von DAG und die durch IP_3 mobilisierten Ca^{2+} -Ionen aus Ca^{2+} -Speichern des endoplasmatischen Retikulums bewirken schließlich nach Bindung der Protein Kinase C an das membranständige DAG deren Aktivierung (Nishizuka, 2003).

In Säugern sind bisher 10 verschiedene PKC-Isoformen identifiziert worden. Diese zeichnen sich durch hochkonservierte Merkmale in ihrer N-terminalen regulatorischen und C-terminalen katalytischen Region aus. Aufgrund struktureller Divergenzen in ihren N-terminalen regulatorischen Domänen werden sie in drei Unterfamilien unterteilt. Die konventionellen PKCs (cPKC) umfassen α , γ und die alternativ gespleißten Isoformen βI und βII . cPKCs besitzen eine cysteinreiche C1-Domäne, bestehend aus den *tandem repeats* C1A und C1B, an die Phosphatidylserin binden kann, die essentiell für die Interaktion mit und die Aktivierung durch den *second messenger* DAG ist. Eine nur bei den cPKCs auftretende zusätzliche Ca^{2+} -Ionen-abhängige Aktivierung wird durch die zur C1-Domäne C-terminal lokalisierte C2-Domäne vermittelt (Newton, 2001; Parker and Murray-Rust, 2004). Die zu den *novel* PKCs (nPKC) zählenden Isoformen δ , ϵ , η und θ werden ebenfalls durch DAG und

Phosphatidylserin aktiviert, sind aber unabhängig von Ca^{2+} -Ionen, da sie anstelle der archetypischen C2-Domäne nur über eine C2-ähnliche Domäne verfügen (Toker, 1998). Zur dritten Unterfamilie, den atypischen PKCs (aPKCs), gehören die Isoformen ι/λ und ζ , die ebenfalls Ca^{2+} -Ionen-insensitiv sind, da ihnen die C2-Domäne fehlt. Zusätzlich besitzen aPKCs nur eine halbe C1-Domäne, die sie trotz ihrer Ähnlichkeit zur C1A-Domäne unabhängig von DAG macht (Ways et al., 1992). Sie können aber durch Phosphatidylserin, Arachidonsäure oder Ceramide aktiviert werden (Nakanishi et al., 1993; Muller et al., 1995; Blobel et al., 1996). Im Gegensatz zu den cPKCs und nPKCs verfügen die atypischen Isoformen über eine für ihre Regulation erforderliche N-terminal lokalisierte PB1- (Phox und Bem1p) Domäne (Parker and Murray-Rust, 2004). Gemeinsam ist allen PKC-Isoformen eine C-terminale Kinase-Domäne, die über eine ATP-bindende Region, eine sog. Aktivierungsschleife, ein *turn*-Motiv und ein hydrophobes Motiv verfügen (Hirai and Chida, 2003). Eine Gegenüberstellung der Domänenstrukturen der drei PKC-Unterfamilien ist in Abb. 1.1 dargestellt. Durch Bindung von Aktivatoren und anschließender Phosphorylierung der Aktivierungsschleife wird das Pseudosubstrat freigesetzt. Die dadurch bedingte Konformationsänderung bewirkt, dass die im inaktiven Zustand verdeckte ATP-bindende Region freigelegt und zusammen mit der Autophosphorylierung des *turn*-Motivs die vollständige Entfaltung der Kinaseaktivität erreicht wird (Newton, 2001).

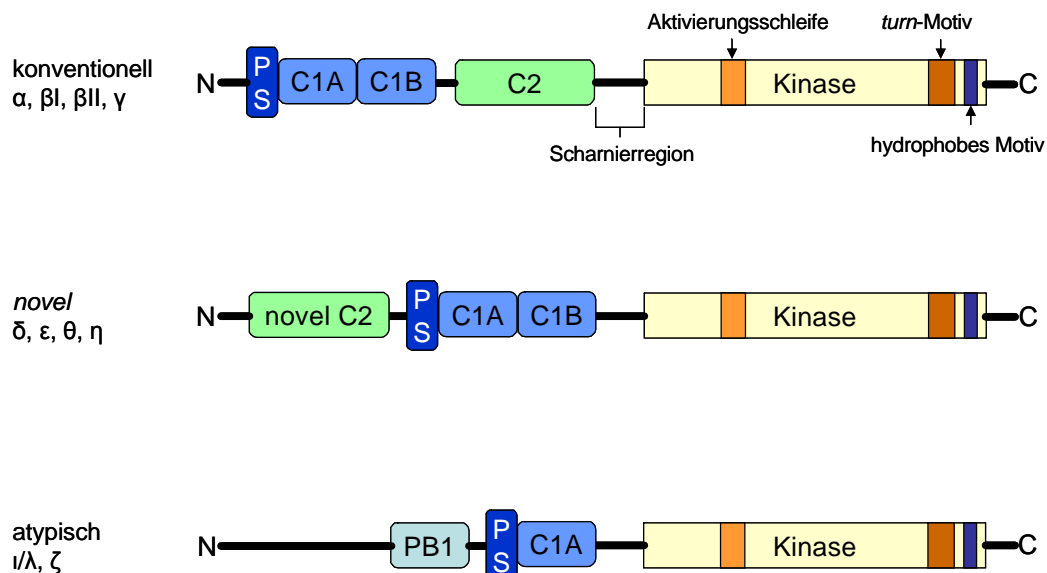


Abb. 1.1 PKC-Domänenstruktur. Die aus zehn Isoformen bestehende Familie wird in Abhängigkeit struktureller Unterschiede in der regulatorischen Domäne in konventionelle, novel und atypische PKCs eingeteilt. Abkürzung: PS, Pseudosubstrat-Domäne.

1.1.2 Die atypischen Isoformen PKC ι/λ und PKC ζ

Über molekulare Klonierung einer cDNA-Bibliothek aus Rattengehirn und biochemische Analysen wurde PKC ζ als erste atypische PKC-Isoform in Säugern identifiziert (Ono et al., 1988). Die Aminosäuresequenz des auf dem Chromosom 4 des Mausgenoms liegenden orthologen Gens der Maus ist der Ratten-PKC ζ -Aminosäuresequenz zu 99% homolog (Goodnight et al., 1992). Transkription über einen alternativen internen PKC ζ -Promoter und alternatives Spleißen resultiert in einem zweiten Transkript, PKC $M\zeta$, das spezifisch im ZNS exprimiert wird (Marshall et al., 2000). Die auf dem Chromosom 3 liegende zweite atypische PKC der Maus, PKC λ , zeigt in ihrer Aminosäuresequenz eine 72%-ige Homologie in der Gesamt-Aminosäuresequenz zu der von PKC ζ (Akimoto et al., 1994). Da das orthologe humane Gen die synonyme Bezeichnung PKC ι trägt (Selbie et al., 1993), wird diese Isoform im folgenden PKC ι/λ genannt.

Beide aPKC-Gene werden durch jeweils 18 Exons kodiert und als Proteine von 67,7 kDA (PKC ζ) und 67,2 kDA (PKC ι/λ) translatiert. In der adulten Maus konnte durch Northern Blot-Analyse gezeigt werden, dass PKC ζ in der Lunge, der Niere, im Hoden und im Intestinum exprimiert ist, während PKC ι/λ -Transkripte in allen der untersuchten Gewebetypen nachgewiesen werden konnte (Goodnight et al., 1992; Selbie et al., 1993).

Die aPKC-Isoformen sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, die für die normale Zellfunktion und das Überleben der Zelle entscheidend sind. Beiden wird die Regulierung der MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*) induzierten Zellproliferation (Berra et al., 1993; Bjorkoy et al., 1997), der DNA-Synthese (Berra et al., 1995; Akimoto et al., 1998) sowie apoptotischer Prozesse zugeschrieben (Sanz et al., 1999; Sanz et al., 2000; Moscat et al., 2003). Zusätzlich sind sie als Mediatoren in die Regulierung der Zellmigration (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Gao et al., 2002) und der Zelldifferenzierung involviert (Kampfer et al., 2001). Für beide Isoformen konnte zudem eine Rolle in der Entwicklung von karzinogenen Tumoren nachgewiesen werden (Ghosh et al., 2002; Murray et al., 2004; Regala et al., 2005).

1.1.2.1 Regulierung von aPKCs

Der Mechanismus der enzymatischen aPKC-Aktivierung besteht hauptsächlich aus zwei Ereignissen, die Pseudosubstratfreisetzung von der substratbindenden Grube sowie die Phosphorylierung der Kinasedomäne umfasst (Newton, 2001). Neben den für die vollständige und stabile Entfaltung der PKC-Enzyme essentiellen Phosphorylierungen von Threoninresten spielt die simultane Interaktion von PDK-1 (Phosphoinositid-abhängige Protein Kinase-1) und aPKC mit Phosphatidylinositol-3-4,5-triphosphat (PIP₃) eine entscheidende Rolle (Nakanishi et al., 1993). Die nach Ligandenbindung mit der RTK interagierende PI₃-Kinase setzt PIP₃ frei und wird durch Bindung an sie aktiviert. Die initiale Phosphorylierung eines Threoninrestes in der Aktivierungsschleife erfolgt durch die PKC-regulierende Kinase PDK-1, die sich an das hydrophobe Motiv der Kinase-Domäne anlagert (Parker and Parkinson, 2001), mit dem Resultat, dass es zu einer Autophosphorylierung des *turn*-Motivs kommt (Le Good et al., 1998). Zeitgleich interagiert aPKC mit PIP₃, wodurch die Pseudosubstrat-abhängige Autoinhibierung freigesetzt wird. Zusammengefasst trägt PIP₃ zur vollständigen und stabilen Aktivierung der aPKC durch die direkte Modulierung der Pseudosubstrat-Domäne und der indirekten Modulierung über die Phosphorylierung der Kinase-Domäne durch PDK-1 bei.

Darüber hinaus wird die Aktivität, die zeitliche Regulierung sowie die Lokalisation der aPKC-Isoformen durch Protein-Protein-Interaktionen kontrolliert. Die Bindung von PAR-4 (*prostate androgen response-4*) an die cystinreiche Sequenz der C1-Domäne inhibiert die aPKC-Kinaseaktivität (Diaz-Meco et al., 1996). Eine weitere Regulierung erfolgt durch Interaktion von Par-3 (*partitioning defective gene-3*) mit der C-terminalen Kinasedomäne (Kotani et al., 2000; Nagai-Tamai et al., 2002). Eine wesentliche Rolle für der Regulierung von aPKCs spielt zudem die Interaktion von Proteinen mit der für die aPKC-Isormen typischen PB1-Domäne. Die Funktion dieser Domäne, die in Signalmolekülen der Hefe, in Pflanzen und Tieren vorkommt, konnte durch Sequenzanalysen und funktionelle Untersuchungen aufgeklärt werden (Ito et al., 2001; Terasawa et al., 2001). Sie enthält ein OPCA-Sequenzmotiv (Ponting et al., 2002), das sich aus den unterschiedlich benannten Motiven *octicosapeptide repeat* (OPR) (Ponting, 1996), das PC- (Phox und Cdc) Motiv (Nakamura et al., 1998), und dem AID- (atypische Protein Kinase C (PKC)-interagierende Domäne) Motiv zusammensetzt (Moscat and Diaz-Meco, 2000). Über diese OPCA-Domäne können Protein-aPKC-Interaktionen mit beispielsweise p62/ZIP (zeta-interagierendes Protein) und PAR-6 vermittelt werden (Puls et al., 1997; Sanchez et al., 1998; Joberty et al., 2000).

1.1.2.2 PKC-Deletionen in der Maus

Durch gezielte Geninaktivierung im Mausmodell konnten den PKC-Isoformen verschiedene *in vivo*-Funktionen zugewiesen werden. Beispielsweise ist ein Immundefekt bei PKC β I- und β II-defizienten Mäusen auf eine Beeinträchtigung des B-Zell-Rezeptor-Signalweges zurückzuführen (Leitges et al., 1996). Dagegen zeigen PKC θ -defiziente Mäuse einen Defekt im T-Zell-Rezeptor-Signalweg, der eine verminderte Proliferation reifer T-Zellen bedingt (Sun et al., 2000). Durch PKC δ wird unter anderem der Metabolismus des Herzens beeinflusst (Mayr et al., 2004), PKC α ist ein Mediator des Insulinsignalweges (Leitges et al., 2002) und PKC ϵ spielt eine Rolle in der Regulierung der Schmerzübermittlung (Khasar et al., 1999).

Die Generierung PKC ι/λ - bzw. ζ -spezifischer *knock out*-Mäuse resultierte in zwei deutlich unterschiedlichen Phänotypen. Die aus der Zerstörung des PKC ζ -Gens hervorgegangene Maus ist überlebensfähig, fertil und weist keine anatomischen Anomalien auf (Leitges et al., 2001). In der Milz und in lymphoiden Gewebestrukturen des Intestinums wurde eine Verzögerung in der postnatalen Entwicklung beobachtet, wobei die Population an unreifen B-Lymphozyten unabhängig vom Alter erhöht blieb (Leitges et al., 2001). Über aus PKC ζ -defizienten Mäusen abgeleitete embryonale Fibroblasten (EF) konnte erstmals der Einfluss von PKC ζ in Apoptose-induzierende Prozesse durch die Regulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B *in vivo* nachgewiesen werden. In der Lunge, die eine Hochexpressionsdomäne für PKC ζ in der adulten Maus darstellt, war die Aktivität von NF- κ B dabei am stärksten beeinträchtigt (Leitges et al., 2001). In späteren Studien mit mutanten Tieren konnte eine PKC ζ /NF- κ B-abhängige Verminderung in der Differenzierung von B-Zellen und der T-Helfer-Zell-vermittelten Immunantwort in der Lunge (Martin et al., 2002; Martin et al., 2005) sowie in der T-Zell-vermittelten Hepatitis in der Leber gezeigt werden (Angeles Durán, 2004).

Im Gegensatz zu den anderen PKC-*knockouts* führte die Zerstörung des PKC ι/λ -Gens zu einem embryonal-letalen Phänotyp um E8.5 der Embryonalentwicklung (Bandyopadhyay et al., 2004; Soloff et al., 2004). Aus PKC ι/λ -defizienten Embryonen abgeleitete Fibroblasten zeigen eine Veränderung in ihrer zellulären Morphologie, wobei allerdings kein Defekt in der Regulation des NF- κ B-Signalweges nachgewiesen werden konnte (Soloff et al., 2004). In PKC ι/λ -defizienten ES-Zellen und aus ihnen differenzierten Adipozyten wurde jedoch ein Defekt des Insulin-Signalweges festgestellt (Bandyopadhyay et al., 2004). Die vorläufigen Untersuchungen zur Charakterisierung des Phänotyps der im Labor Leitges generierten PKC

$\nu\lambda$ -*knockout*-Maus zeigten in E7.5 morphologische Defekte. In der lichtmikroskopischen Analyse wurde beobachtet, dass das embryonale Ektoderm-Epithel anteriorwärts umklappte und ein abnormal mehrschichtiges Epithel ausbildete. Darüber hinaus konnten mittels immunhistochemischer Färbung das *tight junction*-assoziierte Protein ZO-1 an apikalen Domänen des Epithels identifiziert werden. Zellschicksalsdeterminanten waren korrekt innerhalb des Embryos lokalisiert. Über an den embryonalen Tagen 7.5-8.5 durchgeführte Markergenanalysen (RNA-*in situ* Hybridisierungen an Ganzpräparaten) wurde gezeigt, dass die PKC $\nu\lambda$ -Defizienz keinen Einfluss auf die normale spatio-temporale Expression von für die Embryonalentwicklung wichtigen Musterbildungsgenen ausübt. Dies konnte für die korrekte Lokalisation der anterioren und posterioren Anteile des Neuroektoderms, den Primitivstreifen, das Notochord sowie Somiten- und Herzvorläuferzellen nachgewiesen werden (M. Leitges, persönliche Mitteilung).

1.2 Zellpolarität

Die Polarisierung der Zelle stellt einen fundamentalen biologischen Prozess dar. In der Entwicklung der *Metazoa* ist Zellpolarisierung für die spatio-temporale Regulierung der Zell- und Gewebemorphogenese sowie die Identität und das Schicksal einer Zelle essentiell. Dabei ist die asymmetrische (polarisierte) Verteilung von regulatorischen Schlüssel-molekülen innerhalb einer Zelle von entscheidender Bedeutung. Durch sie werden beispielsweise die Ausbildung der anterior-posterioren (A/P) Körperachse bei *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* oder die für die Differenzierung in epitheliale und neuronale Zellen erforderlichen Prozesse der gerichteten Zellmigration und Zellmorphogenese reguliert (Etienne-Manneville and Hall, 2003; Henrique and Schweisguth, 2003).

Die Ausbildung einer polarisierten A/P-Achse ist bereits bei der Oogenese von *D. melanogaster* von Bedeutung (Pellettieri and Seydoux, 2002). Die erste Polarisationsphase bringt durch asymmetrische Zellteilung eine neue Stammzelle und einen Zystoblast hervor, der in der zweiten Phase durch vier aufeinanderfolgende mitotische Zellteilungen mit unvollständiger Zytokinese in einer 16-zelligen Zyste resultiert. In Abhängigkeit von der Art der Spindelorientierung und der Mikrotubuli gehen aus dieser Zyste eine reife Eizelle und 15 polypleide Nährzellen hervor (Lin and Spradling, 1995; Jean-René Huynh, 2001). Es wird vermutet, dass die Bildung der Eizelle durch die asymmetrische Verteilung einer vesikelreichen Organelle (Fusom) im posterior gelegenen Teil der Zystoblaste während der Zellteilungen bestimmt wird (de Cuevas and Spradling, 1998). Im Gegensatz dazu beginnt bei

C. elegans die Polarisierung der Eizelle erst nach der Fertilisation. Durch den Eintritt des Pronukleus am zukünftigen posterioren Ende des Einzell-Embryos formieren sich radial angeordnete Mikrotubuli zu einem sog. Spermienaster, der mit dem aktinreichen Kortex des Ein-Zell-Embryos (Zygote) interagiert und den Polarisierungsprozess initiiert (Chad A. Rappleye, 2002). Die darauf folgende Reorganisation kortikaler und zytoplasmatischer Strukturen bewirkt die Ausbildung der ersten A/P-Körperachse des *C. elegans*-Embryos. Die asymmetrische Anordnung des Spindelapparates führt aufgrund der anschließenden asymmetrischen Zellteilung zu unterschiedlich großen Tochterzellen, AB (anterior) and P1 (posterior), die ebenfalls Unterschiede in ihrer Spindelorientierung, der Länge des Zellzyklus und ihres Zellschicksals aufweisen (Ahringer, 2001).

Studien mit kultivierten epithelialen Säugerzellen offenbarten die Wichtigkeit von Verbindungsstellen zwischen zwei Zellen und von Zellen mit der extrazellulären Matrix (ECM) für die Bildung und Aufrechterhaltung der zellulären apikal-basalen Polarität. Initiale Zell-Zell-Kontakte bewirken die Rekrutierung verschiedener Zellkontakt- und Signalproteine sowie die spezifische Anordnung des Aktinzytoskeletts im Bereich der Adhäsionsstellen. Dies führt schließlich zu der Entwicklung von epithelspezifischen, asymmetrischen Zellkontaktstrukturen, die gezielte und umfangreiche Veränderungen der zellulären Zusammensetzung entlang der asymmetrischen apikal-basalen Achse und somit die Etablierung epithelialer Zellpolarität bewirken (Eaton and Simons, 1995; Drubin and Nelson, 1996; Gumbiner, 1996).

1.2.1 Zellkontakte und Zellverbindungsstellen

Maßgeblich an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt sind die das Lumen abgrenzenden apikal gelegenen *tight junctions* (TJ). Sie stellen eine Diffusionsbarriere dar und reduzieren so die parazelluläre Diffusion und verhindern die laterale (intramembrane) Diffusion von Lipiden und Membranproteinen zwischen den apikalen und basalen Domänen (Balda MS, 1998; Tsukita and Furuse, 1999; Tsukita et al., 2001). Zusätzlich dichten sie die Epithelzellen gegen Einstrom von Wasser ab (Kovbasnjuk et al., 1998). Verschiedene Mutationstudien der membranständigen TJ-Komponenten führten zu einer Undichtigkeit des Epithels und erlaubten eine erhöhte permeable Diffusion löslicher Ionen durch die Membran (Van Itallie and Anderson, 2006). Im sog. „Protein-Modell“ setzen sie sich aus integralen Membranproteinen (Occludin und Claudin 1/2), die das Rückgrat der TJ bilden (Furuse et al., 1993; Furuse et al., 1998), und peripheren Membranproteinen zusammen. In einfachen epithelialen Zellen sind es die zu den MAGUK-Proteinen (Membrane-assoziierte

Guanylatkinase-Homologe) zählenden ZO-1/2/3 (*zonula occludens*)-Proteine, welche eine Affinität über ihre aminoternale Hälfte mit der carboxyterminalen Aminosäuresequence von Occludin ausüben (Stevenson et al., 1986; Anderson, 1996). Das JAM-Protein (*junction-associated membrane protein*) tritt ebenfalls konzentriert an TJs auf. Es ist bislang unklar, ob sie eine Komponente der TJ-Stränge selbst darstellen oder zwischen ihnen lokalisiert sind (Tsukita et al., 1999). In Epithelzellen erfolgt die Ausbildung der *tight junctions* über durch Ca^{2+} und E-Cadherin induzierte Zell-Zell-Kontakte. Dabei werden zunächst *adherens junctions* im unterhalb der Membran gelegenen sog. Adhäsionsgürtel gebildet. Sie sind notwendig, damit über das dort fixierte Aktinnetz und weitere assoziierte Proteine die spezifischen Proteine der *tight junctions* rekrutiert werden können (Yamada et al., 2005). Zu den basolateral gelegenen Zellverbindungen zählen die Desmosomen, die an Intermediärfilamente des Zytoskeletts gebunden sind und über das Transmembranmolekül E-Cadherin benachbarte Epithelzellen miteinander verbinden und dadurch Zugkräfte gleichmäßig über das Epithel verteilen (Garrod et al., 2002; Getsios et al., 2004). *Gap junctions* sind für die Kommunikation zwischen epithelialen Zellen von Bedeutung, indem sie einen Kanal zwischen benachbarten epithelialen Zellen bilden, über den elektrische Signale, Ionen, Metabolite und *second messenger* bis zu einem Molekulargewicht von 1 kDa an die benachbarte Zelle weiterleitet werden können (Evans and Martin, 2002; Nicholson, 2003).

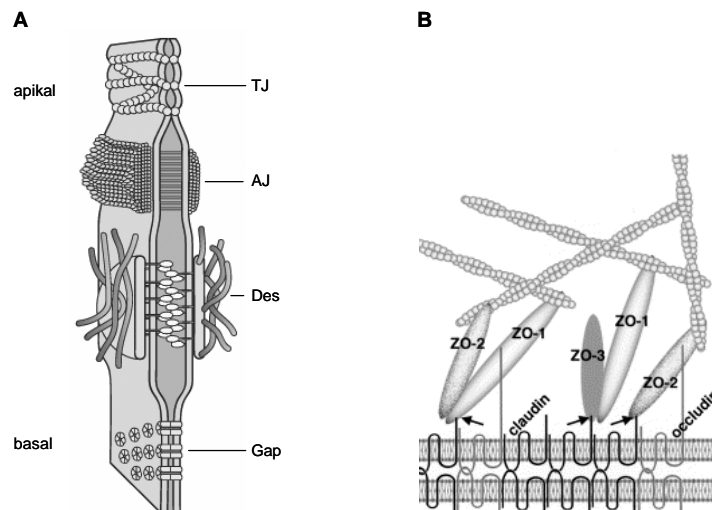


Abb. 1.2 Epitheliale Zellkontakte. (A) Schematische Darstellung der wichtigsten Zellkontakte und Zellverbindungsstellen zwischen benachbarten Epithelzellen. (B) „Protein-Modell“ der TJ-Organisation. Occludin und Claudin bilden mit jeweils vier Transmembrandomänen das Rückgrat der TJ. Man nimmt an, dass ZO-1/2/3 über ihre PDZ-Domänen an den zytoplasmatischen C-Terminus von Occludin binden. ZO-1 kann dabei mit ZO-2 und ZO-3 Heterodimere ausbilden. Über ZO-1 und ZO-2 erfolgt schließlich die Vernetzung zu den Aktinfilamenten. Abkürzungen: AJ, *adherens junctions*; Des, Desmosom; Gap, *gap junctions*; TJ, *tight junctions*; ZO, *zonula occludens*.

1.2.2 Regulation der Zellpolarisierung

Die Etablierung und Aufrechterhaltung zellulärer Polarität verschiedener Zelltypen beruht auf der Funktion des evolutionär konservierten PAR/aPKC-Komplexes. Dieser Komplex setzt sich zusammen aus einer atypischen PKC-Isoform (aPKC), den PDZ- (*Postsynaptic density 95; Discs Large; Zonula occludens 1*) Domänen enthaltenden Proteinen PAR-3 und PAR-6, deren Rekrutierung durch die kleinen GTPasen Cdc42 und Rac initiiert wird (Ohno, 2001; Wodarz, 2002).

Die *par*-Gene gehören zu den ersten Genen, denen mit Hilfe embryologischer Studien über RNAi-induzierten *knockdown* einer oder mehrerer Gene eine Rolle in der Regulierung von zellulärer Polarität und der resultierenden asymmetrischen Zellteilungsprozessen in der *C. elegans*-Zygote nachgewiesen werden konnte. Dabei war u.a. die zeitgleiche Lokalisation von Par-6 und Par-3 im anterioren Kortex sowie die Positionierung von Par-1 im posterioren Kortex für die asymmetrische Anordnung des Spindelapparates in der Zygote entscheidend (Guo and Kemphues, 1996). Mit der Identifizierung und Analyse von PKC-3 konnte die lokale und funktionelle Abhängigkeit der atypischen PKC von Par-6/Par-3 nachgewiesen werden (Tabuse et al., 1998; Hung TJ, 1999). In *D. melanogaster* ist beispielsweise die Kollokalisierung und Funktion dieses ternären Komplexes des bei dieser Spezies bezeichneten DmPar-6/DaPKC/Baz- (*D. melanogaster* aPKC, *Drosophila* aPKC, *Bazooka*) Komplexes für die Polarität neuronaler und epithelialer Zellen essentiell (Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999; Wodarz et al., 2000; Rolls et al., 2003).

In epithelialen MDCK- (*Madin-Darby canine kidney*) Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass der PAR/aPKC-Komplex für die Ausbildung von *tight junctions* erforderlich ist (Suzuki et al., 2001; Hirose et al., 2002). Der Par/aPKC-Komplex liegt im Zytoplasma zunächst in seiner inaktiven Form vor. Dabei ist Par-6 über sein OPR-Motiv mit dem in der PB1-Domäne von aPKC miteinander assoziiert. Par-3 ist mit seiner ersten PDZ-Domäne an die einzige PDZ-Domäne von Par-6 gebunden. Die Aktivierung des ternären Komplexes wird durch die GTPasen Cdc42 oder Rac1 gewährleistet (Burbelo et al., 1995; Garrard et al., 2003). Die aktivierte Form von Cdc42 bindet an die GTPase-bindende Domäne (GBD) von Par-6 (bestehend aus dem semi-CRIB-Motiv (Cdc42/Rac-interactive-binding) und der benachbarten PDZ-Domäne) (Joberty et al., 2000), wodurch Par-6 seine Konformation ändert, was die Kinaseaktivität der an ihr gebundenen aPKC erhöht (Yamanaka et al., 2001; Hirose et al., 2002). Der Proteinkomplex ist nach der aPKC-vermittelten Phosphorylierung eines Serinrestes in der dritten PDZ-Domäne von Par-3 vollständig aktiviert, transloziert an die

Zellmembran und initiiert dort die Bildung von TJs (Hirose et al., 2002; Henrique and Schweisguth, 2003). Für Par-3 ist eine weitere regulatorische Funktion in der Bildung von TJs in Säugerzellen beschrieben. Demnach bindet dieses Protein über seine PDZ-Domäne direkt an den C-Terminus von JAM-1 (*junctional adhesion molecule 1*). JAM-1 assoziiert mit der PDZ3-Domäne von ZO1, welches wiederum an den C-Terminus von Claudin bindet (Ebnet et al., 2001; Itoh et al., 2001). Inzwischen gibt es erste Hinweise auf ein regulatorisches Zusammenspiel des Par/aPKC-Komplexes mit anderen für die Etablierung der Zellpolarität essentiellen Proteinkomplexen. Der ebenfalls apikal lokalisierte Crb-Komplex besteht aus dem Transmembranprotein CRUMBS, dem Adapterprotein PALS1 und PATJ, die ebenfalls an den TJs von Epithelzellen lokalisiert sind (Lemmers et al., 2002; Roh et al., 2002a; Roh et al., 2002b). In Überexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass eine funktionelle Interaktion zwischen PALS1 und Par-6/aPKC in der Etablierung von TJs vorliegt (Hurd et al., 2003). Eine die Bildung von TJs inhibierende Wirkung wurde für das basolateral lokalisierte Protein mLgl (*lethal giant larvae*) gezeigt. Dabei wird PALS1 vorübergehend an die apikale Membran rekrutiert und nach Interaktion mit Par-6/aPKC durch aPKC phosphoryliert. Dabei kommt es vermutlich zu einer Konkurrenzsituation zwischen PALS1 und Par-3, indem PAR-6/aPKC wahlweise mit ihnen interagiert, um die Bildung von TJs zu regulieren. (Yamanaka et al., 2003).

1.2.3 aPKC *Knockout* bei Invertebraten

Im Gegensatz zu den Säugern ist bei Invertebraten nur eine atypische PKC-Isoform bekannt. Der Funktionsverlust des auf dem zweiten Chromosom lokalisierten *Drosophila*-atypischen PKC-Gens (*DaPKC*) wurde über die Insertion eines P-Elements herbeigeführt (Robertson et al., 1988), das in der Lage ist, über seine Transposase-Aktivität interne Deletionen oder Transpositionen im Genom zu induzieren. Bei hemizygoten *DaPKC*-defizienten Embryonen wurden schwere Defekte in der Ausbildung der embryonalen Kutikula sowie keinerlei Epithelbildung beobachtet, die den Tod der Embryonen zur Folge hatte. Homozygote *DaPKC*-defiziente Embryonen von heterozygoten Müttern waren in der Lage, ein embryonales Blastodermepithel auszubilden, welches jedoch in einer abnormal vielschichtigen Struktur vorlag. Neben dem Fehlen einer apiko-basalen Membranpolarität konnten die für Zell-Zell-Kontakte notwendigen *Zonula adherens* (*adherens junctions* bei Vertebraten) nicht identifiziert werden. Darüber hinaus wurde in Neuroblasten eine abnormale Orientierung der mitotischen Spindel festgestellt. Die Defekte in der epithelialen Polarität und Epithelmorphologie bedingten eine frühe embryonale Letalität bei *Drosophila* zum Zeitpunkt

der Gastrulation. (Wodarz et al., 2000). Bei *C. elegans* wurden die Auswirkungen des aPKC-Funktionsverlustes (PKC-3) über die RNA-Interferenz-Analyse (RNAi) untersucht. In diesem Fall traten Defekte in der Polarität bereits ab den ersten Zellteilungen auf. Die Zelle des pkc-3(RNAi)-Embryos teilte sich irregulär symmetrisch, gefolgt von einer zeitlich abnormalen synchronen zweiten Teilung der gleich großen Blastomeren, wobei beide Spindelapparate in der gleichen Teilungsebene angeordnet waren. Die Mutanten waren nicht in der Lage, ein Epithel auszubilden und starben in dieser frühen Phase der Embryonalentwicklung (Tabuse et al., 1998).

1.3 Embryonale Gastrulation

Während der Embryogenese stellt die Gastrulation einen morphogenetischen Prozess dar, der die Bildung der drei Keimblätter, bestehend aus Endoderm, Mesoderm und Ektoderm, durch koordinierte Proliferation und zelluläre Bewegungen ermöglicht (Sepich et al., 2005). Dabei spielt Polarität für die Ausbildung der Körperachse eine wesentliche Rolle. Die Ausgangssituation vor Beginn der Gastrulation stellt der Eizylinder am embryonalen Tag 5,5 der Maus-Embryogenese dar. Er setzt sich aus dem proximal (Pr) gelegenen ekto-plazentalen Kegel und dem distal (D) gelegenen embryonalen Epiblast zusammen, die jeweils aus dem Trophektoderm bzw. der inneren Zellmasse (ICM) der Blastozyste hervorgegangen sind. Vor der Gastrulation dreht sich die Pr-D-Achse um 90° und konvertiert in die A/P-Achse (Lewis and Tam, 2006). Während der Zellbewegungen der Gastrulation (E6.0-7.5) schiebt sich das mutmaßliche (zukünftige) Mesoderm und Endoderm des Epiblasten apikalwärts zwischen das Ektoderm und bildet einen dreischichtigen Embryo aus, bei dem das Ektoderm außen, das Endoderm innen und das Mesoderm zwischen Ektoderm und Endoderm angeordnet ist. Das Mesoderm stellt die innere Schicht des embryonalen Körperbauplans dar, aus der sich das adulte Skelett, Muskeln, das Bindegewebe der Haut, der Darmkanal und seine Derivate entwickeln. Das als embryonale innere Schicht bezeichnete Endoderm bildet im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung die inneren Epitelschichten des Darms und seine assoziierten Organe aus. Aus der äußeren Ektodermschicht entstehen die äußeren (epidermalen) Schichten der Haut und das Nervensystem (Keller, 2005). Dass auch aPKCs während der Gastrulation wichtige biologische Funktionen innehaben, zeigt der Phänotyp der PKC $\nu\lambda$ -defizienten Maus. Durch Abklappen des embryonalen Ektoderms wird die apikalwärts gerichtete Proliferation behindert und resultiert in einem irregulär mehrschichtigen Epithel.

1.4 aPKC-Redundanz während der Polarisierung von epithelialen Säugerzellen

Die Fähigkeit von Proteinen, die gleiche Funktion auszuüben und damit funktionell redundant zu wirken, konnte am Beispiel der *novel* PKC-Isoformen δ und ε gezeigt werden (Sacher, 2004). PKC δ - bzw. PKC ε - einzeldefiziente Mäuse sind lebensfähig, bedingt fertil und weisen unterschiedliche Defekte innerhalb ihres Immunsystems auf (Castrillo et al., 2001; Leitges et al., 2002; Miyamoto et al., 2002). PKC δ/ε - doppeldefiziente Embryonen sterben um E10.5 aufgrund schwerwiegender Defekte des Gefäßsystems. Die Schädigung betrifft neben den Gefäßen, die während der Vaskulogenese sowie während der Angiogenese entstanden sind, auch den Dottersack und embryonale Regionen der Plazenta (Sacher, 2004). Erste Hinweise auf eine mögliche funktionelle Redundanz der atypischen PKCs ν/λ und ζ existieren hinsichtlich ihres regulatorischen Einflusses auf die Zellpolarisierung in Säuger-Epithelzellen. In Überexpressions-Studien in kultivierten epithelialen MDCK-Zellen konnte die Lokalisation beider aPKCs an den apikalen Zell-Zell-Kontakten und ihre physikalische Interaktion mit den regulatorischen Komponenten Par-6, Par-3 und Cdc42/Rac nachgewiesen werden (Joberty et al., 2000; Lin et al., 2000; Yamanaka et al., 2001). Die Notwendigkeit ihrer Regulation durch Par-6 über ihre N-terminalen PB1-Domäne und ihre katalytische Aktivierung von Par-3 konnte für beide Isoformen anhand von überexprimierten mutanten Proteinen in den Zellen bestätigt werden (Izumi et al., 1998; Yamanaka et al., 2001). Deletionen oder Mutationen in ihrer PB1- oder der C-terminalen katalytischen Domäne resultierten in der irregulären Lokalisierung von TJ-Komponenten wie Occludin, Claudin und Zonula occludens-1 und der Zerstörung der TJ-Funktion sowie der Zelloberflächenpolarität. Zusätzlich wurden die normalerweise apikal an den TJ kolokalisierten Proteine Par-6 und Par-3 sowie die aPKCs selbst im Zytoplasma der Zellen detektiert (Izumi et al., 1998; Joberty et al., 2000; Lin et al., 2000; Suzuki et al., 2001; Yamanaka et al., 2001). Beispiele für ein redundantes Zusammenwirken außerhalb der epithelialen Zellpolarisierung wurde für die aPKCs in der Regulation der Zellproliferation sowie der Polymerisierung des Aktin-Zytoskeletts gezeigt (Überall et al., 1999; Diaz-Meco and Moscat, 2001).

1.5 Zielsetzung

Die atypische Protein Kinase C stellt die dritte Unterfamilie der Serin/Threonin-abhängigen Protein Kinase C dar, die als Mediatoren der intrazellulären Signaltransduktion wirken. Trotz ihrer Beteiligung an wichtigen zellulären Prozessen wie Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose existieren nur geringe Kenntnisse hinsichtlich der spezifischen Funktionen der bei den Säugern bekannten atypischen Isoformen PKC ι/λ und ζ . Dass diese existieren, zeigen die unterschiedlichen Phänotypen aPKC-defizienter Mäuse. Allerdings gibt es auch Hinweise auf eine funktionelle Redundanz beider Isoformen, besonders im Hinblick auf die Regulation der epithelialen Zellpolarität.

In dieser Arbeit sollten die Aspekte der Spezifität und der Redundanz von aPKCs in der Maus näher untersucht werden. Dazu wurden drei Ansätze gewählt:

1. Die Untersuchung des spatio-temporalen Expressionsprofils beider aPKCs sollte einen Einblick in mögliche spezifische Funktionen während der Embryonalentwicklung liefern.
2. Die morphologische Charakterisierung PKC ι/λ -defizienter Mausembryonen diene dazu, die embryologischen Prozesse zu identifizieren, deren Beeinträchtigung zum frühen embryonalen Tod der PKC $\iota/\lambda^{-/-}$ -Tiere führt.
3. Durch die Generierung und phänotypische Analyse einer PKC ι/λ *knockout*/ PKC ζ *knockin*-Mauslinie sollte untersucht werden, ob und inwiefern PKC ζ während der Embryogenese redundante Funktionen zu PKC ι/λ übernehmen kann. Im Verlauf dieser Arbeit sollten darüber hinaus mit der Generierung von aPKC-spezifischen Antikörpern sowie von PKC ι/λ *knockout*/ PKC ζ *knockin*-ES-Zell-Linien wichtige molekulare Werkzeuge zur weiteren Analyse der aPKC-Funktion in der Maus generiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Behandlung und Haltung der Versuchstiere

Sämtliche Arbeiten mit Tieren wurden entsprechend den Vorschriften des Bundes-Tierschutzgesetzes durchgeführt (BGB1 S.1105, ber. S. 181, Abschnitt 2 (§2+3), 5 (§7-9) und 8 (§119)). Zur Analyse von Expressionsmustern wurde der Mausstamm NMRI verwendet.

2.1.1 Gewinnung von Embryonen

Der genaue Zeitpunkt der Schwangerschaft wurde durch das Feststellen des Vaginalpfropfes nach der Verpaarung mit einem Männchen festgelegt, wobei 12.00 Uhr nach der Feststellung des Vaginalpfropfes als embryonaler Tag E0.5 gezählt wurde. Die Präparation der Embryonen erfolgte am gewünschten Tag *p.c.* nach Töten der Mutter durch Genickbruch.

2.2 Histologische Methoden

2.2.1 Präparation von Embryo-Gewebe

Die Embryonen der embryonalen Tage E7.5, E8.5, E9.5 und E10.5 wurden fixiert (2 h in 4 % PFA in PBS, pH 7.4, bei 4°C), dehydriert und in Paraffin eingebettet. Sagittal-Schnitte von 5 µm (E7.5-E9.5) oder 7 µm (E10.5) Dicke wurden an einem *Leica RM2165 Mikrotom* (Leica Microsystems) ausgeführt. Das Entwachsen der Gewebeschnitte und die Prähybridisierung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Albrecht, 1998).

Für die Untersuchungen an den Embryonalstadien E12.5, E14.5 und E16.5 wurden gefrorene Embryonalschnitte nach dem Protokoll gemäß Yaylaoglu et al. (Yaylaoglu et al., 2005) präpariert. Embryonen wurden in eine Plastikform überführt, die mit eiskaltem O.C.T 4583 (Tissue Tek) gefüllt war und sofort in einer speziell angefertigten Kammer mit stabilem Kupferboden, die auf einen Aluminiumblock, der von einer Trockeneis/Methylpentan Mixtur (-65°C) umgeben war, lag, eingefroren. Nach dem Einfrieren wurde die Kammer auseinander gebaut und die O.C.T. Blöcke in einer Plastiktüte verpackt und bei -80°C bis zu ihrer Verwendung eingefroren. Einen Tag vor dem Schneiden wurden die O.C.T. Blöcke in -20°C überführt und im Spannkörper des Kryostaten befestigt. Sagittalschnitte mit einer Dicke von

25 µm wurden mit Hilfe eines *Leica CM3050S* Kryostaten (Leica Microsystems) erstellt. Anschließend wurde das Gewebe fixiert (20 min in 4% PFA in PBS, pH 7.4), 2x in PBS gewaschen, acetyliert und dehydriert in einem *Leica Autostainer XL* (Leica) und bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.2.2 *In situ* Hybridisierung (ISH)

Der Prozess der *in situ* Hybridisierung wurde wie zuvor beschrieben ausgeführt (Albrecht, 1998). Die Generierung der cDNA-Templates für die Synthese der ³⁵S-markierten Riboproben sowie deren Isoform-Spezifität wurde von Oster et al. (Oster et al., 2004) beschrieben. Die *in vitro* Transkription und die Markierung mit ³⁵S-UTP (Amersham Biosciences) wurden unter Zuhilfenahme des *In Vitro Transcription Kit* (Stratagene) vorgenommen. Die Gewebeschnitte wurden ÜN bei 55°C hybridisiert. Nach Waschen und RNase Verdau wurden die Proben dehydriert und auf Röntgenfilm exponiert (Hyperfilm MP; Amersham). Emulsions-Autoradiogramme wurden durch Eintauchen der Objektträger in photographische Emulsion (NBT2; Eastman Kodak) hergestellt. Nach dem Exponieren wurden die Schnitte in D19 Entwickler (Eastman Kodak) entwickelt, die Zellkerne mit *Hoechst 33258 dye* (Sigma-Aldrich) gefärbt und mit *Kaiser's Glyceringelatine* (Merck) eingedeckelt.

2.2.3 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Photos der silberkörnig gefärbten Flüssigfilme (dargestellt im Dunkelfeld) und der Hoechst Fluoreszenz wurden an einem *Leica DM-XRA2* Mikroskop, das mit einer *Olympus DP-50* CCD Kamera ausgestattet war (Olympus Europe), fotografiert. Die Bilder der Dunkelfeld-Mikrographen wurden zur besseren Visualisierung künstlich koloriert und mit den nukleären Fluoreszenzbildern des selben Bildausschnitts überlagert. Für die Bildbearbeitung wurde *Adobe Photoshop* (Adobe) eingesetzt.

2.2.4 HE-Färbung

Gewebeschnitte wurden 2x 5 min in Xylol deparaffiniert und durch 2x 2 min 100% Ethanol, 1x 2 min 70% Ethanol und 10 min H₂O rehydriert. Die Färbung mit Eosin-Hämatoxinlösung (Fluka) erfolgte für 5 min, der eine 10 minütige Bläuungsreaktion in Leitungswasser angeschlossen wurde. Nach kurzem Eintauchen in 60% salzsaurem Ethanol (Differenzierung)

wurden die Schnitte für jeweils 1 min in Leitungswasser und H₂O inkubiert und durch jeweils 2x 2 min in 100 % Ethanol und Xylol dehydriert und anschließend eingedeckelt.

2.2.5 Transelektronenmikroskopische Technik (TEM-Technik)

Die TEM-Technik wurde von Frau Dr. Gudrun Brandes (MHH, Abteilung Zellbiologie, Zentrum Anatomie) durchgeführt.

Die Mausembryonen des Embryonalaltages 7,5 Tagen wurden in 2,5% Glutaraldehyd (Polysciences, Inc., Warrington, USA) in 0,1M Natrim-Cacodylat (Merck VWR, Darmstadt, Deutschland), pH7,3 für 1h bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4C fixiert, im Puffer gespült und in 2% Osmiumtetroxid (Polysciences) im selben Puffer für 1h bei Raumtemperatur nachfixiert. Nach Entwässerung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Mallinckrodt-Baker, Griesheim, Deutschland) und Überführung über Toluol (Merck) wurden die Embryonen im Epoxidharz (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingebettet. 1µm dicke Schnitte wurden mit 1% Toluidinblau (Merck) und 1% Di-Natrium-Tetraborat (Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland) in H₂O gefärbt. Von selektierten Bereichen wurden Ultradünnschnitte hergestellt und auf *Formvar* (Plano, Wetzlar, FRG)-befilmten Netzen (Science Services, München, FRG) gefischt und mit 5% Uranylacetat (Merck) in H₂O und Bleizitrat modifiziert nach der Methode von Reynolds kontrastiert. Betrachtet wurden sie am *Philips EM 301* (Eindhoven, NL). Die zur Photodokumentation hergestellten Negative wurden mit *Agfa Duoscan* (Mortsel, FRG) eingescannt und mit *Adobe Photoshop* zusammengestellt. Für die Lanthanexperimente wurde beiden Fixierungsmitteln 1% Lanthannitrat (Sigma, St. Louis, USA) zugesetzt und dabei die Puffermolarität entsprechend reduziert, so dass störende osmotischen Effekte soweit wie möglich reduziert werden konnten.

2.2.6 TUNEL-Assay

Für die Überprüfung auf Apoptose bei embryonalen Gewebeschnitten wurde das *ApopTag Apoptosis Detection Kit* (QBioGene) in modifizierter Form verwendet. Die Gewebeschnitte wurden für jeweils 10 min zweimal in Xylol, 1x in je 100/90/80/70% Ethanol deparaffiniert und dehydriert und für 2x 5 min in PBS (pH 7.4) inkubiert. Das Gewebe wurde mit vorgewärmter Trypsinlösung (Trypsintabletten; Sigma) bei 37° für max. 5 min aufgeschlossen. Als Positivkontrolle wurden Schnitte mit 1x DNase-Puffer für 2 min äquilibriert und 10 min mit einem äquivalenten *DNase I* (5000 U/ml; Sigma): 1x DNase-

Puffer-Gemisch bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Positivkontrolle 3x 5 min in H₂O und 1x 5 min in PBS gewaschen. Alle Gewebeproben wurden mit *Äquilibrierungs-Puffer* ca. 5 min equilibriert und mit Enzymlösung, bestehend aus 77 µl *Reaktions-Puffer* + 33 µl *TdT Enzym*, für 1 h in einer feuchten Kammer liegend inkubiert. Die Reaktion wurde mit *Stoplösung* (1:35 in PBS) durch 10-minütige Inkubation bei 37°C beendet und die Schnitte 3x 1 min in PBS gewaschen. 49 µl des fluoreszenzmarkierten *Digoxigenin-Antikörpers* wurden mit 56 µl *Blocking-Puffer* vermischt und in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT und vor Licht geschützt inkubiert. Nach Entfernen des nichtgebundenen Antikörpers durch 4x 2-minütiges Waschen in PBS wurden die Schnitte mit 1-2 Tropfen *Vectashield* + *DAPI* (Vector Laboratories) eingedeckelt. Die Fluoreszenzfärbungen wurden sofort an einem *Leica DM-XRA2 Mikroskop*, das mit einer *Olympus DP-50 CCD* Kamera ausgestattet war, photographisch dokumentiert.

Verwendete Lösung

- 10x DNase Buffer: (400 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM MgSO₄; 10 mM CaCl₂)

2.2.7 Ki67-Assay

Die Deparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte erfolgte über Inkubation in Xylol für 2x 10 min und je 5 min 2x in 100% und je 1x in 90/80/70 % Ethanol, gefolgt von 2x 5 min in PBS (pH 7.4). Für die Maskierung endogener Maus-Immunglobuline wurde das *M.O.M. Kit* (Vector Laboratories) nach Angabe des Herstellers verwendet. Der Primärantikörper (Ki-67, mouse IgG₁, κ; BD Biosciences) wurde dabei in *M.O.M. diluent* 1:20 verdünnt auf die Schnitte gegeben und ÜN bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte für 3x 2 min in PBS gewaschen und anschließend der Sekundärantikörper (anti-mouse 594 red IF; Invitrogen) in *working solution of M.O.M. diluent* 1:1000 verdünnt für 1 h bei RT (abgedunkel) inkubiert. Nach dem Waschen für 3x 2 min in PBS und 1x in H₂O wurden die Zellkerne mit *Hoechst 33258 dye* angefärbt und die Schnitte abschließend eingedeckelt. Die Fluoreszenzfärbungen wurden sofort an einem *Leica DM-XRA2 Mikroskop*, das mit einer *Olympus DP-50 CCD* Kamera ausgestattet war, photographisch dokumentiert.

2.3 Generierung von cDNA und aPKC Plasmiden

2.3.1 Generierung von cDNA

Gesamt-RNA wurde aus verschiedenen Gewebetypen isoliert (Trizol, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) und mit Hilfe des *ThermoScript RT-PCR System* (Invitrogen) revers transkribiert.

2.3.2 Generierung isoformspezifischer aPKC Plasmide

Für die Generierung von Plasmiden, die *full length* cDNA von PKC ι/λ (Bezeichnung: **piota2**), PKC ζ (Bezeichnung: **pzeta6**) oder die 3-Strich untranslatierte Region von PKC ι/λ (3'UTR ι ; Bezeichnung: **3'UTR ι (4)**) als Insert enthielten, wurden die gewünschten Regionen mit Hilfe genspezifischer Primer und Oligo-geprimter cDNA aus Nierengewebe als Vorlage nach einem Standard-PCR Protokoll amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in den pCR[®]2.1TOPO (Invitrogen) Vektor kloniert und die Insertionen durch *EcoRI*-Restriktionanalyse und anschließende Sequenzierung verifiziert.

2.4 Herstellung isoformspezifischer polyklonaler Antikörper für aPKCs

2.4.1 Klonierung der Peptide in pGEX-6P-Expressionsvektoren

Polyklonale Antikörper wurden gegen die Peptidsequenzen 184 bis 234 (PKC ι/λ) bzw. 185 bis 244 (PKC ζ) hergestellt. Die entsprechenden Transkriptregionen wurden über eine Standard-RT-PCR amplifiziert, wobei Plasmide mit cDNA von PKC ι/λ (piota2) oder ζ (pzeta6) als Vorlage dienten. Die für die Klonierung in den Expressionsvektor erforderlichen Restriktionsschnittstellen (*BamHI/SalI* für PKC ι bzw. *SmaI/XhoI* für PKC ζ) wurden über die PCR-Primer eingeführt, die Fragmente nach der PCR-Reaktion mit den genannten Restriktionsenzymen verdaut und in den Expressionsvektor pGex-6P (Amersham Biosciences) kloniert. Nach der Kontrolle der Inserts über Restriktionsanalyse und Sequenzierung wurden die GST-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert.

2.4.2 Expression von aPKC-GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Die Expression der GST-Fusionsproteine basiert auf der Arbeitsvorschrift der Firma Amersham Biosciences, jedoch wurden einige Veränderungen vorgenommen. Transformierte

E. coli (BL21 oder Rosetta; Stratagene) wurden in LB-Medium ÜN bei 37°C inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde dann 1:10 mit neuem LB-Medium (mit 20 mM Glucose) verdünnt und erneut bis zu einer Wachstumsdichte zwischen OD₆₀₀ 0,8 und OD₆₀₀ 1,0 bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM), gefolgt von einer zeitlich variablen Inkubation (2,5 Std. bis über Nacht) zur Proteinexpression. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, der Niederschlag in kaltem PBS resuspendiert und erneut bei 4500 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer PBS-Lysozym-Lösung (100 µg/ml, Roche) aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1% Triton-100 (Merck) und 10 min Inkubation wurde *1x Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma) zugegeben und das Lysat für 3,5-4 min im Wasserbad sonifiziert. Im Anschluss wurde bei 12000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand zusammen mit *Glutathion-Sepharose 4B* (Amersham) für 2 Stunden bei 4°C rotiert. Anschließend wurde die Sepharose bei 1000 rpm sedimentiert, der Überstand verworfen und mit 1x PBS gewaschen. Dieser Schritt wurde 4-6 mal wiederholt. Aufgereinigte Fusionsproteine wurden gemäß der Amersham-Vorschrift eluiert und bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.4.3 Immunisierung von Kaninchen

Polyklonale Antikörper wurden über die Immunisierung von Kaninchen mit den PKC ν/λ - und PKC ζ -spezifischen Antigenen bei Pineda Antikörper Service (Berlin) hergestellt.

2.5 Western Blot Analyse

2.5.1 Proteinextraktion aus Gewebe

Für die Western Blot Analyse wurden Proteinextrakte verschiedener Gewebetypen verwendet. Nach dem Homogenisieren des Gewebes in Extraktionspuffer wurde das Lysat bei maximaler Geschwindigkeit für 30 min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Ein Aliquot wurde in ½ Volumen 4x Sample Buffer aufgenommen, gevortext, die Proteine bei 99°C für 5 min denaturiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Analyse der Proteinexpression in E8.5 und E9.5 NMRI-Embryonen wurden Gruppen von jeweils 11-12 Embryonen verwendet. Proteinextrakte von embryonalen Stammzellen (Wildtyp und PKC $\nu/\lambda^{-/-}$) und Nieren von adulten Wildtyp- und PKC ζ -defizienten Mäusen wurden für die Darstellung der Spezifität der generierten Antikörper gegen PKC ν/λ or PKC ζ

hergestellt. Die Konzentration der Protein-Extrakte wurden über eine Coomassie-Färbung abgeschätzt und für die Western Analyse unverdünnt, 1:5 oder 1:10 verdünnt eingesetzt.

Verwendete Lösungen

- Protein-Extraktionspuffer: (50 mM Tris/HCl (pH 7,5-8); 2 mM EDTA (pH 7,0-8); 10 mM EGTA (pH 7,0-8); 1x Protease Inhibitor Cocktail; 0,1 % Triton; β -ME 0,3 %)
- 4x Sample Buffer: (0,25M Tris/HCl (pH 6,8); 8% SDS; 20% Glycerol; 154 mg (0,1 M) DTT; 1 mg Bromphenolblau; ad 10 ml H₂O; 20% Methanol; H₂O ad 100 ml)

2.5.2 Western Blot mit polyklonalen aPKC Antikörpern

Alle Proben wurden über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet (Hybond ECL; Amersham Biosciences) und der Erfolg des Proteintransfers über eine Ponceau's Färbung überprüft. Nach dem Entfärben mit Waschpuffer wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation in 5% Milchpulver in Waschpuffer für 2 h bei RT blockiert und die Membran der primären Antikörperreaktion ÜN bei 4°C unterzogen (Verdünnungsfaktor 1:6000 für anti-PKC ι/λ ; 1:2000 für anti-PKC ζ). Am nächsten Tag wurden ungebundene Antikörper durch Waschen der Nitrozellulosemembran für 3x 15 min in Waschpuffer (PBS, pH 7.4/ 0.1% Tween 20) bei RT entfernt. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper in 2,5% Milchpulver in Waschpuffer für 2 h bei RT inkubiert (*anti-rabbit HRP*, 1:5000; Dianova), gefolgt von 3 weiteren Waschschrritten. Die Antikörper wurden durch eine Chemilumineszenzreaktion über *ECL Western Blotting Detection Reagents* (Amersham Biosciences) detektiert. Endogenes β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet (*anti- β -Actin HRP*, 1:1000, St. Cruz).

Verwendete Lösungen

- 10x Transferpuffer Stocklösung: (60g Tris-Base, 225 g Glycin, H₂O ad 2000 ml)
- Transferpuffer: (10% 10x Transferpuffer-Stocklösung; 20 % Methanol)
- Waschpuffer: (1x PBS/ 0,1% Tween 20)

2.6 Quantitative RT-PCR (qPCR)

PKC ι und ζ cDNAs verschiedener Embryonalstadien wurden über genspezifische Primer unter Verwendung des IQ-SYBR Green Supermix (BIO RAD) im *iCycler real time PCR System* (BIO RAD) quantifiziert. Da die Primer für PKC ζ sowohl PKC ζ und gehirnspezifische PKC M ζ Transkripte erkennen, wurden Primer gegen eine spezifische 5' Region von PKC M ζ gewählt. Die relativen Expressions-Werte wurden über die *deltadelta CT* Methode (Pfaffl, 2001) errechnet und an die PKC ζ Expression des embryonalen Tages E7.5 normalisiert. *Efla* wurde als Kontollgen herangezogen, und die PKC ζ Expression wurde durch Subtraktion von PKC M ζ angeglichen.

PCR-Reaktionsansatz:

5 μ l cDNA (1:10 Verdünnung der cDNA-Stammlösung, s.o.)
 5 μ l Primer-Mix (1,4 μ M von *forward*- und *reverse*-Primer)
 10 μ l Sybr-Mix
 Σ 20 μ l

Um Abweichungen durch Pipettierfehler zu verringern, wurden die Reaktionsansätze durch Verwendung eines Mastermixes, der die Primer und den SYBR Green-Mix enthielt, vereinigt. Anschließend wurde die cDNA pro Reaktion einzeln pipettiert.

PCR-Zyklusparameter:

Denaturierung:	95°C	3 min
Amplifikation (50 Zyklen):	95°C	30 sek
Primerbindung:	62°C	25 sec
	72°C	25 sek
Denaturierung:	95°C	1 min
Temperatur-Rampe (90 mal):	50-95°C 10 sek, nach jedem Zyklus + 0.5°C	
Final:	4°C	

Die DNA-Konzentration wurde während der Amplifikation und des Temperatur-Gradienten detektiert. Die Schmelzkurve der PCR-Produkte (Resultat des Temperatur-Gradienten) diente dazu, Reaktionen mit mehr als einem PCR-Produkt auszuschließen. Um Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Embryonen zu vermindern, wurden immer mehrere Embryonen vereinigt. Um Pipettier- und PCR-Durchführungsfehler zu reduzieren, wurden alle Reaktionen mindestens in Triplikaten angesetzt. Für die spätere Quantifizierung wurde der Mittelwert unter Berücksichtigung der Standardabweichung verwendet.

2.7 Gene targeting/Knock out Technologie

2.7.1 Klonierung der *Targeting* Vektoren TV/tag und TV/GFP

Die *Targeting* Vektoren TV/tag und TV/GFP enthielten genomische PKC $\nu\lambda$ -DNA, bestehend aus dem Exon 2 und Sequenzbereichen der flankierenden Introns. Zu Beginn des 2. Exons wurde ein genomischer PKC $\nu\lambda$ -Bereich deletiert und durch die PKC ζ -cDNA *in frame* ersetzt (*Rescue*-Allel). Beim *Targeting* Vektor TV/tag wurde im Anschluss an die PKC ζ -cDNA die 3'-untranslatierte Region von PKC $\nu\lambda$ (3'UTR_i) kloniert, während beim *Targeting* Vektor TV/GFP ein IRES-EGFP Motif eingefügt wurde. Im Anschluss daran enthielten beide *Targeting* Vektoren eine von loxP Sequenzen flankierte Neomycinresistenz-Kassette.

2.7.2 Modifizierungen an den beteiligten Ausgangsplasmiden

Für die Positionsangaben innerhalb der unten dargestellten Sequenzen wurden die cDNA-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank zugrunde gelegt.

2.7.2.1 piota 1.2 Spe

Das Plasmid **piota 1.2 Spe** enthält ein 1188 bp großes *SpeI*-Fragment mit genomischer PKC $\nu\lambda$ -DNA, kloniert in pBluescript II KS+, welches das Exon 2 und Teile der benachbarten Introns 1 und 2 umfasst. Für seine Verwendung als Ausgangsplasmid für die Klonierung der *Targeting* Vektoren wurden die *SalI*-Schnittstelle im Polylinker durch eine gezielte PCR-basierte Mutagenisierung am Plasmid zerstört (*QuikChange*[®] *Site-Directed Mutagenesis Kit*; Stratagene). Die *SmaI*-Schnittstelle im Polylinker wurde über einen *BamHI/EcoRI*-Verdau deletiert, die überhängenden DNA-Enden mit Hilfe der *Klenow-Polymerase* (Biolabs) aufgefüllt und nachfolgend ligiert. Für die Gewährleistung der späteren Fusion im Exon 2 von PKC $\nu\lambda$ mit der cDNA von PKC ζ , die *in frame* kloniert wurde, wurde eine *SalI*-Schnittstelle an Position 199-204 der PKC $\nu\lambda$ -cDNA durch gezielte Mutagenisierung eingeführt. Über einen Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *BglII* wurde der genomische Bereich *downstream* der eingeführten *SalI*-Schnittstelle im Exon 2 bis hinter die Splice-Akzeptor-Position des Intron 2 deletiert und durch ein synthetisches Fragment, das die Restriktionsschnittstellen *SalI*, *SmaI* und *BglII* enthielt, ersetzt. Dieses, im folgenden als

„Adapter“ bezeichnetes Fragment, diente als Grundlage für die späteren Klonierungsprozesse. Dieses modifizierte Plasmid erhielt die Bezeichnung **iMutSal + Adapter Sma-(3)**.

2.7.2.2 pzeta6

Die 1820 bp umfassende *full length* cDNA von PKC ζ in diesem Plasmid wurde durch gezielte Mutagenisierungen am Plasmid (*QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit*) wie folgt verändert: An Position 95-100 der cDNA wurde zwecks Fusion mit der PKC ν/λ -DNA im Exon 2 eine *SalI*-Schnittstelle eingeführt und die native *BgIII*-Schnittstelle an Position 1099-1104 zerstört, die keinen Aminosäureaustausch zur Folge hatte (*silent mutation*). Die eingeführte *SmaI*-Schnittstelle direkt hinter dem Stopcodon diente der Fusion mit der 3'-untranslatierten Region von PKC ν/λ (3'UTRi) für den *Targeting*-Vektor **TV/tag** bzw. mit dem IRES-eGFP-Fragment für den *Targeting*-Vektor **TV/GFP**. Drei als Klonierungsartefakte entstandene Punktmutationen im Plasmid pzeta6, die einen Aminosäureaustausch in der cDNA-Sequenz bewirkt hätten, wurden rückmutiert. Dieses als **zMutThr(2)** bezeichnete Plasmid wurde im folgenden für die Klonierung des *Targeting*-Vektors TV/GFP eingesetzt. Für die Generierung des *Targeting*-Vektors TV/tag wurde in die PKC ζ -cDNA-Sequenz im letztgenannten Plasmid ein 6-fach Histidin-tag direkt vor dem Stopcodon sowie eine *SacI*-Schnittstelle im Anschluss an die neu generierte *SmaI*-Schnittstelle eingeführt. Dieses Plasmid erhielt die Bezeichnung **zMutHistagSac(1)**.

2.7.2.3 3'UTRi(4)

Dieses Plasmid enthält die vollständige 2533 bp umfassende 3'-untranslatierte DNA-Sequenz von PKC ν/λ (3'UTRi) als Insert. Durch gezielte Mutagenisierungen wurden eine *SmaI*-Restriktionstelle direkt im Anschluss des Terminationscodons der PKC ν/λ -DNA-Sequenz sowie eine *BgIII*-Restriktionsschnittstelle am Ende dieser Sequenz eingeführt. Das Plasmid wird im folgenden als **3'UTRiMutBgl(1)** bezeichnet und für die Klonierung des *Targeting*-Vektor TV/tag verwendet.

Die DNA-Konzentration wurde für ihre weitere Verwendung über eine MidiPrep erhöht (*Nucleobond AX*; Macherey-Nagel), gefolgt von einer Aufreinigung durch Phenol/Chloroform/Ethanol nach Standardprotokoll. Sämtliche Modifikationen an den Plasmiden wurden über Restriktionsanalysen kontrolliert und die Korrektheit der Sequenzen verifiziert.

2.7.2.4 Isolierung des IRES-EGFP Fragments und der Neomycinresistenz-Kassette

Das IRES_eGFP-Fragment wurde aus dem Vektor *pIRES2eGFP* (BD Biosciences; Clontech) über einen *SmaI/AflIII* Doppelverau herausgeschnitten und nach der gelelektrophoretischen Auftrennung aus dem Agarosegel extrahiert (*QIAquick[®] Gel Extraction Kit*; Qiagen). Die überhängenden Enden wurden durch ein Klenow Fragment aufgefüllt. Das isolierte Fragment mit der Größe von 1556 bp erhielt die Bezeichnung **IRES-EGFP**, das für die Klonierung des *Targeting*-Vektors TV/tag eingesetzt wurde.

Über einen *BamHI* Verdau wurde die 1200 bp große von loxP-Sequenzen flankierte Neomycinresistenz-Kassette aus dem Vektor *pMCIneo Poly A* (Stratagene) herausgeschnitten und anschließend aus dem Agarosegel extrahiert. Sie wurde **flox(7)** benannt und für die Generierung beider *Targeting*-Vektoren verwendet.

2.7.3 Klonierungsstrategie im Ausgangsplasmid iMutSal + Adapter Sma-(3)

Das Plasmid iMutSal + Adapter Sma-(3) (siehe unter Kapitel 2.7.2.1) diene als Basisplasmid für die Modifikationen im Exon 2 des PKC $\nu\lambda$ -Locus'. Die im eingefügten Adapter vorhandenen Restriktionsschnittstellen *SalI/SmaI/BglIII* sowie die unter Kapitel 2.7.2.1 eingeführten Restriktionsschnittstellen in den Sequenzen der Plasmide ermöglichten eine gerichtete Klonierung zur Generierung der *Targeting*-Vektoren TV/tag und TV/GFP.

Für die Generierung des *Targeting*-Vektors TV/tag wurden in zwei hintereinanderfolgenden Klonierungsschritten die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittene PKC ζ cDNA (*SalI/ SmaI* geschnitten aus Plasmid zMutHistagSac(1), (siehe unter Kapitel 2.7.2.2) gefolgt vom 3'UTR von PKC $\nu\lambda$ (*SmaI/ BglIII* geschnitten aus Plasmid 3'UTRiMutBgl(1), (siehe unter Kapitel 2.7.2.3) nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel extrahiert und in das Plasmid iMutSal + Adapter Sma-(3) kloniert. Anschließend wurde dieses Plasmid mit *BglIII* verdaut und die gefloxt Neomycin-Kassette (*BamHI* geschnittenes Fragment flox(7), (siehe unter Kapitel 2.7.2.4) hinter die 3-Strich untranslatierte Region von PKC $\nu\lambda$ kloniert. Da die Ligation von *BglIII/BamHI* nicht mehr enzymatisch zu schneiden ist, wurde die Insertion der Neomycin-Kassette über einen Verdau der die Kassette flankierenden *EcoRI*-Schnittstellen überprüft. Das Plasmid wird im folgenden als **iSpe+zMutHistag 3'UTRi flox(7)** bezeichnet.

Für die Generierung des *Targeting*-Vektors TV/GFP waren gleichermaßen drei aufeinanderfolgende Klonierungsschritte notwendig. In diesem Fall wurde in das Plasmid iMutSal + Adapter Sma-(3) die ζ -cDNA (*SalI/ SmaI* geschnitten aus Plasmid zMutThr(2),

(siehe unter Kapitel 2.7.2.2), das IRES-EGFP Fragment (siehe unter Kapitel 2.7.2.4) in die *SmaI*-Schnittstelle und nach einem *BglII*-Verdau die gefloخته Neomycin-Kassette (*BamHI* geschnittenes Fragment flox(7), (siehe unter Kapitel 2.7.2.4) einkloniert. Dieses Plasmid erhielt die Bezeichnung **iSpe+zMutThr+IRES eGFP flox(21)**.

Durch Restriktionsanalyse wurden sowohl sämtliche Insertionen als auch die korrekte Orientierung des klonierten IRES-EGFP Fragmentes überprüft.

2.7.4 Finale Klonierung zur Generierung der *Targeting*-Vektoren TV/tag und TV/GFP

Das Plasmid piotaEco11/-1.2 *SpeΔKpn* enthält ein *EcoRI/KpnI* kloniertes 9342 bp großes Fragment genomischer PKC $\nu\lambda$ -DNA aus dem Bereich von Intron 2 bis Intron 3 (entspricht den Positionen 26337-36867 der Celera Datenbank), dem das Exon 2 umfassende 1188 bp große *SpeI*-Fragment herausgeschnitten wurde. Dieses Plasmid wurde mit dem Enzym *SpeI* geschnitten und jeweils die das *Targeting*-Konstrukte enthaltenden *SpeI*-Fragmente aus den Plasmiden iSpe+zMutHistag 3'UTRi flox(7) und iSpe+zMutThr+IRES eGFP flox(21) hineinkloniert. Durch diesen Klonierungsschritt wurden die *Targeting*-Vektoren **TV/tag** und **TV/GFP** fertiggestellt. Sie tragen 5330 bzw. 4012kb große, das jeweilige *Targeting*-Konstrukt flankierende Homologie-Sequenzen, die für eine erfolgreiche homologe Rekombination unerlässlich sind.

Nach der Restriktionsanalyse, die auch die Kontrolle der richtigen Orientierung der inserierten *SpeI*-Fragmente beinhaltete, wurde die Korrektheit aller DNA-Bereiche mit Ausnahme der Neomycin-Kassette durch Sequenzierung verifiziert.

Die fertigen *Targeting*-Vektoren ließen sich über eine *SacII*-Restriktionsschnittstelle linearisieren und wurden für ihre weitere Verwendung mit Phenol/Chloroform/Ethanol aufgereinigt.

2.7.5 Kultivierung von Embryonalen Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus wurden zum *gene targeting in vitro* verwendet. Ihre Kultivierung erfolgte in H₂O gesättigter Atmosphäre bei 37°C und 10% CO₂O in modifizierten D-MEM Medium (Gibco; Stratagene).

Verwendete Lösung

- modifiziertes D-MEM Medium: (D-MEM (Gibco), 15% FCS, 6x10⁻⁵ β-Mercaptoethanol, 1% von 100x MEM- nicht essentielle Aminosäuren, 1% Penicillin/Streptomycin)

Für die Zellkultur der Donor-ES-Zellen wurden RI-Zellen verwendet. Diese wurden aus den gekreuzten Inzuchtstämmen 129/Sv x 129/Sv-CP hervorgegangenen Blastozysten abgeleitet und von Nagy et al. (Nagy et al., 1993) subkloniert. In der F1 Generation ist die Fellfarbe uniform agouti, während die beiden Fellfarben in der F2 Generation in Abhängigkeit des genetischen Hintergrunds des Partners der Keimbahnchimären segregieren. 129/svJ ist eine agoutifarbene Maus mit hellem Bauchfell und pigmentierten Augen. 129/Sv-CP Mäuse haben ein silbergraues Fell und pigmentierte Augen.

Die Propagierung der ES-Zellen erfolgte auf einem Zellrasen aus Mitose-inaktivierten embryonalen Mausfibroblasten (EMFI) in Kulturmedium unter Zusatz von LIF (*leukemia inhibitory factor*; GibcoBRL). Um eine Differenzierung zu verhindern, wurden ES-Kulturen wurden die Zellen, je nach Dichte, jedoch nach spätestens zwei Tagen passagiert. Zum Splitten der ES-Zellen wurden diese 2x mit vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit vorgewärmtem Trypsin behandelt. Die Trypsinreaktion wurde durch 1 Volumen Kulturmedium abgestoppt. Das Aussäen der Zellen erfolgte mit einer Dichte von ca. 3×10^4 Zellen pro 60 mm Kulturschale. Zum Einfrieren der ES-Zellen wurden diese bei 1000 rpm abzentrifugiert, in Einfriermedium resuspendiert und bei -80°C eingefroren und konnten am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff eingelagert werden.

2.7.6 Transfektion der *Targeting*-Vektoren in ES-Zellen, ES-Zell-Selektion und Analyse

ES-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion mit den *Targeting*-Vektoren passagiert. 2-3 Stunden vor der Transfektion wurde das Medium+LIF durch frisches ersetzt. Nach der Trypsinbehandlung wurden 3×10^7 Zellen abzentrifugiert und in 800 μl PBS mit ca. 30 μg linearisiertem *Targeting*-Vektor aufgenommen. Die Transfektion erfolgte im *Gene Pulser II* Elektroporationssystem (BioRad) in 4 mm Küvetten bei 250 Volt und 500 μF . Als Negativkontrolle diente eine Kulturschale mit gleicher ES-Zellzahl ohne Zugabe des *Targeting*-Vektors. Die transfizierten ES-Zellen wurde in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und in Kulturschalen überführt. 24 Stunden später erfolgte der erste Mediumwechsel unter Zuabe von Geneticin (G418; 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$). ES-Zellen mit integriertem *Targeting*-Vektor, der ein Neomycin-Resistenzgen enthielt, sind gegen diesen Selektionsmarker resistent, während auf der Kontrollschale nach 8 Tagen keine lebenden ES-Zellen mehr vorhanden waren. Nach 10 Tagen Inkubation, bei der täglich das Selektionsmedium gewechselt wurde, wurden ES-Zellklone in 96 *Well*-Zellkulturplatten gepickt, in 2-3 Tagen auf einem EMFI-Rasen expandiert trypsiniert und zur Hälfte als sogenannte Masterplatte bis zu ihrer weiteren

Charakterisierung kryokonserviert und die andere Hälfte auf Gelatine-beschichtete 96 *Well*-Zellkulturplatten expandiert. Die DNA der ES-Zellklone der letztgenannten Platte wurde zur weiteren Charakterisierung extrahiert. Die genomische DNA der isolierten Klone wurde mit Hilfe des Southern Blot-Verfahrens untersucht. Zur zuverlässigen Differenzierung zwischen homologer Rekombination und zufälliger Integration wurden für die Southern-Hybridisierung eine 5'- bzw. 3'-Sonde außerhalb des entsprechenden rekombinierenden Bereiches verwendet. Die sorgfältige Charakterisierung der DNA erfolgte mit drei unterschiedlichen Restriktionsverdauen (*EcoRI*, *BglII* und *BamHI*) mit drei verschiedenen Sonden (5'Hind, Neo, 3'Kpn probe).

2.7.7 Blastozysteninjektion

Einzelne ES-Zellen wurden mit Hilfe einer Mikroinjektionsapparatur in den Blastozoenraum von Präimplantations-Blastozysten injiziert und nach ihrer Reexpandierung in den Uterus scheinträchtiger (*Foster*-) Mäuse transferiert. Die Blastozysten-Injektion und der Uterustransfer wurde am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen unter der Leitung von Monika Schindler durchgeführt.

2.7.8 Keimbahnchimären

Eine chimäre Maus entsteht unter Beteiligung von ES-Zellen an der Entwicklung des Spender-Embryos. Besiedeln einzelne ES-Zellen hierbei auch die Keimbahn der entstehenden Maus, so spricht man von einer Keimbahn-Chimäre bzw. *Germline Transmitter*. Chimäre Nachkommen wurden anhand eines Fellfarben-Markers bestimmt, d.h. der Spender-Embryo hatte hinsichtlich der Fellfarbe einen anderen Genotyp als die ES-Zellen.

In den Chimären resultierte der Beitrag der C57BL/6J-Spender-Blastozyste in einem pigmentierten Phänotyp mit schwarzem Fell, während an den rotbraunen Fellpartien die Beteiligung der ES-Zellen (RI) identifiziert werden konnte. Für die Analyse der Keimbahntransmission wurden RI/ C57BL/6J chimäre Tiere mit C57BL/6J-Mäusen verpaart. Wurde der genetische Hintergrund der ES-Zellen vererbt, wurde dies an der rotbraunen Fellfarbe mit hellem Bauchfell ersichtlich, während bei Nachkommen mit rein schwarzem Fell keine Keimbahntransmission zugrunde lag. Die Genotypisierung erfolgte über PCR und wurde für heterozygote Tiere durch Southern-Analyse bestätigt.

2.8 Southern Blot Genotypisierung

2.8.1 Präparation genomischer DNA aus ES-Zellen

Die ES-Zellen wurden in den 96 *Well*-Zellkulturplatten zweimal mit PBS gewaschen und mit 50 µl DNA-Extraktionspuffer ÜN bei 55°C lysiert. Nach der Zugabe von 50 µl H₂O wurden die Lysate in ein Eppendorfgefäß überführt und die DNA mit 200 µl eiskaltem Ethanol und 3 µl 5M NaCl gefällt. Die DNA wurde in jeweils 25 µl TE aufgenommen und ÜN bei 55°C gelöst.

Verwendete Lösungen

- DNA-Extraktionspuffer: (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA, pH 8,0; 10 mM NaCl; 0,5% Sarcosyl; 1 mg/ml Proteinase K)
- TE: (10 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0)

2.8.2 Gelaufentrennung und Blotting

Etwa 10 µg genomischer DNA wurden nach den jeweiligen Bedingungen des verwendeten Enzyms unter Zugabe von BSA ÜN verdaut. Am nächsten Tag wurden 2 µl des verwendeten Enzyms nachpipettiert und für mindestens 2 h inkubiert, um den vollständigen Verdau der DNA sicherzustellen. Die DNA wurde gemäß dem Protokoll der ethanolischen Fällung behandelt und in 50 µl 1x Stop-Lösung ÜN bei 55°C gelöst. Anschließend wurde die DNA in einem 0,8 %igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer ÜN bei 25 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach fotografischer Dokumentation wurde das Gel in einem ausreichenden Volumen Denaturierungslösung für 40 min denaturiert und 2x für 20 min in Neutralisierungslösung geschwenkt. Der DNA-Transfer erfolgte ÜN durch Kapillarkraft auf eine Nylon-Membran (Hybond N; Amersham). Danach wurde das Gel von der Membran entfernt und die DNA bei 3600 Joule im UV-*Crosslinker* kovalent an die Membran gebunden.

Verwendete Lösungen

- 10x Stop-Lösung: (1 ml 1x TE; 5 ml Glycin; 1,2 ml 0,5 M EDTA, pH 7.0; 2,8 ml H₂O; jeweils 1 Spatelspitze Bromphenolblau und Xylencyanol FF)
- 50x TAE-Puffer: (2 M Tris-Acetat, pH 7,5; 50 mM EDTA, pH 8,0)
- Denaturierungslösung: (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH)
- Neutralisierungslösung: (1 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 7.2)

2.8.3 Sondensynthese und Hybridisierung

Spezifische DNA Fragmente wurden nach einer modifizierten Methode von Feinberg & Vogelstein (Feinberg and Vogelstein, 1983) radioaktiv markiert. Etwa 100 ng DNA Fragment wurden in 33 µl H₂O aufgenommen, 5 min bei 99 °C denaturiert und anschließend auf Eis

abgekühlt. Nach Zugabe von 11 µl *Hexamer Mix* (Boehringer), 2 µl 100x BSA, 5 µl α -³²P-dCTP und 2 µl *Klenow*-Polymerase wurde der Ansatz bei 37°C für 2 h inkubiert. Freie Nukleotide wurden durch Aufreinigung über *ProbeQuant G-50 Micro Columns* (Amersham) entfernt. Der Einbau von radioaktivem Nukleotid wurde durch Messung der Aktivität kontrolliert.

Die Nylonmembran mit der zu untersuchenden DNA wurde für mindestens 2 h bei 65°C in der Prähybridisierungslösung inkubiert und anschließend in der Hybridisierungslösung mit der radioaktiv markierten Sonde ÜN bei 65°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x für 30 min bei 55°C gewaschen (bei der Neo-Probe bei 60°C). Die Visualisierung der Signale erfolgte durch Autodadiographie durch Auflegen eines Films (Biomax MR; Kodak).

Verwendete Lösungen

- MP-Mix: (5% Milchpulver; 5% SDS; bei 55°C gelöst)
- Dextranulphat: (50 g Dextranulphat + 100 ml H₂O; ÜN bei RT gelöst)
- Prähybridisierungslösung: (3 ml 20x SSC; 3 ml MP-Mix; 0,5 ml Lachsspermien DNA (10 mg/ml); 8,5 ml H₂O; 10-15 min aufkochen)
- Hybridisierungslösung: (2 ml 20x SSC; 2 ml MP-Mix; 0,5 ml Lachsspermien DNA (10 mg/ml); 2 ml 50% Dextranulphat 3,5 ml H₂O; 10 min kochen)
- Waschpuffer: (0,1% SSC; 0,1% SDS)

2.9 DNA-Extraktion aus Schwanzbiopsien

Die Genotypisierung von Mäusen erfolgte in der Regel durch PCR-Analyse. Dazu wurden 0,5-1 cm lange Schwanzbiopsien entnommen und in 400 µl Extraktions-Puffer über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurden unlösliche Partikel durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 14000 rpm, RT). Die DNA wurde aus dem Überstand (50 µl für PCR; 400 µl für Southern Analyse) durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol gefällt (10 min, 14000 rpm, RT) und ÜN bei 55°C in 400 µl TE-Puffer gelöst (für Southern Analyse in 50-100 µl TE-Puffer). Für die PCR wurden 1 µl DNA eingesetzt (in einem 25 µl Ansatz).

Verwendete Lösung

- Extraktions-Puffer: (200 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS; 100 µg Proteinase K)

2.9.1 Präparation (extra-) embryonaler DNA zur Genotypisierung von Mausembryonen

Die Genotypisierung von E7.5-E18.5-Embryonen erfolgte durch PCR-Analyse. Dafür wurden ca. 0,5 cm des Dotter- oder Emdeweidesackes in 30-40 µl PCR-Lysispuffer über Nacht bei 55°C verdaut. Am nächsten Tag wurde das PCR-Lysispuffer-Gemisch für 10 min bei 99°C aufgeköcht und 0,6 µl in die PCR-Analyse eingesetzt.

Verwendete Lösung

- **PCR-Lysispuffer:** (10 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 0,45% NP-40; 0,45% Tween-20; 60 µg/ml Proteinase K)

2.10 PCR-basiertes Genotypisieren

Die Genotypisierung der PKC ι KO/PKC ζ KI-Mäuse erfolgte mittels Multiplex-PCR. Dabei wurden in einer Reaktion *Rescue*- und Wildtyp-Allele detektiert.

PCR-Reaktionsansatz:

1 µl	DNA (Präparation für PCR, s.o.)
1 µl	Primer MM (bestehend aus allen 4 Primern je 5µM/µl)
12,5 µl	HotStartTaq Mastermix Kit (Qiagen, Deutschland)
10,9 µl	H ₂ O
Σ 25,4 µl	

PCR-Zyklusparameter:

1. 95°C 15 min
2. 95°C 30 sec
3. 57°C 45 sec
4. 72°C 1 min zurück nach 2. (38 Zyklen)
5. 72°C 10 min
6. 4°C Endlosschleife

Wildtypfragment: 651 bp mit Primerpaar *iota-Ex2_Se/iota-Ex2_AS*

Rescue-Fragment: 817 bp mit Primerpaar *5'Fus_fw/3'Fus_rev*

2.11 Gen Bank ID

Name	DNA/cDNA	Protein
PKC ι/λ	NM_008857	NM_008857.2
PKC ζ	NM_008860	NM_008860.2
PKC M ζ	AB110830	

2.12 Oligonukleotide

Klonierung der PKC ι und ζ spezifischer GST-Fusionsproteine/Peptide

Name	Sequenz	Amplikon
iota-3'pp_fw iota-3'pp_rev	5'-TGAGTGTGGGGGATCCTCTTTGCCAC-3' 5'-CAGACCTAGAGTCGACGACGCTTTAC-3'	187 bp
zeta-3'pp_fw zeta-3'pp_rev	5'-GCTGACCTGCCCGGGGCATATGGATTC-3' 5'-CCCAGCCCCTCGAGGATTTTGATCC-3'	207 bp

Real time PCR

Name	Sequenz	Amplikon
iota-For1576 iota-Rev1873	5'-AGGAACGATTGGGTTGTCAC-3' 5'-GGCAAGCAGAATCAGACACA-3'	298 bp
zeta-A-1617 zeta-A-1797	5'-GCCTCCCTTCCAGCCCCAGA-3' 5'-CACGGACTCCTCAGCAGACAGCA-3'	181 bp
brain-zeta184 brain-zeta410	5'-GGCCAGGGGACGTAGCAGCA-3' 5'-GCTGCACTGGCCGCAGTACG-3'	227 bp
EF1alphafor EF1alpharev	5'-AATTCACCAACACCAGCAGCAA-3' 5'-TGCCCCAGGACACAGAGACTTCA-3'	96 bp

Generierung von cDNA

Name	Sequenz	Amplikon
zeta sense1 zeta antisense 2	5'-GCGGAGTGCGCCATGCCCAGCAGG-3' 5'-GGCGTGTCCACAACAGAGATGCTC-3'	1820 bp
mlambda 1 iota antisense1	5'-GTGAGGAGATGCCGACCCAGAGG-3' 5'-CCAACAGGATACCGAGAGCGACTTC-3'	1828 bp
3'UTRi fw1 3'UTRi rev1	5'-GATTGATCAGTCTGAATTTGAAG-3' 5'-AGGTATTAACATTTTATTTAAAGAT-3'	2533 bp

Mutagenisierungsprimer

Name	Sequenz	Primerlänge
Muti5'Ex2 fw MUTi5'Ex2rev	5'-GGATATTATGATGTGACCTTTGAGC CTTCCATCTCCTTTGAGG-3' 5'-CCTCAAAGGAGATGGAAGGCTCAAAG GTCGACATCATAATATCC-3'	44 bp
Mutz5'Ex2 fw MUTz5'Ex2rev	5'-CGGGGACATCCTGATGTGACCGTGG ATGCCATGACAAC-3' 5'-GTTGTCATGGCATCCACGGTTCGACAT CAGGATGTCCCCG-3'	39 bp
zetaMutSmaFw zetaMutSmaRev	5'-CTGAGGAGTCCGTGTGACCCGGGGA GCATCTCTGTTGTGG-3' 5'-CCACAACAGAGATGCTCCCCGGGTC ACACGGACTCCTCAG-3'	40 bp
zetaMutBglFw zetaMutBglRev	5'-CAGGTTCTATGCTGCTGAAATCTGTAT CGCTCTCAAC-3' 5'-GTTGAGAGCGATAACAGATTTTCAGCAGC ATAGAACCTG-3'	37 bp
zetaMutGlyFw zetaMutGlyRev	5'-GAGCCTCCAGTAGATGGCAAGAACG ATGGTG-3' 5'-CACCATCGTTCTTGCCATCTACTGG AGGCTC-3'	31 bp

zetaMutHisFw	5'-GAAGGAGCTTGTCCACGACGACGAG GATATC-3'	31 bp
zetaMutHisRev	5'-GATATCCTCGTCGTCTGGACAAGC TCCTTC-3'	
zetaMutThrFw	5'-GATATCGACTGGGTGCAGACAGAGAA ACATGTGTTTG-3'	37 bp
zetaMutThrRev	5'-CAAACACATGTTTCTCTGTCTGCACC CAGTCGATATC-3'	
MutHistagSacFw	5'-CTGCTGTCTGCTGAGGAGTCCGTGCA TCATCACCATCACCATTGACCCGGGGAG CTCCTCTGTTGTGGAC-3'	70 bp
MutHistagSacRev	5'-GTCCACAACAGAGGAGTCCCCGGGT CAATGGTGATGGTGATGATGCACGGACT CCTCAGCAGACAGCAG-3'	
UTRiMutSmaFw	5'-GAAGAGTGTGTCTGACCCGGGTTGCC GCCATTCAG-3'	35 bp
UTRiMutSmaRev	5'-CTGAATGGCGGCAACCCGGGTCAGAC ACACTCTTC-3'	
UTRiMutBglFw	5'-TAAATGTTTAAGATCTAAGGGCGAATTC CAGCACACTGGCG-3'	42 bp
UTRiMutBglRev	5'-CGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTAGATC TTAAACATTTTA-3'	
Adapter-Oligos		
AdaSalSmaBglFw	5'-TCGACGTCCCCGGGCGAA-3'	18 bp
AdaSalSmaBglRev	5'-GATCTTCGCCCGGGGACG-3'	

Sequenzierung

Name	Sequenz	Primerlänge
zeta sense2	5'-GGAGGAAGCTGTACCGAGCCAACGGC-3'	26 bp
zeta antisense 1	5'-GACGTGTGAGGCCTTGACAGACAGG-3'	25 bp
zeta senseII	5'-CCTGTCTGTCAAGGCCTCACACGTC-3'	25 bp
lambda2(694-716)	5'- GGACCAGACCATGCATCCAGACC-3'	23 bp
iotaAS(1097-1121)	5'- GTCGCTGCATATGAAACATGAGGTC-3'	25 bp
iota antisense2 rev	5'- GAGCAGGCTGACGGGTGGATATCC-3'	24 bp
3'UTRi_rev2	5'-CTGTATCACATGTTAGCTATGAC-3'	23 bp
3'UTRi_fw2	5'-TGCGGTGAAATTCAAGACCA-3'	20 bp
3'UTRi_rev3	5'-GGCTGGACACTGTGCACTTC-3'	20 bp
3'UTRi_fw3	5'-GAAGGCTTAATTGCGCAGTG-3'	20 bp
3'UTRi_fw4	5'-GGCAGCATTATTCACGCCCTAAG-3'	20 bp
zeta-Ex3-fw	5'-GTGACCCTTGACTGTGTCC-3'	20 bp
deltaNewGeno	5'-ACAGGCCAGCCTCACACACCTAC-3'	23 bp
delta-BB1	5'-GCAGGGAGCCCAGCTCATAGG-3'	21 bp
epsilon5_1ex	5'-CTCCCCCTCCGGGAGTCGAAATTG-3'	24 bp

Genotypisierung

Name	Sequenz	Länge
iota-Ex2_Se	5'-TGGAAGGAAAGGAAGTGTGC-3'	650 bp (wt)
iota-Ex2_AS	5'-GGTGAACGGCTGCTCATT-3'	
5'Fus_fw	5'-AGCCCCAGATCACAGATGAC-3'	817 bp (rescue)
3'Fus_rev	5'-CTCGAATCCTGCCTCTGAAC-3'	

Neo-FS5 Neo-FS3	5'-GGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCC-3' 5'-GTCAGCGCAGGGGCGCCCCGG-3'	400 bp
Cre-855L Cre-185U	5'-GCCAGGTATCTCTGACCAGA-3' 5'-CAAGTTGAATAACCGGAAATG-3'	800 bp
iota sense1 iota antisense 1 iota sense1 Neo-FS5	5'-GGCGTTGAGTCACACGGAGCTCAG-3' 5'-CACCCACCTTAAGTCCAGGG-3' 5'-GGCGTTGAGTCACACGGAGCTCAG-3' 5'-GGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCC-3'	500 bp (iota ^{+/+}) 800 bp (iota ^{-/-})

2.13 Plasmide und Vektoren

Die mit einem * gekennzeichneten Plasmide bzw. Fragmente wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit generiert. Die mit einem + gekennzeichneten Plasmide wurden von H. Oster und die mit einem # gekennzeichneten Plasmide von M. Leitges freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Klonierung der PKC ι und ζ spezifischer GST-Fusionsproteine

Name	Plasmid	Fragment/RE und Größe	Verwendung
iota 3'pp 9/9*	pGex-6P-2	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I 161 bp	PKC ι -spezifisches Antigen
zeta 3'pp 6/11*	pGex-6P-1	<i>Sma</i> I/ <i>Xho</i> I 182 bp	PKC ζ -spezifisches Antigen

Radioaktive ISH

Name	Plasmid	Fragment/RE und Größe	Verwendung
iota ISH temp ⁺	pCR [®] II-TOPO	<i>Eco</i> RI 430 bp	<i>Bam</i> HI T7 antisense <i>Eco</i> R V SP6 sense
zeta ISH temp ⁺	pCR [®] II-TOPO	<i>Eco</i> RI 292 bp	<i>Bam</i> HI T7 antisense <i>Eco</i> R V SP6 sense

Klonierung der Targeting-Vektoren

Name	Plasmid	Fragment/RE und Größe	Verwendung
piota 1.2 Spe [#]	pBluescript II KS+	<i>Spe</i> I 1188 bp	modifiziert für Verwendung als Ausgangsplasmid für die Targeting Vektoren TV/tag + TV/GFP
pzeta6*	pCR [®] 2.1-TOPO	<i>Eco</i> RI 1820 bp	modifiziert für Targeting Vektoren TV/tag + TV/GFP; Template für Antikörper-Klonierung
3'UTRi(4)*	pCR [®] 2.1-TOPO	<i>Eco</i> RI 2533 bp	modifiziert für Targeting Vektor TV/tag
IRES-EGFP*	pIRES2eGFP	<i>Sma</i> I/ <i>Afl</i> I 1556 bp	Isolierung des IRES-EGFP Motifs
iSpe+ zMutHistag*	pBluescript II KS+	<i>Spe</i> I 6170 bp	Insert enthält das TV/tag Targeting Konstrukt zur finalen

3'UTRi flox(7)*			Klonierung in piotaEco11/-1.2 SpeΔKpn
flox(7)*	pMC1neoPolyA	<i>Bam</i> HI 1200 bp	Neomycinresistenz-Kassette
iSpe+ zMutThr+IRES eGFP flox(21)*	pBluescript II KS+	<i>Spe</i> I 5248 bp	Insert enthält das TV/GFP Targeting Konstrukt zur finalen Klonierung in piotaEco11/-1.2 SpeΔKpn
piotaEco11/-1.2 SpeΔKpn [#]	pSP73	<i>Eco</i> RI/ <i>Kpn</i> I 9342 bp	Vektor zur Aufnahme der modifizierten Exon 2 ιDNA
TV/tag*	pSP73	<i>Eco</i> RI/ <i>Kpn</i> I 15512 bp	Targeting Vektor; Elektroporation in ES Zellen
TV/GFP*	pSP73	<i>Eco</i> RI/ <i>Kpn</i> I 14590 bp	Targeting Vektor; Elektroporation in ES Zellen
piota2*	pCR [®] 2.1-TOPO	<i>Eco</i> RI 1898 bp	Template für Antikörper-Klonierung

Southern Blot

Name	Plasmid	Fragment/RE und Größe	Verwendung
3'Kpn probe*	pPCR-Script Amp SK(+)	<i>Kpn</i> I 406 bp	3'-Sonde
5'Hind [#]	pBluescript II KS+	<i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI 545 bp	5'Hind Sonde
Neo [#]	pBluescript II KS+	<i>Eco</i> RI 1200 bp	interne Neo-Sonde

2.14 Antikörper

Name	Firma	gekoppelt mit	Verdünnung und Verwendung
anti-PKC ι/λ	eigen		1:6000 Western Blot
anti-PKC ζ	eigen		1:2000 Western Blot
anti-rabbit HRP	Dianova	HRP	1:5000 Western Blot
anti-β-Actin HRP	Santa Cruz	HRP	1:1000 Western Blot
anti-zeta (C20)	Santa Cruz		1:5000 Western Blot
Ki-67	BD Biosciences		1:20 IHC
anti-mouse 594	Invitrogen	red-fluorescent Alexa Fluor 594 dye	1:1000 IHC
anti-Dig	QBioGene	fluorescein	lt. Kit IHC

2.15 Kits

In Vitro Transcription Kit

Stratagene

ApopTag® Apoptosis Detection Kit

QBioGene

M.O.M. Kit

Vector Laboratories

ThermoScript RT-PCR system

Invitrogen

QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit

Stratagene

Nucleobond AX

Macherey-Nagel

QIAquick® Gel Extraction Kit

Qiagen

3 Ergebnisse

3.1 Generierung spezifischer aPKC-Antikörper

Spezifische Antikörper stellen ein wichtiges Werkzeug bei der Proteinanalyse dar. Aufgrund der hohen Homologie von 73% in der Aminosäuresequenz von PKC $\nu\lambda$ und PKC ζ (siehe Abb. 6.1) unterscheiden kommerziell erhältliche Antikörper nicht zwischen beiden aPKC-Isoformen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb polyklonale Antikörper, die spezifisch für die jeweilige Isoform sind, durch Immunisierung von Kaninchen mit den entsprechenden Antigenen generiert.

3.1.1 Klonierung der Peptide in Expressionsvektoren, Proteinexpression und Analyse der aPKC-Antikörperspezifität

Um die Spezifität der aPKC-Antikörper gewährleisten zu können, wurden innerhalb der N-terminalen regulatorischen Region gelegene Aminosäure-Sequenzbereiche gewählt, die für beide Isoformen die geringsten Homologien aufwiesen. Diese Sequenzbereiche umfassten für PKC $\nu\lambda$ die Aminosäuren 184 bis 234 sowie 185 bis 244 für PKC ζ . Die Homologie für diese Bereiche lag bei 25,8% (siehe Abb. 3.1). Die korrespondierenden Nukleotidsequenzen wurden in den Expressionsvektor pGex-6P unter Erhalt des Leserahmens im Anschluss an die *Glutathion S-Transferase* (GST) Genregion subkloniert. Die gerichtete Klonierung wurde durch die eingeführten Restriktionsschnittstellen (*BamHI/SalI* für PKC $\nu\lambda$ und für PKC ζ *SmaI/XhoI*) gewährleistet. Durch eine Restriktionsanalyse wurde die erfolgreiche Klonierung der Nukleotidsequenzabschnitte überprüft. Dabei wurde für PKC $\nu\lambda$ ein Insert in der erwarteten Größe von 161 bp und für PKC ζ von 182 bp identifiziert (Abb. 3.2). Zusätzlich wurde die Korrektheit der Inserts durch Sequenzierung verifiziert (Abb. 6.1 und 6.2).

```

MDSVMPSQEPVVDGKNDGVDLPSSEETDGIAYISSSRKHDNIKDDSEDLKPVIDGVDGIKI   PKC ζ
--SLPPEPMPMDQTMH----PDHTQTVIPYNPSS--HESLDQVGEE-KEAMNTRESGKA   PKC ι/λ
* : * .   * : * . .   * . .   * . * . * *   * : . : . : . * : * . : :   : . *

```

Abb. 3.1 Isoformspezifische Aminosäuresequenzen der aPKC-Isoformen. Die aus dem Bereich der N-terminalen regulatorischen Region liegenden Sequenzen umfassen die Aminosäuren 184 bis 234 (PKC ι/λ) und 185 bis 244 (PKC ζ). Die Homologie der Peptide zueinander beträgt 25,8%, ermittelt durch das Programm CLUSTAL W (1.81, Workbench). Die Markierungen indizieren * - vollständig konservierte Aminosäuren; : - Konservierung starker Gruppen; . - Konservierung schwacher Gruppen; - keine Übereinstimmung.

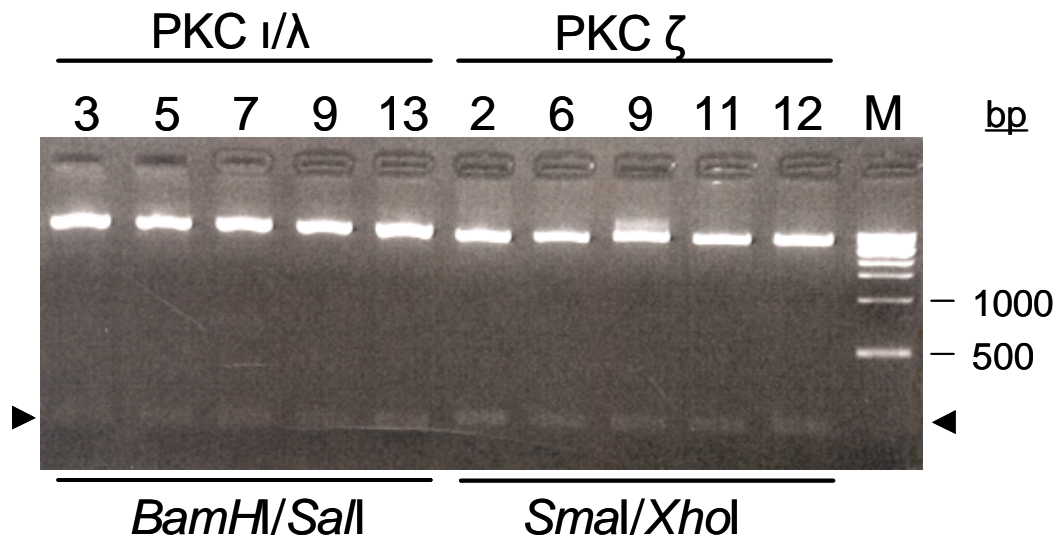


Abb. 3.2 Restriktionsanalyse der für die Generierung der aPKC-spezifischen Peptide korrespondierenden Nukleotidsequenzen, die in den Expressionsvektor pGex-6P kloniert wurden. Bei ausgewählten Klonen (gekennzeichnet durch die Nummern) wurde für PKC ι/λ jeweils ein Fragment mit der korrekten Größe von 161 bp (*Bam*HI/*Sal*I, Pfeilspitze links) und für PKC ζ von 182 bp (*Sma*I/*Xho*I; Pfeilspitze rechts) identifiziert. M, Größenmarker.

Nach der Expression der GST-Fusionsproteine in *E. coli* BL21 wurde das Molekulargewicht (MG) der aPKC-spezifischen Eluate in einem *Coomassie*-gefärbten Polyacrylamidgel überprüft. Zusammen mit dem GST-Protein (ca. 26 kDa) wurde für das rekombinante PKC ι/λ -Peptid (5,71 kDa) ein MG von ca. 32 kDa und für PKC ζ (6,47 kDa) von ca. 32,5 kDa errechnet (Abb. 3.3). Anhand des BSA-Standards im gezeigten Gel wurden die aufgetragenen Proteinmengen abgeschätzt. 960 μ g des PKC ι/λ -Antigens und 640 μ g des PKC ζ -Antigens in einem Gesamtvolumen von jeweils 160 μ l in Eluierungspuffer wurde an die Firma *Pineda-Antikörper-Service*, Berlin, zwecks Immunisierung von je zwei Kaninchen pro Antigen gesandt.

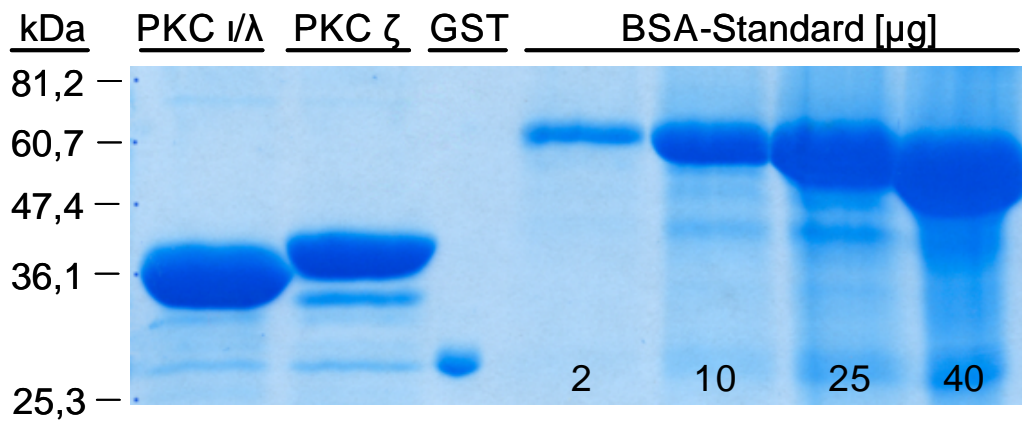


Abb. 3.3 Eluate der rekombinanten aPKC-Peptide in einem Coomassie-gefärbten Gel. Das theoretische Molekulargewicht der GST-Fusionsproteine beträgt für PKC ι/λ ca. 32 kDa und für PKC ζ ca. 32,5 kDa. Anhand einer BSA-Standardreihe wurde die Proteinkonzentration abgeschätzt. Zur Herstellung spezifischer Antikörper wurden die Antigene für PKC ι/λ bzw. PKC ζ für die Immunisierung von Kaninchen eingesetzt.

Die Immunisierung der Kaninchen wurde nach Standardprotokollen durchgeführt. Pro Immunisierung erfolgte jedoch nur bei jeweils einem der beiden Tiere eine spezifische Immunantwort (nach 150 Immunisierungstagen gegen PKC ι/λ bzw. 120 Tagen gegen PKC ζ) gegen das injizierte Antigen.

Für die Überprüfung der Spezifität des PKC ι/λ -Antikörpers wurden Proteinextrakte aus PKC ι/λ -defizienten und Wildtyp ES-Zellen (Bandyopadhyay et al., 2004) über eine Western Analyse untersucht. Dabei wurde der PKC ι/λ -Antikörper 1:6000 verdünnt und die spezifische Bindung über die Peroxidaseaktivität des Sekundäntikörpers mittels Chemilumineszenz detektiert. Es wurde in den Wildtyp ES-Zellen ein Signal in Höhe des putativen MG von 67,2 kDa identifiziert, welches in den PKC ι/λ -defizienten ES-Zellen erwartungsgemäß fehlte (Abb. 3.4).

In gleicher Weise wurde für die Untersuchungen der PKC ζ -Antikörperspezifität verfahren. In diesem Fall wurden Proteinextrakte aus dem Nierengewebe (eine Hochexpressionsdomäne von PKC ζ in der Wildtyp-Maus) von PKC ζ -defizienten Mäusen (Leitges et al., 2001) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verwendet. Der PKC ζ -Antikörper wurde in der Western-Analyse in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Auch hier wurde ein PKC ζ spezifisches Signal in Höhe des putativen MG von 67,7 kDa nur in den Wildtypextrakten festgestellt (Abb. 3.4).

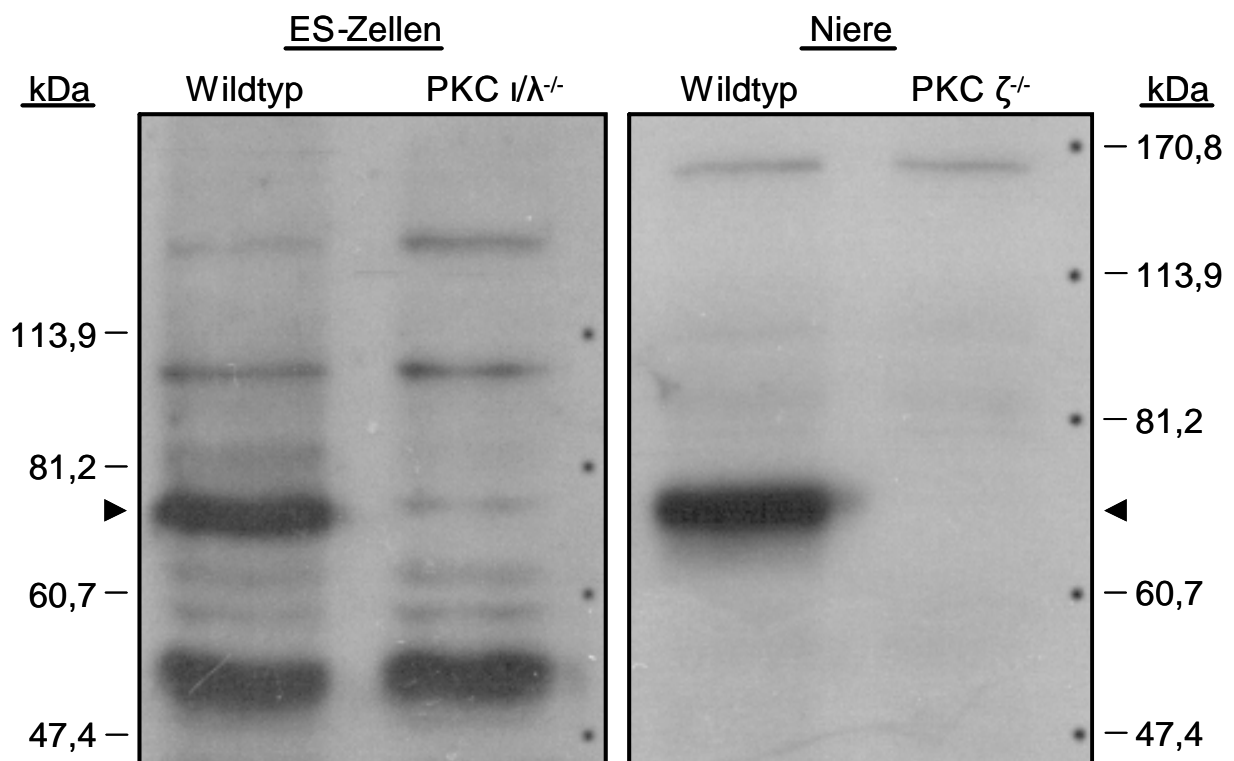


Abb. 3.4 Western Blot zur Überprüfung der Spezifität der polyklonalen Antikörper gegen PKC ι/λ und ζ . Das PKC ι/λ -spezifische Signal von 67,2 kDa (Pfeilspitze links) konnte nur in den Proteinextrakten der Wildtyp-ES-Zellen nachgewiesen werden (kein Signal in PKC ι/λ -defizienten ES-Zellen). In den Nierenextrakten wurde ebenfalls nur im Wildtypgewebe die für PKC ζ spezifische Bande (67,7 kDa, Pfeilspitze rechts) detektiert.

3.2 Expressionsanalyse von PKC ι/λ und ζ während der Embryogenese der Maus

Die unterschiedlichen Phänotypen der aPKC-defizienten Mäuse erbrachten erste Hinweise auf spezifische *in vivo*-Funktionen der beiden Isoformen (siehe Kapitel 1.1.2.2). Auf der anderen Seite konnte in zahlreichen Studien an Säugerepithelzellen gezeigt werden, dass PKC ι/λ und ζ funktionell redundant sind (Joberty et al., 2000; Lin et al., 2000; Suzuki et al., 2001). Per ISH wurde daher das Expressionsmuster der aPKCs hinsichtlich unterschiedlicher sowie überlappender Expressionsdomänen bestimmt. Die Untersuchungen wurden an der Embryonaltagen E7.5, 8.5, 9.5, 10.5, 12.5, 14.5 und E16.5 durchgeführt.

3.2.1 PKC ι/λ und PKC ζ Expression an den embryonalen Tagen E7.5 bis E10.5

RNA *In Situ* Hybridisierungen (ISH) wurden an Paraffinschnitten mit ^{35}S -markierten Sonden, die gegen spezifische Regionen der aPKC Transkripte (Oster et al., 2004) gerichtet waren, durchgeführt. Am embryonalen Tag 7.5 sind PKC ι/λ und PKC ζ im gesamten Embryo ubiquitär exprimiert (Abb. 3.5 A und B). Allerdings ist die mRNA-Expression von PKC ζ zu der von PKC ι/λ eher gering. Das wird besonders deutlich im Vergleich mit der gleich stark ausgeprägten Signalstärke für beide Transkripte in der maternalen Plazenta (Abb. 3.5 A). Das ubiquitäre Expressionsmuster beider aPKCs mit durchweg niedrigerer Transkriptstärke für PKC ζ wurde auch für die Embryonalstage 8.5, 9.5 (Daten nicht gezeigt) und E10.5 gefunden (Abb. 3.5 B). In dieser frühen Phase der Embryogenese konnte für beide aPKC-Isoformen keine gewebespezifische Expression bestimmt werden. Unterschiede in der Signalstärke, wie sie im Neuroepithel im Vergleich zu anderen Geweben des E10.5 Embryos auftraten (Abb. 3.5 B), waren direkt durch die erhöhte Zelldichte, ermittelt anhand der parallelen nukleären Hoechstfärbung, in diesem Bereich bedingt. Eine relative Quantifizierung des mRNA-Niveaus durch quantitative RT-PCR während der mittleren Stadien der Embryonalentwicklung bestätigte das reduzierte PKC ζ -Transkriptvorkommen. Während PKC ζ konstant niedrige Expressionsstärken bei allen analysierten Stadien offenbart, zeigt PKC ι/λ ein zeitliches Expressionsprofil mit höchster Transkriptstärke bei E9.5 und eine sukzessive Abnahme entgegen späterer Stadien (Abb. 3.5 C). Bei E7.5 waren die Transkriptstärken im Vergleich zu PKC ζ um das 2,9 fache, bei E10.5, um das 3,7 fache erhöht.

Diese Befunde wurden auf Proteinebene durch eine Western-Analyse unter Verwendung von embryonalen Proteinextrakten erhärtet. Für den Proteinnachweis von PKC ι/λ and PKC ζ wurden die Embryonalstage E8.5 and E9.5 gewählt, da in diesen Stadien der Phänotyp der PKC ι/λ -defizienten Maus besonders stark ausgeprägt ist (Soloff et al., 2004). Zu beiden Stadien war PKC ι/λ stark exprimiert, während die Proteinkonzentrationen von PKC ζ generell niedriger waren. Dies wurde besonders im Vergleich zur starken PKC ζ -Expression in der adulten Niere deutlich (Abb. 3.5 D, Bahn 7). Es wurde kein PKC ι/λ -Signal in den PKC ι/λ -defizienten embryonalen Stammzellen (Bandyopadhyay et al., 2004) detektiert, was im Kontrast zur starken Expression in den Wildtyp ES-Zellen steht. Dieses und die Abwesenheit eines PKC ζ -Signals in den Nieren von PKC ζ -defizienten Tieren bestätigte die Isoformspezifität beider aPKC-Antikörper (Abb. 3.5 D). Trotz der geringen Menge an aufgetragenem Gesamt-Proteinextrakt – abgeschätzt anhand des zugehörigen β -Actin Signals – wurde eine starke Expression für PKC ζ in den Wildtyp-Nieren festgestellt (Abb. 3.5 D).

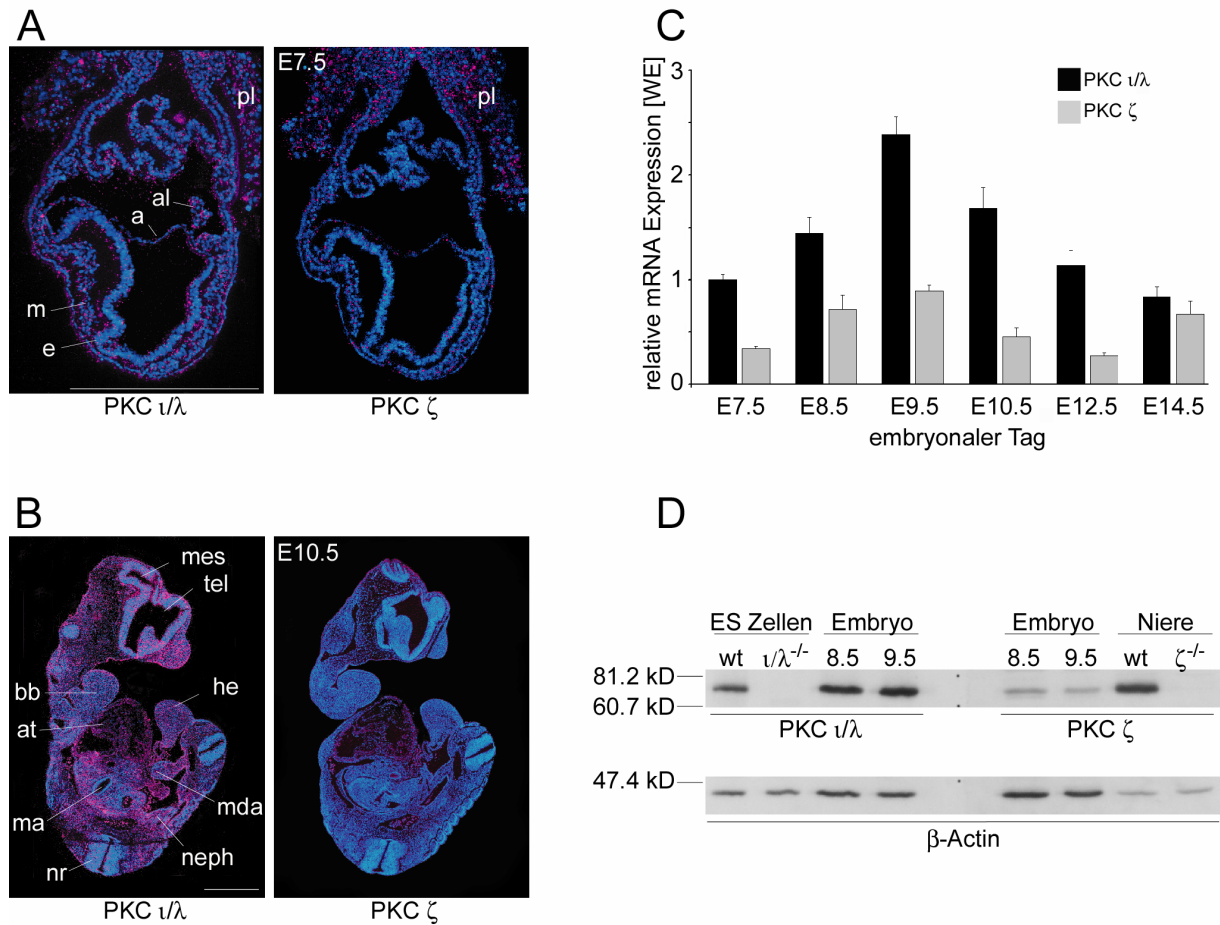


Abb. 3.5 Expression von PKC ι/λ und ζ in frühen Embryonalstadien. (A, B) Flüssigfilm-Photos von sagittalen E7.5-(A) und E10.5-(B) Paraffinschnitten, die mit spezifischen Sonden gegen PKC ι/λ und PKC ζ -Transkripte hybridisiert worden waren (rote Farbe: Signal; blau: nukleäre Hoechstfärbung). Die weißen Balken kennzeichnen jeweils 500 μ m (a, Amnion; al, Allantois; bb, Branchialbogen; e, embryonales Ektoderm; he, hintere Extremität; m, embryonales Mesoderm; ma, Magenumen; mda, Mitteldarm; mes, mesencephaler Vesikel; neph, Mesonephros; nr, Neuralrohr; pl, Plazenta; tel, telencephaler Vesikel). (C) Quantifizierung embryonaler aPKC Transkripte über qPCR an verschiedenen Entwicklungsstadien. Die Werte wurden an die PKC ζ Expression des Embryontages E7.5 normalisiert (WE, willkürliche Einheiten, Average \pm SD; N=3). (D) Western Blot-Analyse embryonaler Proteinextrakte unter Verwendung von Antikörpern gegen PKC ι/λ oder PKC ζ . Die Spezifität der Antikörper wurde mit Hilfe von Proteinextrakten aus ES-Zellen (wt bzw. PKC $\iota/\lambda^{-/-}$) oder adulten Nieren (wt bzw. PKC $\zeta^{-/-}$) bestätigt.

3.2.2 PKC ι/λ - und PKC ζ -Expression am embryonalen Tag E12.5

Hinsichtlich der späteren Embryonalstadien wurde das Expressionsmuster für beide α PKCs durch ISH auf Kryostatschnitten analysiert. Bei E12.5 wurde ein ausgedehntes, jedoch im Vergleich zu früheren Stadien stärker differenziertes Expressionsmuster für beide Isoformen identifiziert. PKC ι/λ wies eine ausgedehnte Expression im gesamten Embryo mit ersten Anzeichen einer Regionalisierung in bestimmten Geweben auf (Abb. 3.6 A). Eine schwache, jedoch ebenfalls ubiquitäre Expression wurde für PKC ζ beobachtet. Zusätzlich zeigten einige Regionen stärkere Aktivität dieses Gens (Abb. 3.6 B). Im Gehirn war PKC ι/λ stark in Mittelhirn und *Striatum* (Abb. 3.6 A), dem olfaktorischen Epithel (Abb. 3.6 A und C), dem Neopallialen Kortex (Abb. 3.6 A und E), dem *Choroid plexus* und der *Medulla oblongata* (Abb. 3.6 A und G), der Rathke-Tasche und im Diencephalon (Abb. 3.6 A und I) exprimiert. Eine starke PKC ζ -Transkription wurde im olfaktorischen Epithel (Abb. 3.6B und D), dem *Choroid plexus* (Abb. 3.6 B und H) und der Rathke-Tasche detektiert (Abb. 3.6 B und J). In anderen Gehirnregionen wurde nur eine schwache Expression für diese Isoform gefunden (Abb. 3.6B, F, H and J). Im Körper des Embryos wurden starke Signale für PKC ι/λ in der Leber identifiziert (Abb. 3.6 A und K). Im Gegensatz dazu zeigte PKC ζ in der Leber allgemein schwache Aktivität, aber starke Expression in den hepatischen Sinusoiden (Abb. 3.6 B und L). In der Lunge wurde für PKC ι/λ eine ubiquitäre Expression mit erhöhten Signalen in den segmentalen Bronchien detektiert (Abb. 3.6 A und M), während starke PKC ζ -Aktivität nur in den segmentalen Bronchien beobachtet wurden (Abb. 3.6 N). Im Intestinum zeigte PKC ι/λ eine hohe Expression in allen Gewebeschichten (Abb. 3.6 O), während die Expression von PKC ζ auf das Epithel und das Bindegewebe beschränkt war (Abb. 3.6 P). Erhöhte Signalstärken waren für PKC ι/λ im Magen und der sich entwickelnden Niere zu sehen (Abb. 3.6 Q). Dagegen wurden vermehrt PKC ζ -Transkripte in der mukösen Membranschicht des Magens (Abb. 3.6 R, linke weiße Pfeilspitze) und im Epithel der Urinenkanälchen des Metanephros beobachtet (Abb. 3.6 R, rechte weiße Pfeilspitze). In der Blase wurden PKC ι/λ -Transkripte im gesamten Organ detektiert, während die Expression von PKC ζ auf den Urogenitalsinus beschränkt war. Beide Isoformen wurden in der Urethra detektiert (Abb. 3.6 S und T).

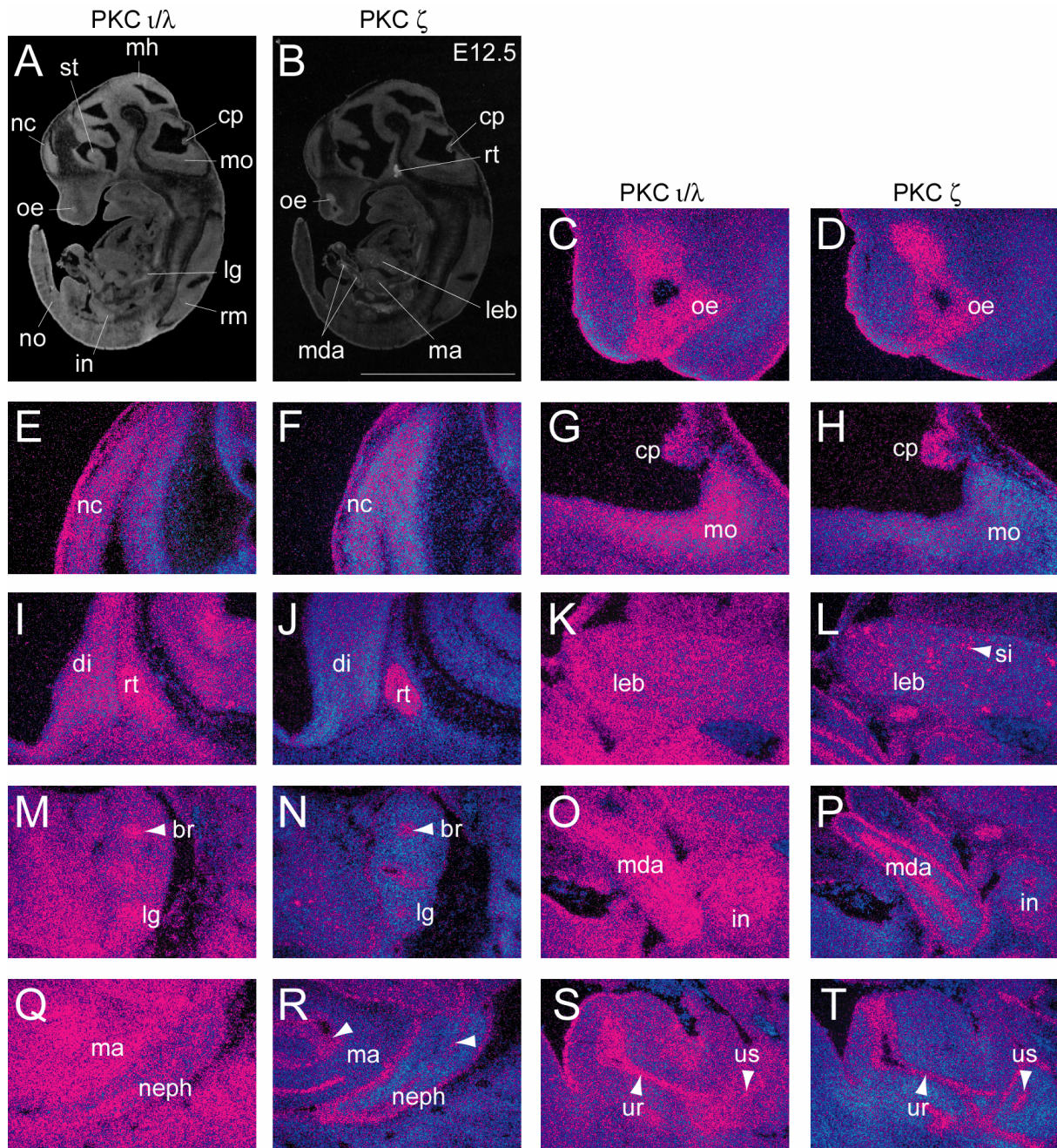


Abb. 3.6 Expression von PKC ι/λ und ζ am Embryonaltag E12.5. (A-D) Dunkelfeldphotos von E12.5 *in situ* Hybridisierungen. PKC ι/λ ist weitläufig im gesamten Embryo exprimiert (A), während die PKC ζ -Transkription stark regionalisiert erscheint (B). Der weiße Balken markiert 5 mm. (C-T) Vergrößerungen ausgewählter Gewebe angrenzender Schnitte (br, segmentaler Bronchus; cp, *Choroid plexus*; di, Diencephalon; in, Intestinum; leb, Leber; lg, Lunge; ma, Magen; mda, Mitteldarm; mh, Mittelhirn; mo, *Medulla oblongata*; nc, Neopallialer Kortex; neph, Metanephros; no, Notochord; oe, olfaktorisches Epithel; rm, Rückenmark; rt, Rathke-Tasche; si, hepatische Sinusoide; st, *Striatum*; ur, Urethra; us, Urogenitalsinus). Hybridisierungen mit den entsprechenden Sense-Sonden zeigten keine detektierbaren Signale (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 PKC ι/λ - und PKC ζ -Expression am embryonalen Tag E14.5

Die Differenzierung der Expression beider aPKC Isoformen, die um das Embryonalstadium E12.5 herum initiiert wird, erschien bei E14.5 noch stärker ausgeprägt. In diesem Stadium war PKC ι/λ nach wie vor in allen Geweben des Embryo exprimiert (Abb. 3.7 A und C). Im deutlichen Gegensatz dazu war die Expression von PKC ζ auf wenige Gewebe beschränkt (Abb. 3.7 B und D). Um weiterhin die Spezifitäten in den Expressionsmustern beider Gene zu charakterisieren, wurden einige der besonders auffälligen Gewebetypen miteinander verglichen. Im Gehirn wurde für PKC ι/λ ein starkes Signal im Neopallialen Kortex, im *Striatum*, im sich in den lateralen Ventrikel erstreckenden *Choroid Plexus* (Abb. 3.7 A und E), im olfaktorischen Epithel (Abb. 3.7 K) und im Trigeminalganglion gefunden (Abb. 3.7 A). Zusätzliche hohe Transkriptionsaktivitäten wurden im *Superior colliculus* und dem *Tegmentum* des Mittelhirns, dem zerebralen Vorläufer und im *Choroid Plexus* (Abb. 3.7 C und G), in der Rathke-Tasche und dem angrenzenden Diencephalon (Abb. 3.7C und I) sowie in der *Medulla oblongata* detektiert (Abb. 3.7 A and C). Im Gegensatz dazu war die Expression von PKC ζ im Gehirn auf den *Choroid Plexus* (Abb. 3.7 B, D, F und H), das olfaktorischen Epithel (Abb. 3.7 B, D und L) und die Rathke-Tasche beschränkt (Abb. 3.7 D und J).

Innerhalb des Körpers war PKC ι/λ am stärksten in der Unterkieferdrüse (Abb. 3.7 A), dem Thymus (Abb. 3.7 C und M), entlang des Rückenmarks, in den Knorpelvorläufern und den dorsalen Wurzelganglien exprimiert (Abb. 3.7 A), was im Kontrast zu der Abwesenheit der PKC ζ -Expression in diesen Regionen steht (Abb. 3.7 B, D und N).

Ein starkes Transkriptionssignal mit unterschiedlichen, jedoch für jede Isoform spezifischen Expressionsdomänen wurde in einigen Organen gefunden. Innerhalb der Lunge war PKC ι/λ ubiquitär aktiv, zeigte aber eine erhöhte Expression in den terminalen Bronchiolen (Abb. 3.7 A und Q), während die Expression von PKC ζ auf die terminalen Bronchiolen und das Epithel des Bronchialastes (Abb. 3.7 B und R) beschränkt war. In der Niere war der gesamte Metanephros, einschließlich der kortikalen, medullären und mesenchymalen Regionen positiv für PKC ι/λ (Abb. 3.7 A und U), während PKC ζ nur in den primitiven *Glomeruli* der *Medulla* detektiert werden konnte (Abb. 3.7 B und V). Im Intestinum war PKC ι/λ durchweg in allen Gewebeschichten exprimiert (Abb. 3.7 C, S und W), während PKC ζ -Signal auf das Epithel und das umgebende Bindegewebe beschränkt waren (Abb. 3.7 D, T und X). In der Blase waren beide aPKCs sehr stark im Urogenitalsinus exprimiert, wobei für PKC ι/λ ein schwächeres Signal in der Sinus-Wand detektiert wurde (Abb. 3.7 C, D, S und T). Mittlere Signalstärken wurden für PKC ι/λ im Herzen (Abb. 3.7 A, C und O) und der Leber

identifiziert (Abb. 3.7 A, C und Q), während in diesen Gewebetypen nur schwache PKC ζ -Transkription beobachtet wurde (Abb. 3.7 B, D, O und P).

Zusammengefasst zeigen beide aPKCs am Embryonaltag E14.5 ein hochdifferenziertes Expressionsmuster. PKC $\nu\lambda$ wurde in den meisten Organen des Embryos detektiert. Allerdings ist die Expression im Vergleich zu früheren Stadien stärker regionalisiert. Die Expression von PKC ζ war in diesem Stadium sowohl im Zentralnervensystem (ZNS) als auch in der Peripherie auf wenige Gewebetypen beschränkt.

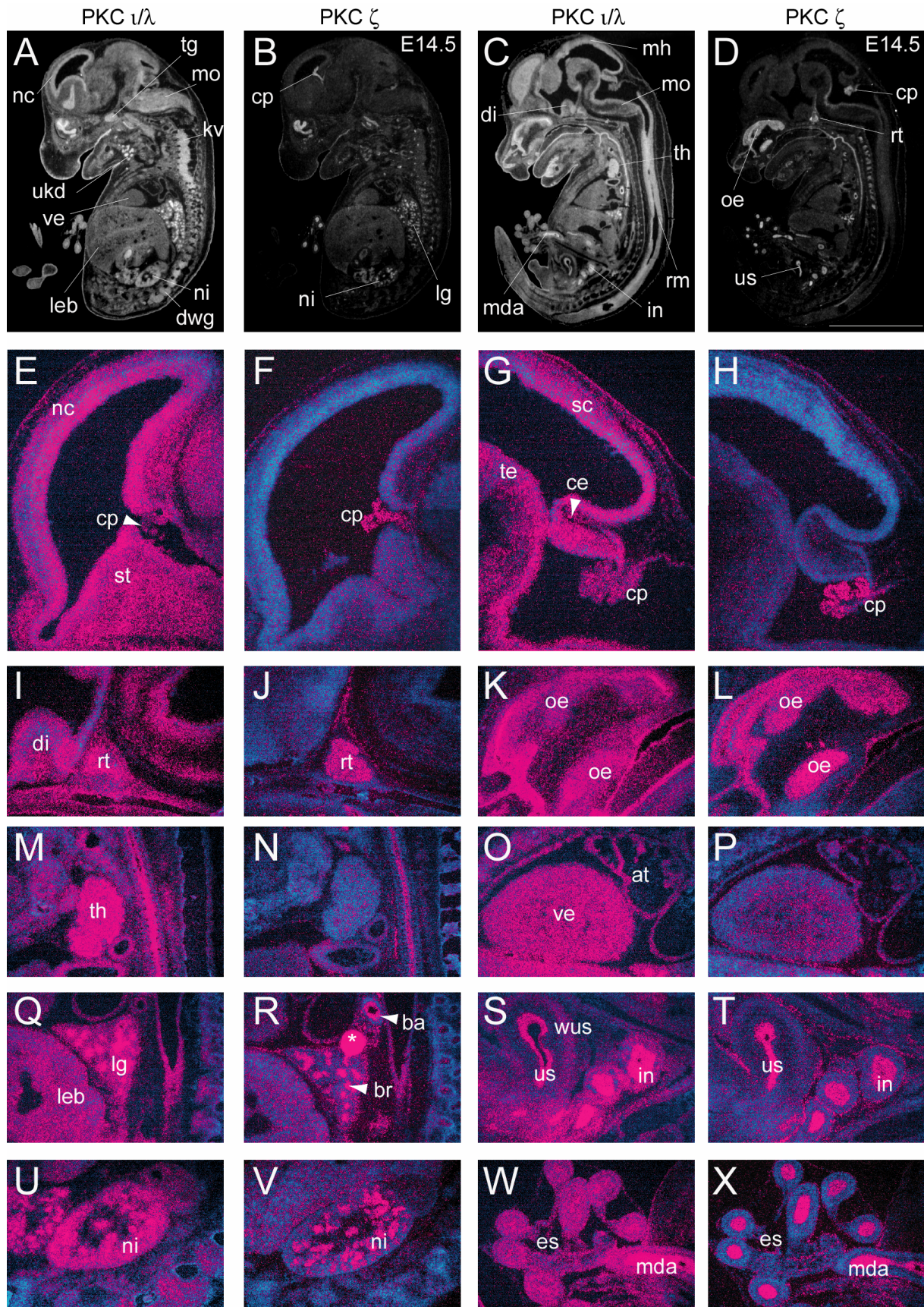


Abb. 3.7 Expression von PKC ι/λ und ζ am Embryonaltag E14.5.

Abb. 3.7 Expression von PKC ν/λ und ζ am Embryonaltag E14.5. (A-D) Dunkelfeldphotos von E14.5 *in situ* Hybridisierungen. PKC ν/λ ist weitläufig im gesamten Embryo exprimiert (A+C), während die PKC ζ -Expression auf wenige Domänen beschränkt ist (B+D). Die weißen Balken kennzeichnen 4 mm. (E-X) Vergrößerungen ausgewählter Gewebe von angrenzenden Schnitten (at, Atrium des Herzens; ba, Verzweigung des Bronchialastes; br, terminale Bronchiolen; ce, Cerebellum; cp, *Choroid plexus*; di, Diencephalon; es, Eingeweidesack; in, Intestinum; leb, Leber; lg, Lunge; mda, Mitteldarm; mh, Mittelhirn; mo, *Medulla oblongata*; nc, Neopallialer Kortex; ni, Niere; oe, olfaktorisches Epithel; rm, Rückenmark, rt, Rathke-Tasche; sc, *Superior colliculus*; st, *Striatum*; te, *Tegmentum*; tg, Trigemininalganglion; th, Thymus; us, Urogenitalsinus; ve, Ventrikel des Herzens; wus, Wand des Urogenitalsinus; * Artefakt). Hybridisierungen mit den entsprechenden Sense-Sonden zeigten keine detektierbaren Signale (Daten nicht gezeigt).

3.2.4 PKC ν/λ - und PKC ζ -Expression am embryonalen Tag E16.5

Bei E16.5 zeigte PKC ν/λ ein komplexes differenziertes Expressionsmuster. Im Gehirn wurden PKC ν/λ -Transkripte im neopallialen Kortex und der ventrikulären Zone des Neokortex (Abb. 3.8 A und E, Pfeilspitzen), im *Striatum* des Diencephalons (Abb. 3.8 A), dem olfaktorischen Epithel (Abb. 3.8 A und E) und in den Trigemininalganglien (Abb. 3.8 A) detektiert. In den medialen und kaudalen Teilen des Gehirns war PKC ν/λ nun ebenfalls im *Tectum* und *Segmentum* des Mittelhirns (Abb. 3.8 C und Daten nicht gezeigt), dem zerebralen Vorläufer (Abb. 3.8 C) und der *Medulla oblongata* (Abb. 3.8 A) zu finden. Im Gegensatz zu E14.5 waren nur wenige Transkripte im *Choroid plexus* detektierbar (Abb. 3.8 C und E). Zusätzlich verschwand die Expression in der Rathke-Tasche (Abb. 3.8 I). Interessanterweise wurden in diesem Embryonalstadium PKC ζ -Signale im *Choroid plexus* (Abb. 3.8 D und F), im olfaktorischen Epithel (Abb. 3.8 D und L) und in der Rathke-Tasche (Abb. 3.8 D und J) gefunden.

PKC ν/λ war stark in der Unterkieferdrüse (Abb. 3.8 A), im Thymus (Abb. 3.8 A und O), dem Rückenmark (Abb. 3.8 C und G) und den dorsalen Wurzelganglien (Abb. 3.8 C) exprimiert. Zusätzlich wurde hohe PKC ν/λ -Transkription im braunen Fettgewebe identifiziert (Abb. 3.8 C). In Übereinstimmung mit den gewonnenen Daten von E14.5 wurde PKC ζ in keiner dieser Regionen am embryonalen Tag 16.5 detektiert (Abb. 3.8 B, D, H und P). In der Lunge zeigte PKC ν/λ eine starke Expression in allen Gewebeschichten (Abb. 3.8 M), während PKC ζ eine ubiquitäre, jedoch schwächere Expression mit erhöhtem Signal im den Hauptbronchus und die terminalen Bronchiolen auskleidenden Epithel erkennen ließ (Abb. 3.8 N und V, weiße Pfeilspitze). Eine nur marginale PKC ν/λ -Färbung wurde im Epithel des Hauptbronchus beobachtet (Abb. 3.8 U, weiße Pfeilspitze). Innerhalb der Niere wurden PKC ν/λ -Transkripte sowohl in den kortikalen als auch medullären Regionen detektiert (Abb. 3.8 A und Q),

während PKC ζ -mRNA nur in der *Medulla* gefunden wurde (Abb. 3.8 R). Im Intestinum war die Expression von PKC ν/λ im Epithel an der Basis der Villi erhöht (Abb. 3.8 A, C und S, weiße Pfeilspitzen), eine Domäne, in der stammzellähnliche Vorläufer des intestinalen Epithels lokalisiert sind (Slorach et al., 1999). Im Gegensatz dazu wurden PKC ζ -Transkripte durchweg in allen Epithelschichten gefunden (Abb. 3.8 B, D und T). Keine Veränderungen in den Expressionsdomänen der Blase wurden für beide Gene zwischen den Embryonalstadien E14.5 und E16.5 identifiziert (Abb. 3.8 C und D und Daten nicht gezeigt). Interessanterweise wurde ein unterschiedliches Expressionsmuster für beide aPKCs im Hoden identifiziert (Abb. 3.8 W und X). Während die PKC ζ -Signale auf das Epithel der Samenkanäle beschränkt war, wurde die mRNA von PKC ν/λ im gesamten Gewebe detektiert. Im Auge wurde PKC ν/λ in der Retina und im die Iris umgrenzenden kuboidalen Epithel gefunden (Abb. 3.8 Y1), während PKC ζ im kuboidalen Epithel und der Pigmentschicht der Retina lokalisiert war (Abb. 3.8 Y2, weiße and gelbe Pfeilspitzen). In der sich entwickelnden Epidermis war eine starke Expression von PKC ν/λ in allen Schichten, einschließlich der Haarfollikel, zu sehen (Abb. 3.8 Z1), während PKC ζ nur in den äußersten embryonalen Peridermzellen gefunden wurde (Abb. 3.8 Z2). Das Expressionsmuster von PKC ν/λ und PKC ζ der Embryonalstadien E12.5 bis E16.5 ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

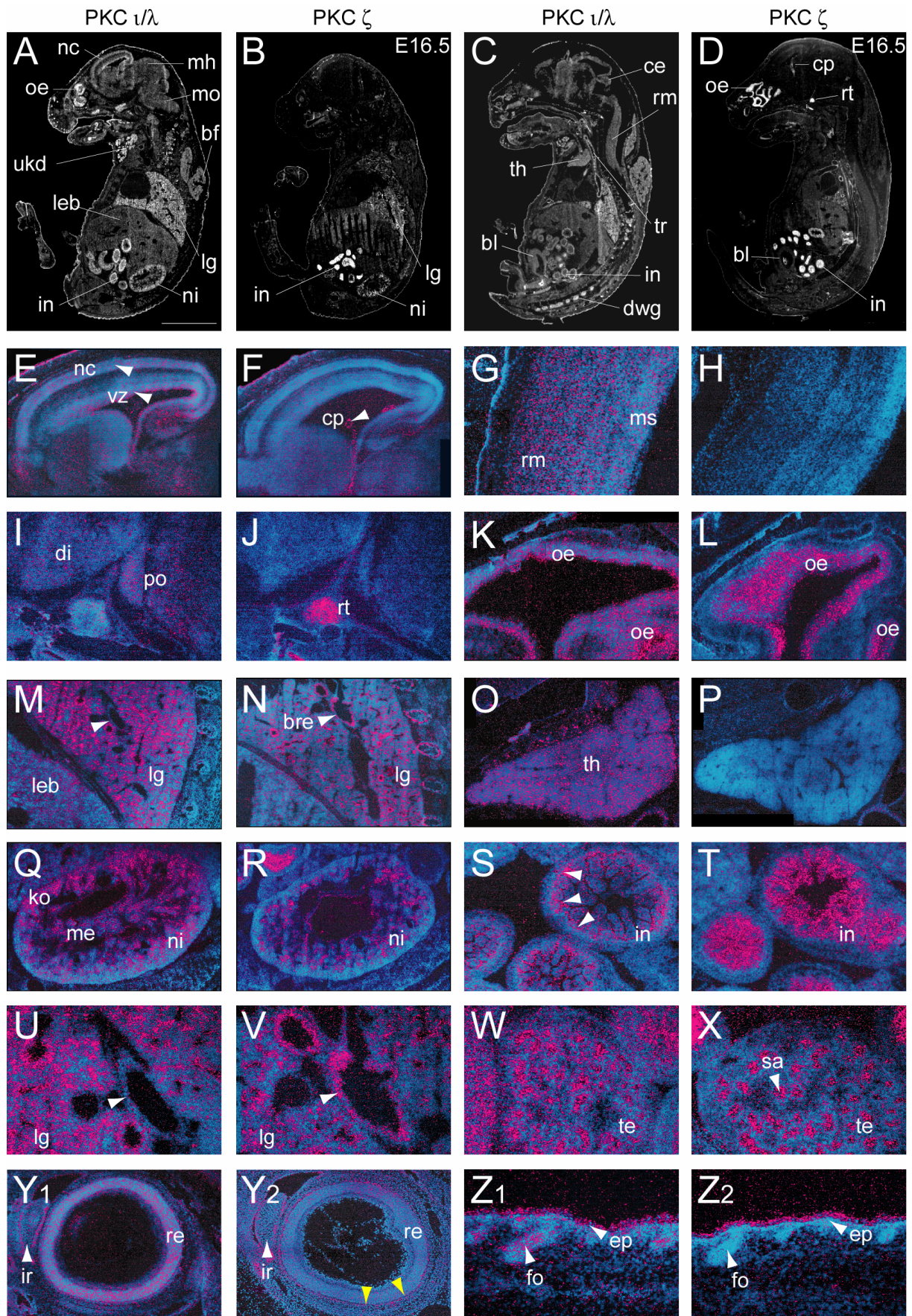


Abb. 3.8 Expression von PKC ι/λ und ζ am Embryonaltag E16.5.

Abb. 3.8 Expression von PKC ι/λ und ζ am Embryonaltag E16.5. (A-D) Dunkelfeldphotos von E16.5 *in situ* Hybridisierungen. PKC ι/λ ist weitläufig im gesamten Embryo exprimiert (A+C), während die PKC ζ -Expression auf wenige Domänen beschränkt ist (B+D). Die weißen Balken markieren 4 mm. (E-Z2) Vergrößerungen ausgewählter Gewebe von angrenzenden Schnitten (bf, braunes Fettgewebe; bl, Blase; bre, Epithel des Bronchus; ce, Cerebellum; cp, *Choroid plexus*; di, Diencephalon; dwg, dorsale Wurzelganglien; ep, Epidermis; fo, Haarfollikel; in, Intestinum; ir, Iris; ko, kortikale Region der Niere; leb, leber; lg, Lunge; me, medulläre Region der Niere; mh, Mittelhirn; ms, Mantelschicht; nc, Neopallialer Kortex; ni, Niere; oe, olfaktorisches Epithel; po, Pons; rm, Rückenmark; rt, Rathke-Tasche; sa, Samenkanälchen; te, Testes; th, Thymus; tr, Trachea; ukd, Unterkieferdrüse; vz, ventrikuläre Zone des neopallialen Kortex). Hybridisierungen mit den entsprechenden Sense-Sonden zeigten keine detektierbaren Signale (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3.1 Überblick der aPKC Expression von E12.5 bis E16.5.

Stadium Gewebe	E12.5		E14.5		E16.5	
	v/λ	ζ	v/λ	ζ	v/λ	ζ
<i>Auge</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	++ - +++ (r)	++ (r)
<i>Blase</i>	+++ (u)	+++ (r)	+++ (r), + (r)	+++ (r)	+++ (r), + (r)	+++ (r)
<i>Cerebellum</i>	n.v.	n.v.	+++ (u)	–	++ (u)	–
<i>Choroid plexus</i>	+++ (u)	+++ (u)	+++ (u)	+++ (u)	+ (u)	+++ (u)
<i>Diencephalon</i>	+++ (u)	+ (u)	+++ (u)	–	++ (u)	–
<i>Dorsale Wurzelganglien</i>	+++ (u)	(+)	+++ (u)	–	+++ (u)	–
<i>Epidermis</i>	+++ (u)	+	+++ (u)	–	+++ (u)	–
<i>Herz</i>	+++ (u)	+ (u)	++ (u)	+ (u)	++ (u)	+ (u)
<i>Intestinum</i>	+++ (u)	+++ (r)	+++ (u)	+++ (r)	++ - +++ (r)	+++ (r)
<i>Knorpel- vorläufer</i>	+++ (u)	+ (u)	+++ (u)	–	++ (u)	–
<i>Niere</i>	+++ (u)	+++ (r)	+++ (u)	+++ (r)	+++ (u)	+++ (r)
<i>Leber</i>	+++ (u)	+ (u); +++ (r)	++ (u)	+ (u)	+ (u)	–
<i>Lunge</i>	+++ (u)	+++ (r)	+++ (u)	++ - +++ (r)	+++ (u)	+++ (r)
<i>Medulla oblongata</i>	+++ (u)	+ (u)	+++ (u)	–	++ (u)	–
<i>Mittelhirn</i>	+++ (u)	+ (u)	+++ (u)	–	++ (u)	–
<i>Neokortex</i>	++ (u)	+ (u)	+++ (u)	–	+++ (r)	–
<i>Olfaktorisches Epithel</i>	+++ (u)	+++ (u)	+++ (u)	+++ (u)	+++ (u)	+++ (u)
<i>Ovar</i>	n.v.	n. v.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Pankreas</i>	n.d.	n.d.	–	–	–	–
<i>Rathke- Tasche</i>	+++ (u)	+++ (u)	+++ (u)	+++ (u)	(+)	+++ (u)
<i>Rückenmark</i>	+++ (u)	+ (u)	+++ (u)	–	++ (u)	–
<i>Testes</i>	n v.	n.v.	n.d.	n.d.	+++ (u)	+++ (r)
<i>Thymus</i>	n.v.	n.v.	+++ (u)	–	+++ (u)	–
<i>Unterzung- drüse</i>	n.v.	n.v.	+++ (u)	–	+++ (u)	–

Die Markierungen indizieren starke (+++), mittlere (++) , schwache (+) oder keine (–) Expression mit ubiquitärer (u) oder regionaler (r) Expression für die angegebenen Gewebe. Abkürzungen: n.d., nicht determiniert; n.v., nicht verfügbar.

3.3 Untersuchungen zur phänotypischen Charakterisierung der PKC ι/λ -defizienten Maus

Der Verlust des PKC ι/λ -Gens verursacht schwerwiegende Entwicklungsstörungen, die um den embryonalen Tag 8.5 herum zur Letalität der sich entwickelnden Maus führen (siehe Kapitel 1.1.2.2). Die aPKC-Defizienz bei Invertebraten, bei denen nur eine aPKC-Isoform bekannt ist, führt bei *Coenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* aufgrund des Verlustes von Zellpolarität ebenfalls zu einer embryonalen Sterblichkeit während der frühen Entwicklungsstadien. Bei *D. melanogaster* wurde zudem gezeigt, dass in mutanten Embryonen keine *Zonula adherens* (*adherens junctions* bei Vertebraten) mehr im Epithel des Embryos gebildet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden an die Untersuchungen zur Charakterisierung der im Labor Leitges generierten PKC ι/λ -defizienten Maus angeknüpft (siehe Kapitel 1.1.2.2), indem E7.5-Embryonen phänotypisch untersucht wurden.

3.3.1 Morphologische Untersuchung des E7.5-Embryos

Die phänotypischen Unterschiede zwischen Wildtyp- und PKC ι/λ -defizienten Embryonen offenbarten sich bereits bei morphologischer Betrachtung des embryonalen Stadiums E7.5. In Ganzpräparaten und auf mit Hämatoxylin/Eosin-gefärbten sagittalen Schnitten erschien der mutante Embryo aufgrund einer stark verkleinerten Amnionhöhle in seiner Größe reduziert (Abb. 3.9 A und B). Ausschnittvergrößerungen offenbarten im Mutaten, dass eine epitheliale Struktur des embryonalen Ektoderms nicht mehr zu erkennen war, sondern die Zellen in einem übereinandergehäuften gelockerten Zellverband vorlagen. Im Vergleich dazu ist ektodermale Epithel beim Wildtyp-Embryo einschichtig und im festen Zellverband organisiert (Abb. 3.9 C).

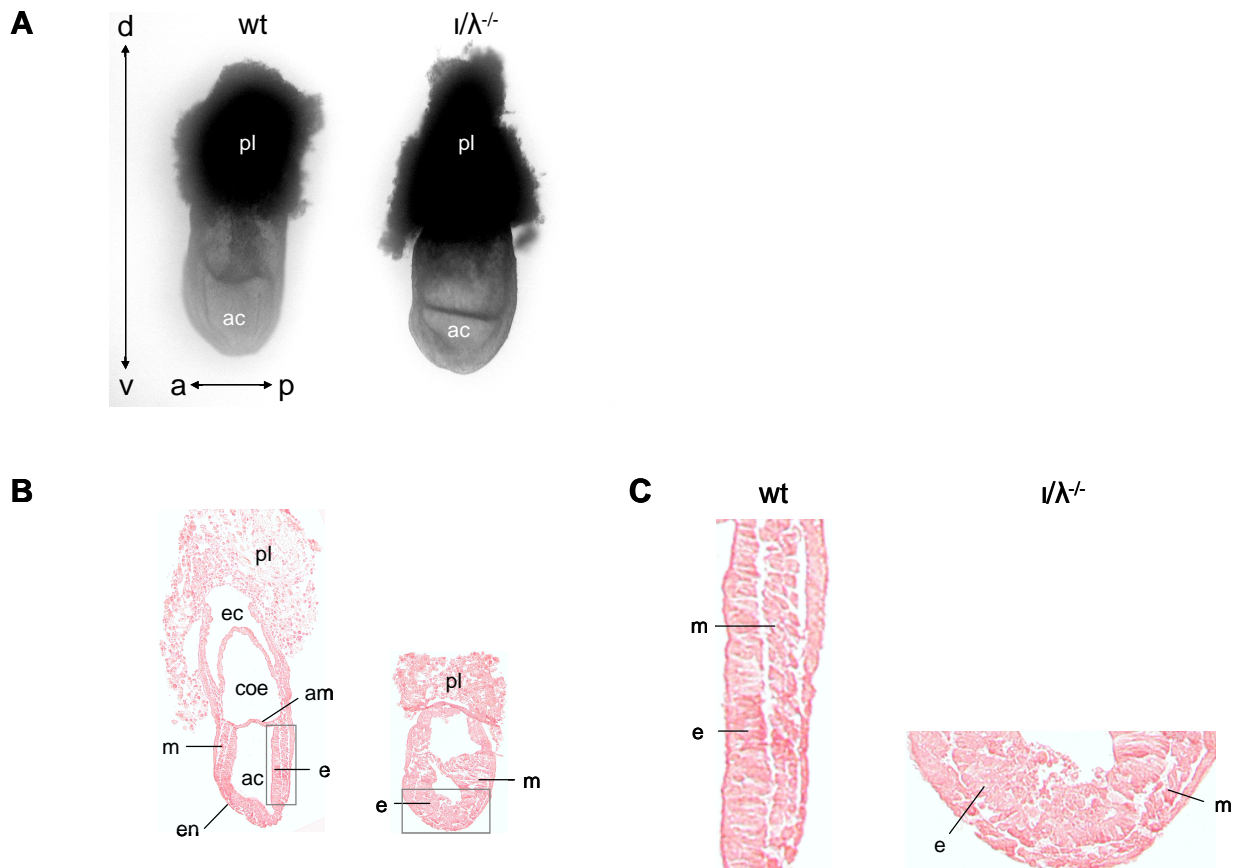


Abb. 3.9 Morphologische Untersuchung des PKC ι/λ -defizienten E7.5-Embryos. Vergleichende Morphologie des Wildtyp- und mutanten Embryos in Ganzpräparaten (A) und HE-gefärbten Sagittalschnitten (B). Im mutanten Embryo ist die Amnionhöhle in ihrer Größe stark reduziert. (C) In der Vergrößerung aus dem Bereich der in (B) markierten grauen Kästen ist im Wildtyp das als Einzelschicht vorliegende embryonale Ektoderm-Epithel im festen Zellverband zu sehen, das im Mutanten als Zellhaufen in gelockertem Zellverband erkennbar ist. Abkürzungen: a, anterior; am, Amnion; ac, Amnionhöhle; coe, extraembryonales Coelom; d, dorsal; e, embryonales Ektoderm; ec, extraplazentale Höhle; en, embryonales Endoderm; HE, Hämatoxylin/Eosin-Färbung; m, embryonales Mesoderm; p, posterior; pl, Plazenta; v, ventral; wt, Wildtyp.

3.3.2 Untersuchungen zu Proliferation und Apoptose

Die postulierte Rolle von aPKCs in der Regulierung des Zellzyklus' und dem Überleben der Zelle (Berra et al., 1995; Bjorkoy et al., 1997) deutete darauf hin, dass Veränderungen in der Proliferation oder apoptotische Prozesse für die Lethalität des PKC ι/λ -defizienten Embryos verantwortlich sein könnten. Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen auf embryonalen Paraffinschnitten wurden im mutanten E7.5-Embryo allerdings keine Abweichungen in der Proliferationsfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp-Embryo detektiert (Abb. 3.10 A).

Auch eine Untersuchung der apoptotischen Aktivität zu diesem Stadium über immunhistochemische Detektion von TdT (TUNEL-Nachweis) brachte keine weiteren Aufschlüsse. Beide Genotypen zeigten im gleichem Maße geringe Apoptose (Abb. 3.10 B). Zusammengefasst erscheint es deshalb unwahrscheinlich, dass Veränderungen in der Proliferation oder apoptotische Prozesse eine Rolle für den letalen Phänotyp der PKC ι/λ -Defizienz spielen.

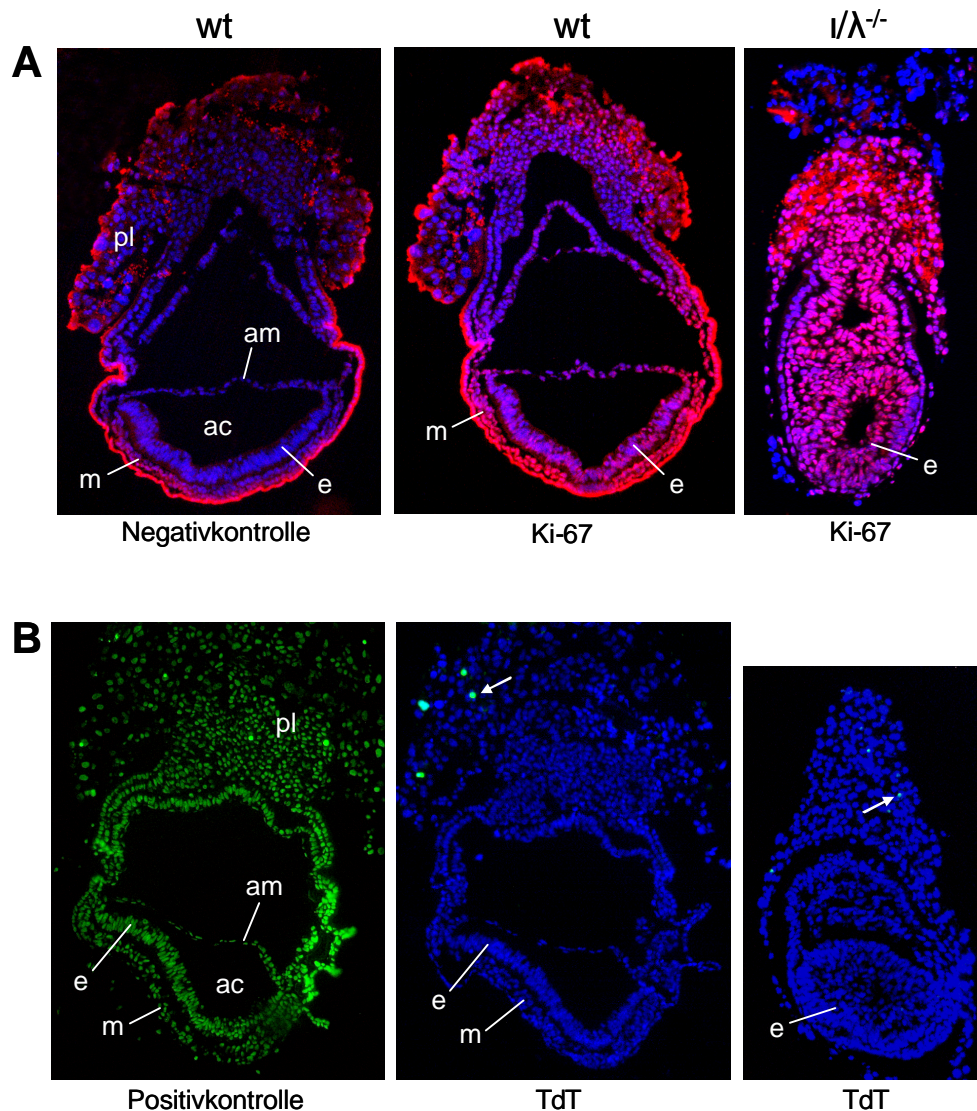


Abb. 3.10 Analyse der Proliferation und Apoptose im PKC ι/λ -defizienten Embryo (E7.5). Immunhistochemische Färbungen embryonaler Paraffinschnitte. (A) Der Verlust des PKC ι/λ -Gens hat keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit im Embryo. Die Embryonen beider Genotypen zeigten in allen Zellen embryonalen Ekto- und Mesoderms eine Überlagerung der Signale (pinkfarben) für die blaue Färbung des Zellkerns und des roten Signals des verwendeten nukleären Zellproliferation-assoziierten Antigens (Ki-67). In der Negativkontrolle war in den embryonalen Regionen kein rotes Signal, sondern nur die blaue Färbung des Zellkerns detektierbar. (B) In der mit DNaseI behandelten Positivkontrolle waren alle Zellkerne des embryonalen Ekto- und Endoderms, der extraembryonalen Komponenten und der maternalen Plazenta für den

Apoptose-Marker (TdT) grün gefärbt. Im embryonalen Epithel des Wildtyp- und PKC $\nu\lambda$ -defizienten Embryos war kein grünes Signal zu sehen. Nur in einigen Zellen im Bereich der Plazenta beider Genotypen wurden apoptotische Signale identifiziert (weiße Pfeile; blau, nukleäre Hoechst-Färbung; grün, TdT-Signal). Abkürzungen: am, Amnion; ac, Amnionhöhle; e, Ektoderm; Ki-67, nukleäres Zellproliferation-assoziiertes Antigen; m, Mesoderm; pl, Plazenta; TdT, terminale Desoxyribonukleotidyl-Transferase; wt, Wildtyp.

3.3.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die sog. Zellpolarität spielt für die apiko-basale Orientierung von Epithelien sowie für die zelluläre Integrität eine entscheidende Rolle. Maßgeblich daran beteiligt sind die das Lumen abgrenzenden apikal gelegenen *tight junctions*. Sie stellen u.a. eine Diffusionsbarriere dar und erlauben eine selektive parazelluläre Diffusion sowie eine beschränkte intramembrane Diffusion von Lipiden und Proteinen zwischen den apikalen und basalen Domänen.

Die verkleinerte Amnionhöhle und die ungeordnete übereinandergehäufte Struktur der Epithelzellen im PKC $\nu\lambda$ -defizienten E7.5 Embryo ließen auf eine Veränderung in der Durchlässigkeit des Epithels schließen. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Gudrun Brandes (MHH, Abteilung Zellbiologie, Zentrum Anatomie) wurden daher E7.0 sowie E7.5-Embryonen elektronenmikroskopisch untersucht. Die Morphologie im Wildtyp zeichnet sich aus durch ein einreihiges Ektoderm-Epithel, in dem die Zellen mit deutlich ausgeprägten *adherens junctions* miteinander verbunden sind. Lumenseitig stehen die Zellen über punktförmige *tight junctions* miteinander in Kontakt. Desmosomen werden auch in diesem Stadium schon ausgebildet (Abb. 3.11 A). Im PKC $\nu\lambda$ -defizienten Embryo waren die Epithelzellen in einem ungeordneten Zellverband organisiert. Sie sind abgerundeter und besitzen einen zentralen Zellkern. Eine klare Abgrenzung der Zellen des Endo- von denen des Ektoderms war nicht zu erkennen. *Adherens junctions*, *tight junctions* sowie Desmosomen wurden nicht detektiert. (Abb. 3.11. B). Zur Bestimmung der Funktionalität der *tight junctions* wurde dem Epithel entweder von luminal oder basolateral Lanthan dem Fixierungsmittel zugesetzt. Damit die elektronendichte Substanz auch lumenseitig in das apikale embryonale Ektoderm gelangen konnte, wurde die Amnionhöhle mit einer Insulinnadel angeritzt. Im Wildtyp konnte gezeigt werden, dass das Lanthan durch die *tight junctions* an der Diffusion im parazellulären Raum gehindert wird (Abb. 3.11 C). Im mutanten Embryo diffundierte das Lanthan tiefer zwischen die Epithelzellen und bildete von außen nach innen einen gleichmäßigen Gradienten aus (Abb. 3.11 D). Zusammenfassend waren interzelluläre Kontakte und die selektive Barrierefunktion des embryonalen Epithels im

PKC ι/λ -defizienten Embryo nicht festzustellen. *Adherens junctions*, *tight junctions* und Desmosomen fehlten völlig.

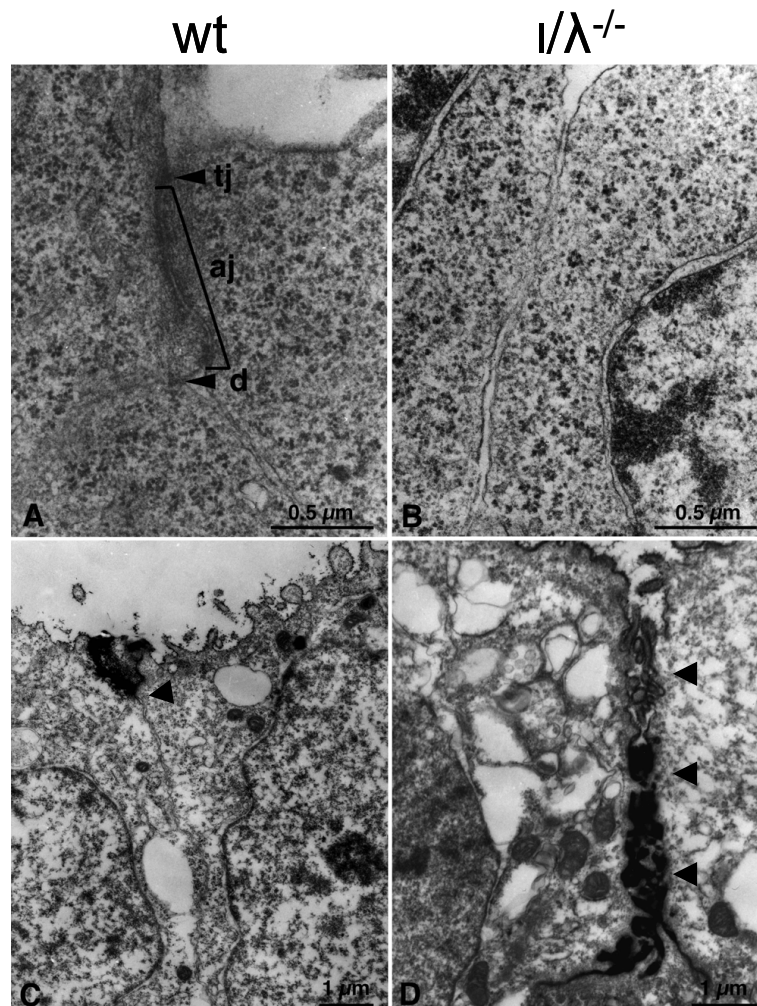


Abb. 3.11 Elektronenmikroskopie der Zell-Zellkontakte im Ektoderm von Wildtyp und PKC ι/λ -defizienten E7.5 Embryonen. (A) Im Wildtyp-Ektoderm kann der Schlussleistenkomplex aus *tight junctions* (tj), *adherens junctions* (aj) und Desmosomen (d) nachgewiesen werden, währenddessen das PKC-defiziente Epithel (B) einen Zellhaufen ausbildet und nirgendwo diese Zellkontakte aufweist. (C+D) Bei Diffusion des elektronendichten Lanthans von der apikalen Ektodermoberfläche aus ist ein Diffusionsstop im parazellulären Spalt nur der Wildtyp- (C), nicht jedoch bei den PKC ι/λ -defizienten Embryonen (D) zu beobachten (schwarze Pfeilspitzen). Die EM-Bilder wurden von Frau Dr. Gudrun Brandes (MHH, Abteilung Zellbiologie; Zentrum Anatomie) in Zusammenarbeit angefertigt.

3.4 Generierung einer PKC ι/λ *Knockout* /PKC ζ -cDNA *Knockin* Maus (*Rescue-Maus*)

Aufgrund des Nachweises einer funktionellen Redundanz von aPKCs in Säugerepithelzellen sowie aufgrund der Schwierigkeit, beide aPKC-Isoformen biochemisch zu unterscheiden (Joberty et al., 2000; Lin et al., 2000; Suzuki et al., 2001), wurde die Hypothese aufgestellt, dass funktionelle Unterschiede auf eine unterschiedliche Regulation der transkriptionellen Aktivität zurückzuführen sein könnten. Demnach wäre die embryonale Letalität der PKC ι/λ -defizienten Maus, die auch bei aPKC-*knockouts* in Invertebraten beobachtet wurde, dadurch bedingt, dass PKC ζ aufgrund seiner fehlenden oder zu geringen Expression zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung den Verlust des PKC ι/λ -Proteins nicht oder nur unzureichend kompensieren kann. Ob die in Säugerepithelzellen beschriebene Redundanz auch in der Embryogenese vorliegt, sollte geprüft werden, indem eine Mauslinie generiert wurde, bei der die PKC ζ -cDNA in den PKC ι/λ -Locus integriert und damit unter die Regulation durch den endogenen PKC ι/λ -Promotor gestellt wurde (PKC ι/λ *knockout* / PKC ζ *knockin*).

3.4.1 Klonierung der *Targeting*-Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei *Targeting*-Vektoren generiert. Beiden Vektoren ist gemein, dass ein Teil des PKC ι/λ -Gens zu Beginn des zweiten Exons deletiert und durch die cDNA von PKC ζ im fortlaufenden Leserahmen ersetzt wurde und so die PKC ζ -cDNA unter die Kontrolle des endogenen PKC ι/λ -Promotors gestellt wurde. Die Unterschiede der beiden *Targeting*-Vektoren bestehen darin, dass der Vektor **TV/tag** im Anschluss an die PKC ζ -cDNA die 3' untranslatierte Region des PKC ι/λ -Locus enthielt (3'UTR_i), um die Prozessierung der mRNA vom Zellkern in das Zytoplasma ebenfalls über die Regulation im PKC ι/λ -Lokus sicherzustellen. Für die Identifizierung des chimären PKC ι/λ - ζ -Fusionsproteins enthielt dieser *Targeting*-Vektor zusätzlich einen 6-fach Histidin-Marker direkt vor dem Stopcodon der PKC ζ -cDNA (Abb. 3.13 A). Der als **TV/GFP** bezeichnete *Targeting*-Vektor enthielt anstelle der 3'UTR_i ein als IRES-EGFP bezeichnetes Motiv (Internal Ribosomal Entry Site-Enhanced Green Fluorescent Protein), um die Lokalisation des exprimierten Proteins anhand der GFP-Fluoreszenz detektieren zu können. Ein 6x-Histidin-Marker wurde in diesem Konstrukt nicht verwendet (Abb. 3.13 B).

Als Ausgangskonstrukt für beide Vektoren diente ein von M. Leitges bereitgestelltes Plasmid, das ein 10530 bp umfassendes, mit *EcoRI/KpnI* kloniertes, genomisches DNA-Fragment mit dem Exon 2 und den flankierenden Intronsequenzen von PKC ι/λ enthielt. Für die Verwendung als Basisplasmid für die *Targeting*-Konstrukte wurde das zweite Exon mit kürzeren Sequenzarmen über einen *SpeI*-Restriktionsverdau herausgeschnitten und in den Vektor pBluescript subkloniert. Zunächst wurden die für die Klonierungsstrategie störenden Restriktionsschnittstellen für *SalI* und *SmaI* im Polylinker der Vektors zerstört und anschließend im Exon 2 des PKC ι/λ -Gens durch Mutagenisierung eine *SalI*-Schnittstelle (entspricht Position 199-204 der PKC ι/λ cDNA lt. NCBI Datenbank; NM_008857) eingeführt. Dadurch wurde im für die Genfusion relevanten Bereich die Aminosäure Isoleucin an Position 29 zu Methionin mutiert (siehe Abb. 3.12). Der genomische Bereich *downstream* dieser Schnittstelle wurde bis hinter die Spleiß-Akzeptor-Stelle des Intron 2 über einen *SalI/BglIII*-Verdau deletiert und durch ein synthetisches Adapterfragment ersetzt. Die in dem Adapter enthaltenen Restriktionsschnittstellen *SalI*, *SmaI* und *BglIII* dienten als Grundlage für die weiteren Klonierungsprozesse. Durch Mutagenisierungen an der PKC ζ -cDNA wurden Restriktionsschnittstellen für *SalI* und *SmaI* eingeführt und die Klonierung der PKC ζ -cDNA über diese Schnittstellen an das zum großen Teil deletierte zweite Exon von PKC ι/λ ermöglicht. Die eingeführte *SalI*-Schnittstelle in der PKC ζ -cDNA bewirkte eine Inversion der beiden Aminosäuren Threonin und Serin an den Positionen 28 und 29. Der Austausch von Isoleucin zu Methionin an Position 27 bleibt ohne Folgen für das Fusionsprotein, da diese Aminosäure *upstream* vom Fusionsbereich ist (siehe Abb. 3.12).

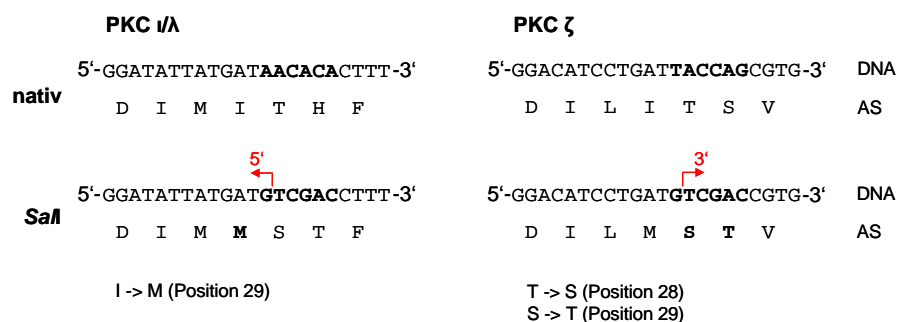


Abb. 3.12 Veränderungen der Aminosäuresequenz im Bereich des PKC ι/λ und ζ - Genfusion. Die Einführung der *SalI*-Schnittstelle (fett gedruckt), die den Leserahmen unbeeinflusst ließ, bewirkte den Austausch einer Aminosäure der 5'-gelegenen PKC ι/λ -Sequenz sowie zweier Aminosäuren in der 3'-gelegenen PKC ζ -Sequenz des chimären Fusionsproteins (rote Pfeile markieren die Sequenzbereiche der Fusion). Abkürzungen: AS, Aminosäuresequenz; I, Isoleucin; M, Methionin; S, Serin; T, Threonin.

Für die Generierung des *Targeting*-Vektors **TV/tag** erfolgte die anschließende Klonierung des 3'UTR_i über *BglIII/SmaI*-Restriktionsschnittstellen, die ebenfalls über Mutagenisierungen in der 3'UTR von PKC $\nu\lambda$ eingeführt worden waren. Die Fertigstellung des *Targeting*-Konstrukts für **TV/tag** wurde mit der *BamHI/BglIII*-Klonierung der Neomycin-Resistenzkassette im Anschluss an die 3'UTR_i abgeschlossen (Abb. 3.13).

Im Falle des *Targeting*-Vektors **TV/GFP** wurde hinter die PKC ζ -cDNA das IRES-EGFP-Fragment über *SmaI*-Restriktion eingeführt und ebenso wie bei **TV/tag** die Neomycin-Resistenzkassette über eine *BamHI/BglIII*-Klonierung angefügt (Abb. 3.13).

Abschließend erfolgte die Klonierung der beiden *Targeting*-Konstrukte in den Vektor **piotaEco11/-1.2Spe Δ Kpn**. Es handelt sich hierbei um das zu Beginn dargestellte Plasmid, wobei hier das native *SpeI*-Fragment des PKC $\nu\lambda$ -Locus' herausgeschnitten worden war. Über die *SpeI*-Schnittstelle wurden nun die jeweiligen *Targeting*-Konstrukte aus dem Basisplasmid einkloniert. Außerhalb des *SpeI*-Fragmentes enthält dieses Plasmid die 5' gelegenen 5330 bp umfassenden und die 3' gelegenen 4012 bp großen Intronsequenzen, die als Homologiesequenzen für eine erfolgreiche homologe Rekombination im PKC $\nu\lambda$ -Locus benötigt werden. Die korrekte Klonierung der beiden *Targeting*-Vektoren wurde vor der Transfektion in ES-Zellen anhand mehrfacher Restriktionsanalysen kontrolliert sowie sämtliche DNA-Bereiche (mit Ausnahme der Neomycin-Resistenzkassette) über Sequenzierung überprüft.

Eine schematische Übersicht der linearisierten *Targeting*-Vektoren und des genomischen Bereiches ist in Abb. 3.13 dargestellt.

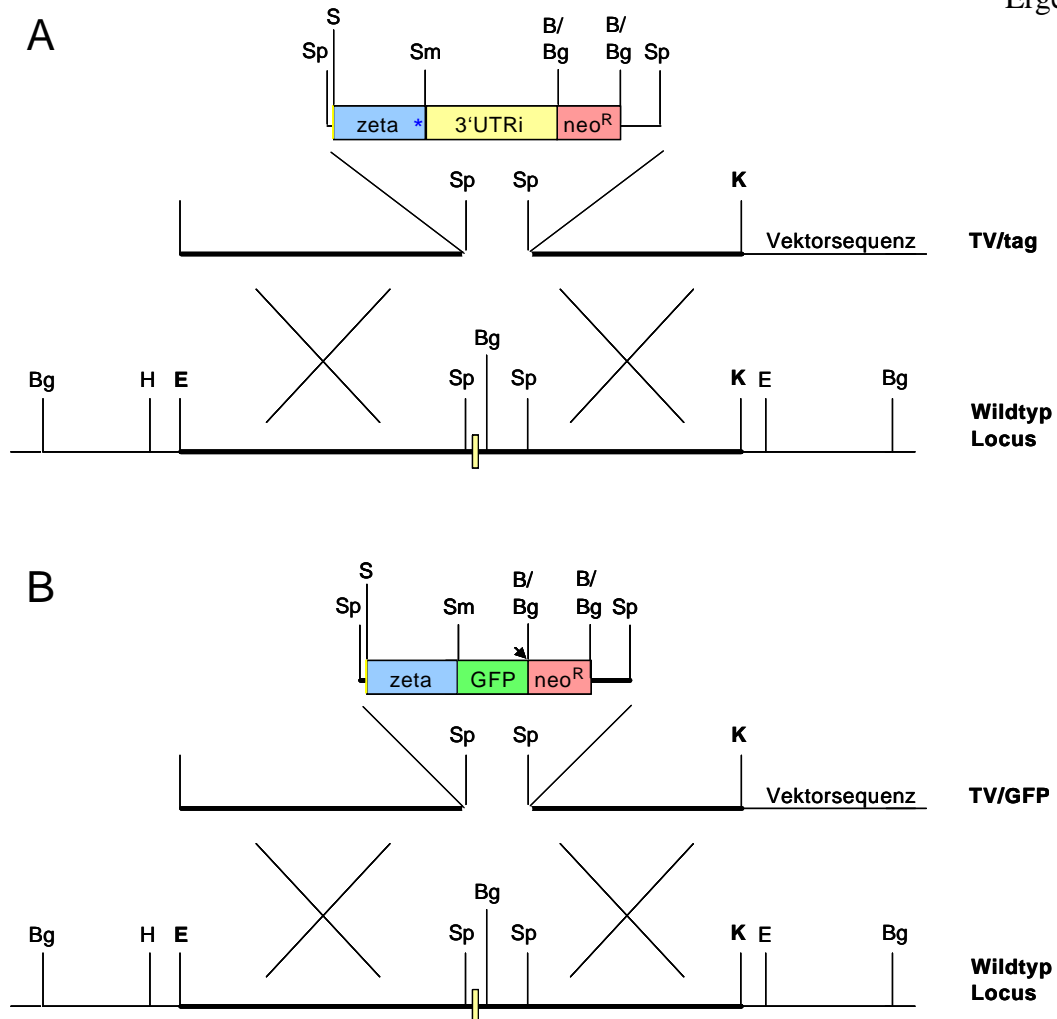


Abb. 3.13 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie. Die dicken Linien stellen den Bereich der *EcoRI/KpnI* klonierten *Targeting*-Vektoren dar. Die gelben Kästen entsprechen dem 2. Exon im PKC ι/λ -Locus bzw. der 3'UTR im *Targeting*-Vektor TV/tag. Nach der Deletion im Exon 2 von PKC ι/λ wurden in beiden *Targeting*-Konstrukten die PKC ζ -cDNA (blauer Kasten) *in frame* kloniert. Anstelle der 3'UTR wurde im *Targeting*-Vektor TV/GFP ein IRES-EGFP Motiv (grüner Kasten) eingefügt, das mit der PKC ι/λ - ζ Sequenz ein bicistronisches Reporterkonstrukt darstellt, das in der Lage ist, in Zellen die chimäre PKC ι/λ - ζ Expression unter der Kontrolle des PKC ι/λ -Promotors über die grüne GFP-Fluoreszenz indirekt zu lokalisieren. Beide *Targeting*-Vektoren enthalten zur positiven Selektion transfizierter ES-Zellen eine von loxP Sequenzen flankierte Neomycin-Resistenzkassette (roter Kasten). Abkürzungen: B, *BamHI*; Bg, *BgIII*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; S, *Sall*; Sm, *SmaI*; Sp, *SpeI*; *, 6 fach Histitin-tag; Pfeil, *blunt end* Klonierung.

3.4.2 Etablierung und Analyse der 4 ES-Zell-Linien mit zielgerichtetem *Rescue*-Allel

Für die Transfektion der *Targeting*-Vektoren in murine embryonale Stammzellen wurden zwei unterschiedliche ES-Zell-Linien verwendet. Bei der ersten Zell-Linie handelt es sich um von aus 129/Sv x 129/Sv-CP hervorgegangenen Blastozysten abgeleitete RI-Wildtyp-ES-Zellen (**PKC $\nu/\lambda^{+/+}$**). Als zweite Zell-Linie wurden E14 ES-Zellen verwendet, die nahezu isogen mit dem genomischen Hintergrund von 129 SvJ Mäusen sind. Letztgenannte ES-Zell-Linie ist heterozygot für eine *EcoRV/BglIII*-Deletion im PKC ν/λ -Locus, was durch den Verlust des zweiten Exons eine PKC ν/λ -Defizienz in diesem Allel (**PKC $\nu/\lambda^{+/t\Delta}$**) zu Folge hat (Bandyopadhyay et al., 2004).

Insgesamt wurden so vier ES-Zell-Linien mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund etabliert. Durch die Transfektion mit je einem der beiden linearisierten *Targeting* Vektoren in **PKC $\nu/\lambda^{+/+}$** ES-Zellen wurden zwei ES-Zell-Linien generiert, die heterozygot für das Rescue Allel (**PKC $\nu/\lambda^{+/rescue}$**) waren. Diese enthielten in Abhängigkeit von den transfizierten *Targeting* Vektoren die Bezeichnung **+/*rescue_tag*** (für TV/tag) bzw. **+/*rescue_GFP*** (für TV/GFP).

Die beiden weiteren ES-Zell-Linien gingen aus der Transfektion der ES-Zell-Linie **PKC $\nu/\lambda^{+/t\Delta}$** mit den beiden *Targeting*-Vektoren hervor. Ziel war es, ES-Zell-Klone zu identifizieren, die auf beiden Allelen defizient für PKC ν/λ sind, wobei ein Allel das *Rescue*-Allel darstellt. Um dies zu gewährleisten, musste der jeweilige *Targeting*-Vektor in das Wildtyp-Allel homolog rekombiniert werden. Diese ES-Zell-Linien wurden als **$\nu\Delta$ /*rescue_tag*** (für TV/tag) bzw. **$\nu\Delta$ /*rescue_GFP*** für (für TV/GFP) bezeichnet.

Stabil transfizierte ES-Zellen wurden in Gegenwart von G418 selektiert, in 96 *Well*-Kulturschalen vereinzelt und mittels Southern Blot-Hybridisierung analysiert. Bei erfolgter homologer Rekombination konnte das mutante Allel anhand eines Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) identifiziert werden. Die zu erwartenden Fragmentlängen für den PKC ν/λ -Wildtyp-Locus wurden den Sequenzen der Celera-Datenbank entnommen. Für die *Rescue*-Allele der vier verschiedenen ES-Zell-Linien ergaben sich die im folgenden dargestellten unterschiedlichen RFLPs.

Für die Etablierung der ES-Zell-Linie **+/*rescue_tag*** wurde die DNA nach einem *EcoRI*-Verdau mit einer außerhalb des *Targeting*-Vektors gelegenen 3'-Sonde (3'Kpn probe) hybridisiert. Im mutanten *Rescue*-Allel verkleinerte sich das Wildtypfragment durch die zusätzliche Restriktionsschnittstelle am Ende der Neomycin-Resistenzkassette von 10,936 kb auf 5,125 kb (Tab. 3.2 und Abb. 3.14). Insgesamt konnte obiger RFLP in transfizierten ES-Zell-Klonen mit einer Frequenz von 1:3 nachgewiesen werden. Für eine weitere

Charakterisierung wurden 13 Klone expandiert, wobei hier exemplarisch nur die beiden ES-Zell-Klone (Nr. 7 und 9) dargestellt sind, die für die Etablierung der mutanten Mauslinie mit dem *Rescue*-Allel verwendet wurden. Um die Integrität des 5'-Bereichs der rekombinierenden Arme zu überprüfen, wurde der RFLP nach *Bgl*III-Verdau mit einer 5'Hind-Sonde (5'Hind) überprüft. Durch das Fehlen einer *Bgl*III-Schnittstelle wurde für das *Rescue* Allel ein Fragment von 15,280 kb im Vergleich zu dem 8,406 kb großen Fragment für das Wildtyp Allel erwartet. Als interne Kontrolle diente nach einem *Bam*HI-Verdau eine Sonde (Neo) zur Identifizierung des Neomycin-Resistenzgens, um mehrfache Integrationen sichtbar zu machen. Hierbei wurde ein Fragment in der Größe von 4,845 kb identifiziert und bestätigte bei den dargestellten Klonen Nr. 7 und 9 die gezielte Mutation im PKC ν/λ -Locus (Tab. 3.2 und Abb. 3.14).

Zur Charakterisierung der anderen ES-Zell-Linien wurden die gleichen Sonden und RFLPs verwendet. Für die Etablierung der ES-Zell-Linie $\nu\Delta$ /*rescue_tag* wurde der korrekte RFLP *Eco*RI mit einer Häufigkeit von 1:20 identifiziert. Bei den selektierten Klonen Nr. 85 und 92 wurden die gewünschten Fragmente in der Größe von 3,230 kb für das PKC ν/λ -defiziente Allel und 5,125 kb für das *Rescue*-Allel detektiert. Somit waren diese positiven Klone auf beiden Allelen defizient für PKC ν/λ . Im Gegensatz dazu wurde bei den Klonen Nr. 27 und 45 der *Targeting*-Vektor TV/tag in das PKC ν/λ -defiziente Allel homolog rekombiniert, so dass diese Klone neben dem *Rescue*-Allel noch das Wildtyp-Allel enthielten und für die Etablierung dieser ES-Zell-Linie nicht in Frage kamen. Die Überprüfung aller vier Klone durch den RFLP nach *Bgl*III-Verdau mit den erwarteten Fragmentgrößen von 15,280 kb für das *Rescue*-Allel und 10,375 für das PKC ν/λ -defiziente Allel bestätigte dieses Ergebnis. Das im Vergleich zum Wildtyp-Allel (8,406 kb) größere Fragment für die PKC ν/λ -Defizienz (10,375 kb) im *Bgl*III-Verdau resultiert aus dem Verlust einer *Bgl*III-Schnittstelle, so dass eine weiter 3' lokalisierte *Bgl*III-Stelle für die Fragmentgröße verantwortlich war. Bei allen dargestellten Klonen dieser ES-Zell-Linie wurde der *Targeting*-Vektor nur einmal integriert, was durch das 4,845 kb große Fragment mit Hilfe der internen Neo-Sonde sichtbar gemacht werden konnte (Tab. 3.2 und Abb. 3.15).

Für die Etablierung der ES-Zell-Linie ν /*rescue_GFP* wurde der *Targeting*-Vektor TV/GFP mit einer Frequenz von 1:3 homolog rekombiniert. Bei allen exemplarisch dargestellten Klonen Nr. 3, 8, 10, 14 und 29 (Abb. 3.15) konnten die beiden RFLPs nach *Eco*RI- und *Bgl*III-Verdau korrekt nachgewiesen werden. Allerdings betrug die errechnete Fragmentgröße für das *Rescue*-Allel im *Eco*RI-Verdau durch das im Vergleich zur 3'UTR von PKC ν/λ kleinere IRES-EGFP-Motiv im *Targeting*-Vektor TV/GFP in diesem Fall 14,358 kb (Tab. 3.2 und

Abb. 3.15), wobei der Größenunterschied von 922 bp durch die schwierigere Separierung großer Fragmente im Agarosegel nicht unmittelbar im Blot abgebildet werden konnte. Die Überprüfung mit der internen Sonde ergab für den Klon Nr. 3 ein multiples Bandenmuster, so dass dieser Klon für die Etablierung dieser ES-Zell-Linie nicht verwendet wurde. Alle anderen Klone zeigten nur ein Fragment mit einer Größe von 3,718 kb (Tab. 3.2 und Abb. 3.15).

Bei der ES-Zell-Linie **$\iota\Delta$ /rescue_GFP** wurde der *Targeting*-Vektor TV/GFP mit einer Häufigkeit von 1:20 integriert. Von den beispielhaft dargestellten Klonen wiesen nur die Klone Nr. 22 und 27 für das *Rescue*- wie für das PKC ι/λ -defiziente Allel die erwarteten RFLPs auf. Klon Nr. 41 kam aufgrund der nicht gewünschten Rekombination des *Targeting*-Vektors in das PKC ι/λ -defiziente Allel für diese ES-Zell-Linie nicht in Frage. Bei Klon Nr. 11 fand kein Rekombinationsereignis im PKC ι/λ -Locus statt, jedoch waren über den Nachweis mit der internen Sonde Mehrfachintegrationen an weiteren Positionen des Genoms erkennbar (Tab. 3.2 und Abb. 3.15).

Tab. 3.2 Beschreibung der vier generierten ES-Zell-Linien und ihrer RFLPs in der Southern-Analyse.

ES-Zell-Linie	<i>EcoRI</i> [kb] 3'	<i>BglII</i> [kb] 5'	<i>BamHI</i> [kb] Neo	Charakteristik
+/rescue_tag	10,936 (wt) 5,125 (<i>rescue</i>)	8,406 (wt) 15,280 (<i>rescue</i>)	4,845 (<i>Rescue</i> -Allel)	heterozygot für <i>Rescue</i> -Allel
$\iota\Delta$/rescue_tag	3,230 ($\iota\Delta$) 5,125 (<i>rescue</i>)	10,375 ($\iota\Delta$) 15,280 (<i>rescue</i>)	4,845 (<i>Rescue</i> -Allel)	PKC ι defizient mit <i>Rescue</i> -Allel
+/rescue_GFP	10,936 (wt) 5,125 (<i>rescue</i>)	8,406 (wt) 14,358 (<i>rescue</i>)	3,718 (<i>Rescue</i> -Allel)	heterozygot für <i>Rescue</i> -Allel
$\iota\Delta$/rescue_GFP	3,230 ($\iota\Delta$) 5,125 (<i>rescue</i>)	10,375 ($\iota\Delta$) 14,358 (<i>rescue</i>)	3,718 (<i>Rescue</i> -Allel)	PKC ι defizient mit <i>Rescue</i> -Allel

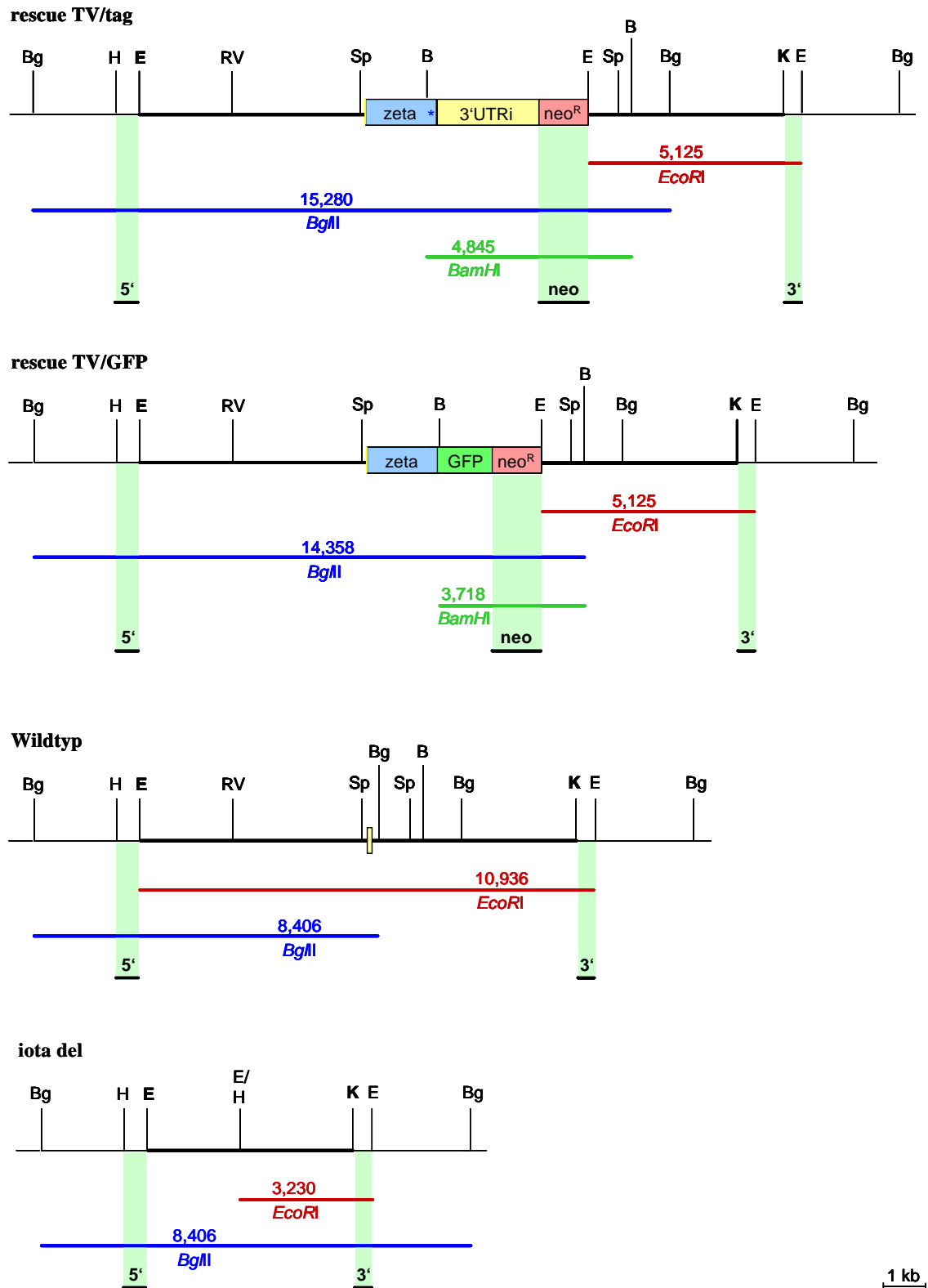


Abb. 3.14 Schematische Darstellung der Southern Blot-Analyse der vier ES-Zell-Linien. Das Wildtyp-Allel sowie die beiden mutanten Allele sind wie in **Abb. 3.13** skizziert. Zusätzlich sind die RFLPs für das PKC $\nu\lambda$ -defiziente Allel (iota del) beschrieben. Die hellgrün unterlegten Bereiche kennzeichnen die Hybridisierungsregionen der jeweiligen Sonden. Abkürzungen: B, *BamHI*; Bg, *BglII*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; RV, *EcoRV*; Sp, *SpeI*.

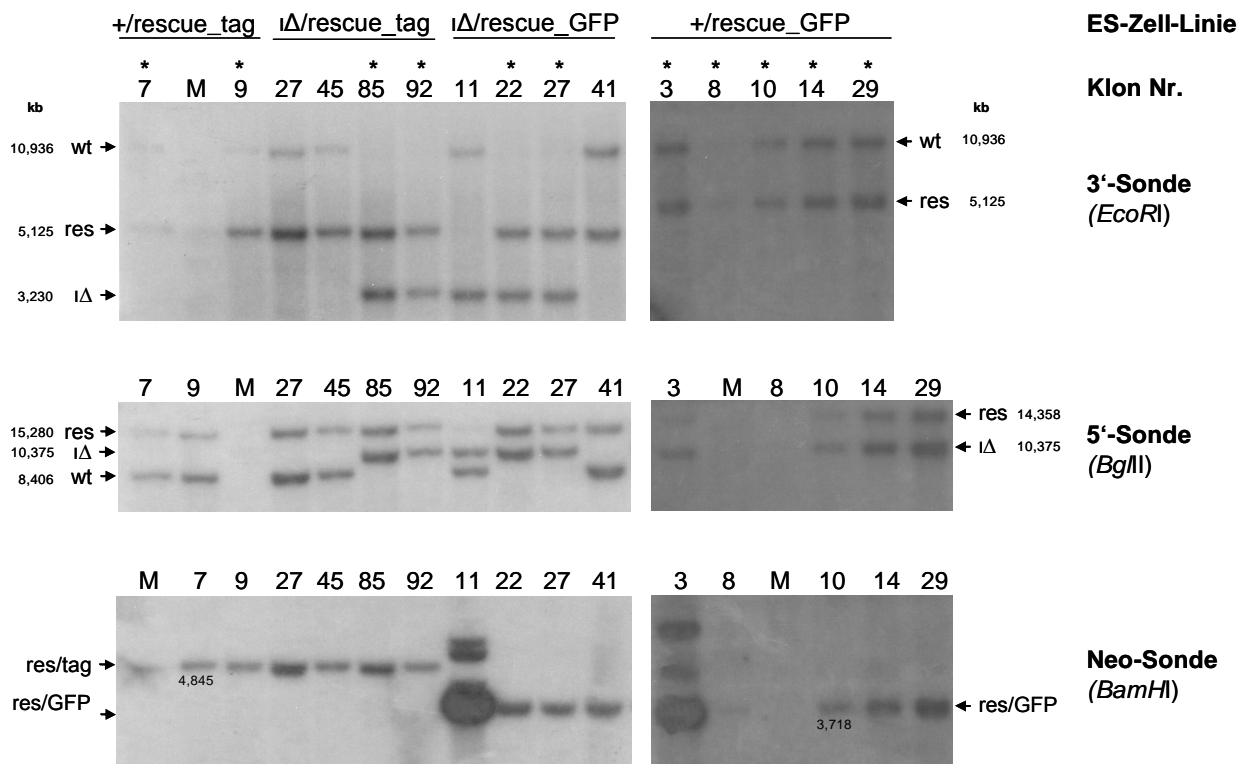


Abb. 3.15 Southern Blot Analyse von ES-Zell-Klonen. Für die Überprüfung der korrekten Integration der jeweiligen *Targeting*-Vektoren wurde die DNA von stabil transfizierten ES-Zell-Klonen mit den Enzymen *EcoRI*, *BglII* oder *BamHI* verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf einer Nylonmembran immobilisiert und mit den Sonden 3', 5' und Neo hybridisiert. Die resultierenden Banden korrespondieren mit den in **Tabelle 3.2** und **Abb. 3.13** dargestellten Fragmentgrößen für die verschiedenen ES-Zell-Linien. Die positiven Klone mit korrektem Bandenmuster aus jeder Zell-Linie sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Abkürzungen: Δ , PKC ν/λ -defizientes Allel; M, Marker; res, *rescue*-Allel; res/GFP, Fragmentgröße bei der Verwendung der internen Neo-Sonde für den *Targeting*-Vektor TV/GFP; res/tag, Fragmentgröße bei der Verwendung der internen Neo-Sonde für den *Targeting*-Vektor TV/tag; wt, Wildtyp-Allel.

Zum Nachweis der Expression des chimären PKC ν/ζ -Proteins wurden Extrakte ausgewählter Klone, die mit dem *Targeting* Vektor TV/tag transfiziert worden waren, durch eine Western-Analyse mit einem Antikörper gegen den eingeführten 6-fach Histidin-Marker überprüft. Bei allen getesteten Klonen beider Zell-Linien, Nr. 7 und 9 der ES-Zell-Linie **+/rescue_tag** und Nr. 27, 45, 85 und 92 der ES-Zell-Linie **Δ /rescue_tag**, wurde ein Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 70 kDa nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten Proteinextrakte der ES-Zell-Linie RI und I5 (Wildtyp), sowie II36 (PKC $\nu/\lambda^{-/-}$), in denen keine Signale zu detektieren waren. Zur Verifizierung der korrekten Laufhöhe des chimären PKC ν/λ - ζ Proteins im Blot wurden bei allen Zell-Klonen durch Verwendung eines Antikörpers, der beide α PKC Isoformen erkennt, Signale in Höhe des putativen Molekulargewichts zwischen 67,2 (PKC ν) und 67,7 kDa (PKC ζ) identifiziert (**Abb. 3.16**).

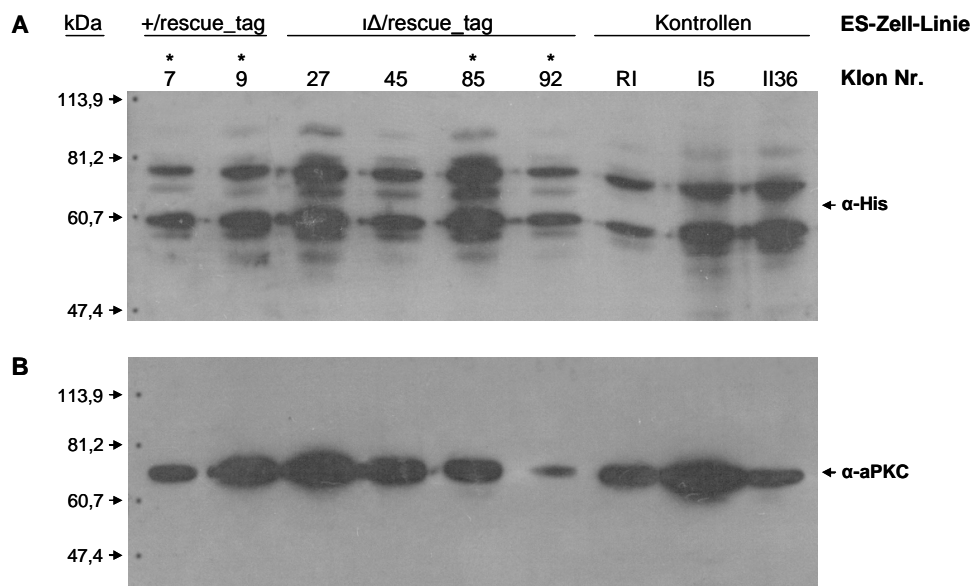


Abb. 3.16 Expression des chimären PKC ι/λ - ζ -Proteins in Klonen der ES-Zell-Linien +/rescue_tag und Δ /rescue_tag. (A) Über den 6-fach Histidin-tag konnte das Protein (68,5 kDa) in allen rekombinanten ES-Zell-Klonen nachgewiesen werden. Die im Southern Blot positiv selektierten Klone sind mit einem Stern (*) markiert. Bei den Klonen Nr. 27 und 45 war die Integration des Targeting-Vektors TV/tag unerwünschterweise in das PKC ι/λ -defiziente Allel erfolgt, was die Proteinexpression nicht beeinflusste. Als Negativ-Kontrollen wurden zwei Wildtyp-ES-Zell-Linien (RI und I5) und eine PKC ι/λ -defizientes Zell-Linie (II36) verwendet. Die Banden bei 60 und 80 kDa stellen unspezifische Signale in ES-Zell-Proteinextrakten dar. (B) In allen dargestellten ES-Zell-Klonen wurden mit Hilfe eines Antikörpers, der beide aPKC-Isoformen erkennt, Signale identifiziert (67,2-67,7 kDa), was zur Verifizierung der korrekten Laufhöhe des chimären PKC ι/λ - ζ -Proteins herangezogen wurde. Abkürzungen: α -aPKC, Antikörper gegen beide aPKC-Isoformen; α -His, Antikörper gegen den 6-fach Histidin-tag im Targeting-Vektor TV/tag.

Die Proteinexpression der mit dem Targeting-Vektor TV/GFP transfizierten ES-Zell-Klone konnte indirekt anhand der GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Am Beispiel von Klon Nr. 10 der ES-Zell-Linie +/rescue_GFP konnte nach dem Expandieren der Zellen auf Glasplatten die grüne Fluoreszenz im zellulären Zytoplasma sichtbar gemacht werden (Abb. 3.17).

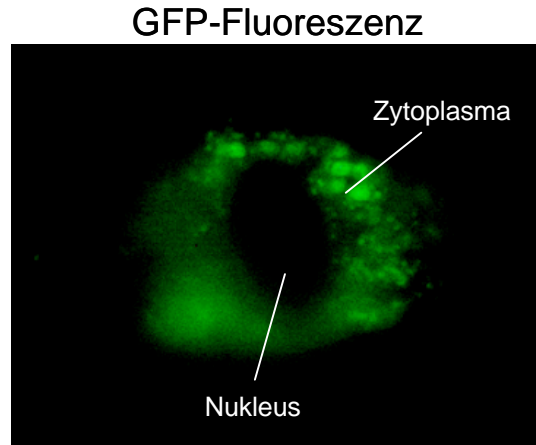


Abb. 3.17 Expression des chimären PKC ν/λ - ζ -Proteins der ES-Zell-Linie $+/rescue_GFP$. Der Proteinnachweis erfolgte indirekt über die zytoplasmatische GFP-Fluoreszenz des im Anschluss an das PKC ν/λ - ζ -Fusionsgen klonierten GFP-Gens im *Targeting*-Vektor TV/GFP. Abkürzung: GFP, grünes fluoreszierendes Protein.

3.4.3 Etablierung und Zucht der mutanten Mauslinie

Die Blastozysteninjektion mit den ES-Zell-Klonen Nr. 7 und 9 der generierten ES-Zell-Linie $+/rescue_tag$ und die Gewinnung chimärer Tiere wurde nach Standardprotokollen am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt (Robertson, 1987; Tesar, 2005). Bei insgesamt drei chimären Männchen, die mit Wildtyp-C57BL/6J-Weibchen verpaart wurden, konnte eine Keimbahntransmission mit der gezielten Mutation nachgewiesen werden. Nachkommen mit durchgehend rotbrauner Fellfarbe wurden mittels PCR genotypisiert. Für insgesamt 17 heterozygote Nachkommen wurde die Transmission über eine Southern Blot-Analyse verifiziert (Daten nicht gezeigt), die wie für die Charakterisierung der ES-Zell-Linien beschrieben durchgeführt wurde (Kapitel 3.4.2). Die heterozygoten Tiere aus der Filialgeneration wurden als Gründertiere (*Founder*) für die weitere Zucht und die nachfolgenden Experimente verwendet.

Zusätzlich wurde eine Mauslinie generiert, bei der die Neomycinresistenz-Kassette aus dem mutanten Allel über die Kreuzung mit einem konstitutiv Cre-Rekombinase exprimierenden C57BL/6-Weibchen (*Deleter*) entfernt wurde. Anschließend wurde das Cre-Gen durch Verpaarung mit für das Cre-Gen heterozygoten Tieren wieder ausgekreuzt. Mit dieser Mauslinie wurden im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr gearbeitet.

3.5 Untersuchung des Phänotyps der PKC ι/λ *Knockout* /PKC ζ cDNA *Knockin*-Maus (*Rescue*-Maus)

3.5.1 Untersuchungen während der Embryogenese

Um zu überprüfen, ob die beiden atypischen PKCs während der Embryogenese funktionell redundant sind und so der embryonal letale Phänotyp der PKC ι/λ -defizienten Maus durch die Insertion des PKC ζ -Gens kompensiert werden kann, wurden Embryonen verschiedener Embryonalstadien präpariert, die aus Heterozygotenverpaarungen hervorgegangen waren. Die Genotypen wurden mittels PCR bestimmt und morphologisch analysiert.

Bei allen für das *Rescue*-Allel homozygoten Embryonen an dem für die PKC ι/λ -Defizienz kritischen Embryonaltag E7.5 wurde im Vergleich zu den Wildtyp- und heterozygoten Embryonen eine normale Morphologie des äußerlich sichtbaren Phänotyps beobachtet. Diese Beobachtung wiederholte sich in den Stadien E8.5, E10.5, E14.5 und E18.5. Eine statistische Auswertung der Genotyp-Verteilung ergab keine signifikanten Abweichungen von der erwarteten Verteilung (1:2:1) über die gesamte Embryogenese (Tab. 3.3). Die *Rescue*-Maus ist somit embryonal überlebensfähig.

Tab. 3.3 Genotypen-Häufigkeiten embryonaler Nachkommen aus Heterozygotenverpaarungen der *Rescue*-Maus.

E-Stadium	Gesamt	(%)	Wildtyp	(%)	res hetero	(%)	res homo	(%)
E7.5	47	(100)	8	(17)	28	(59.6)	11	(23.4)
E8.5	11	(100)	1	(9.1)	7	(63.6)	3	(27.3)
E10.5	8	(100)	2	(25)	4	(50)	2	(25)
E14.5	77	(100)	18	(23.4)	42	(54.5)	17	(22.1)
E18.5	26	(100)	9	(34.6)	9	(34.6)	8	(30.8)

3.5.2 Statistische Verteilung bei juvenilen Nachkommen

Für die statistische Analyse der Genotypenverteilung nach der Geburt wurden Nachkommen aus Heterozygotenverpaarungen im Alter von 4 Wochen genotypisiert. Von insgesamt 387 untersuchten Tieren wurden 63,3 % heterozygote (245) und 35,7 % Wildtyp-Tiere (138) identifiziert. Nur vier homozygote Tiere konnten identifiziert werden (1%). Ein Männchen mit äußerlich unauffälligem Phänotyp starb am postnatalen Tag P32. Ein im Phänotyp normal

erscheinendes weibliches Tier verstarb im Alter von 14 Wochen ebenfalls aus ungeklärter Ursache.

Ein weiteres, in dieser Statistik nicht aufgeführtes homozygotes weibliches Tier starb 3 Wochen nach der Geburt (P20). Es wirkte schwach, war im Gegensatz zum Wildtyp deutlich kleiner und hatte eine Vergrößerung der frontalen Schädelregion. Neben der generellen Bewegungsarmut, die auch auf eventuelle Schmerzen hindeutete, wurden Anomalien in der Motorik festgestellt. Im Vergleich zu der gegengleichen Fortbewegungsart der Vorder- und Hinterläufe beim Wildtyp stellte das homozygote Tier zuerst die Vorderläufe parallel auf und nachfolgend die Hinterläufe (hüpfend). Zusätzlich konnten die Zehen nicht vollständig ausgestreckt werden.

3.5.3 Analyse der neonatalen Nachkommen

Bei insgesamt 32 untersuchten neugeborenen Mäusen wurden gemäß der Mendelschen Verteilung 50 % heterozygote (16), 28 % Wildtyp- (9) und 22 % homozygote Tiere (7) festgestellt. Aufgrund der geringen Überlebensrate bei den juvenilen Nachkommen wurde die Überlebenszeit von 13 Neugeborenen zweier Würfe über einen Zeitraum von 38,5 h postnatal per Videokamera überwacht. Alle Tiere lebten zunächst, wurden von den Müttern gesäugt und ließen keine äußerlich sichtbaren Anomalien erkennen. Alle Wildtyp- und heterozygoten Nachkommen überlebten den Beobachtungszeitraum, während alle (fünf) homozygoten Nachkommen innerhalb von 38,5 h gestorben waren (nach 2,5; 7; 23; 32 und 38,5 h) (Abb. 3.18). Die mittlere Überlebenszeit betrug 23 h.

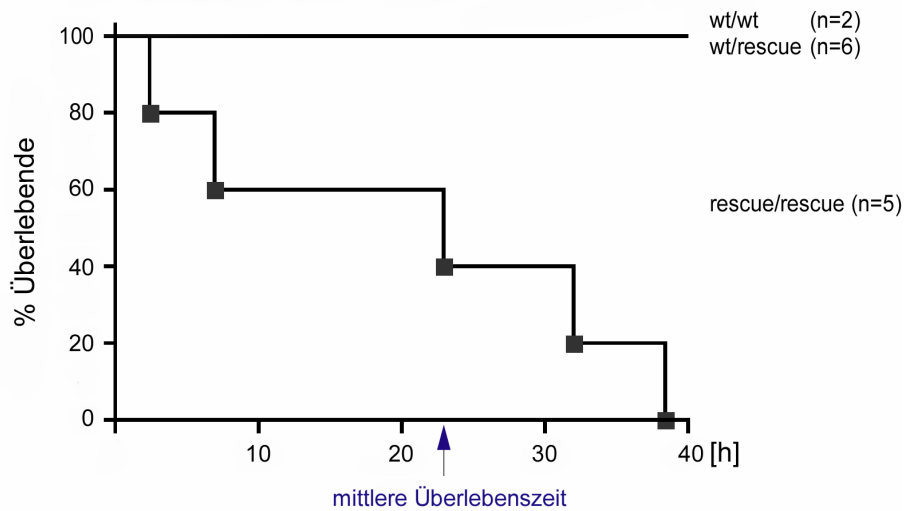


Abb. 3.18 Überlebenskurve zweier Würfe doppelheterozygoter Verpaarungen. Während alle Wildtyp- und heterozygoten Nachkommen überlebten, starben alle 5 homozygoten Neugeborenen innerhalb der ersten 2 Lebenstage. Die mittlere Überlebenszeit betrug dabei 23 h.

3.5.4 Anomalien bei adulten Homozygoten

Nur zwei homozygote, in der phänotypischen Erscheinung zunächst völlig normale, Tiere (ein Männchen und ein Weibchen) erreichten das fortpflanzungsfähige Alter. Im Alter von vier Wochen zeigten sie ein normales Fress- und Sozialverhalten. Bereits im Alter von 9 Wochen postnatal wurde eine Veränderung im Bewegungsablauf beobachtet. Im Fußabdruck-Test konnte neben der normalen Fortbewegungsart, bei der die Vorder- und Hinterläufe gegengleich aufgestellt werden, erste Anzeichen einer hüpfenden Laufbewegung festgestellt werden (s.o.). Im Alter von 6 bis 7 Monaten wurden jeweils die Vorder- und Hinterläufe ausschließlich parallel aufgesetzt (Abb. 3.19 und 3.20). Dies ging in zunehmendem Maße mit einem generellen Mangel an Bewegung einher. Das Weibchen war fertil und hat in der Verpaarung mit einem heterozygoten Männchen insgesamt 3 Würfe mit jeweils drei Nachkommen hervorgebracht. Aussagen über diese Nachkommen und ihren Genotyp konnten nicht gemacht werden, da die Neugeborenen kurz nach der Geburt starben. Das mit heterozygoten Weibchen verpaarte Männchen hat keine Nachkommen gezeugt. Sein Fertilitätsstatus ist nicht geklärt.

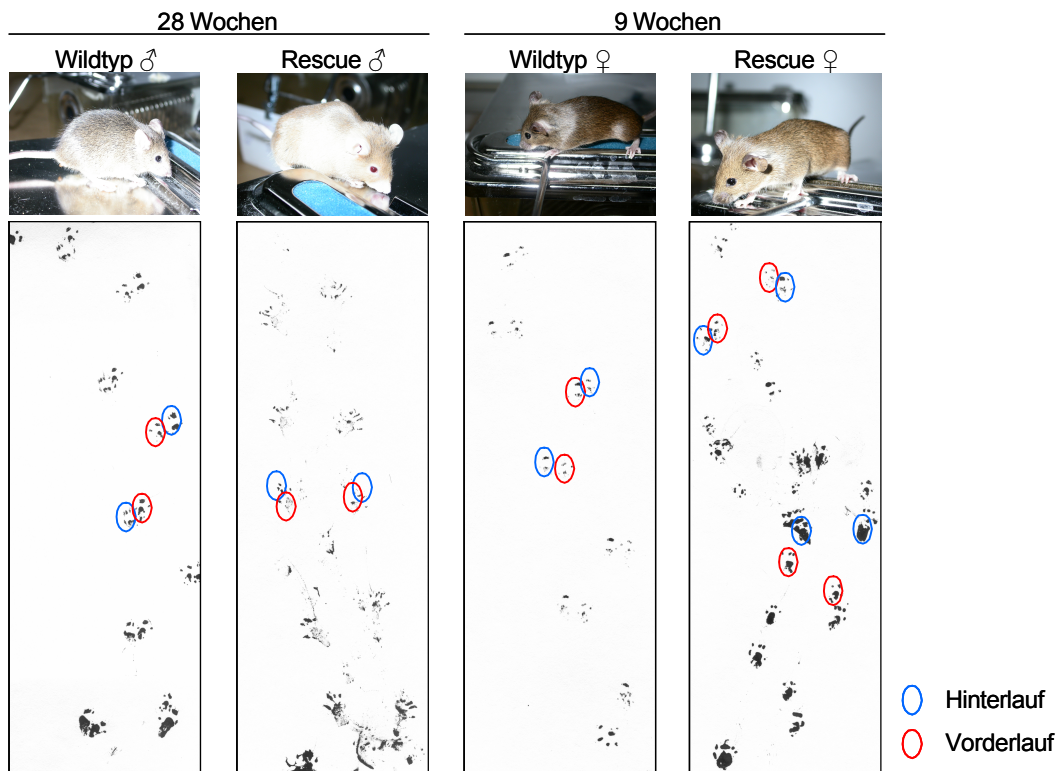


Abb. 3.19 Fußabdrücke der beiden homozygoten adulten Nachkommen im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern. Bei den Wildtyp-Tieren (♂ und ♀) wurden beim Laufen die Vorder- und Hinterläufe gegengleich aufgestellt. Beim homozygoten Männchen (28 Wochen alt) war die abnorme Laufbewegung voll entwickelt. Die Vorder- und Hinterläufe wurden parallel aufgesetzt bzw. nachgestellt. Das 9 Wochen alte Weibchen wies sowohl die normale als auch die abnorme Fortbewegungsart auf, die sich später aber voll manifestierte.

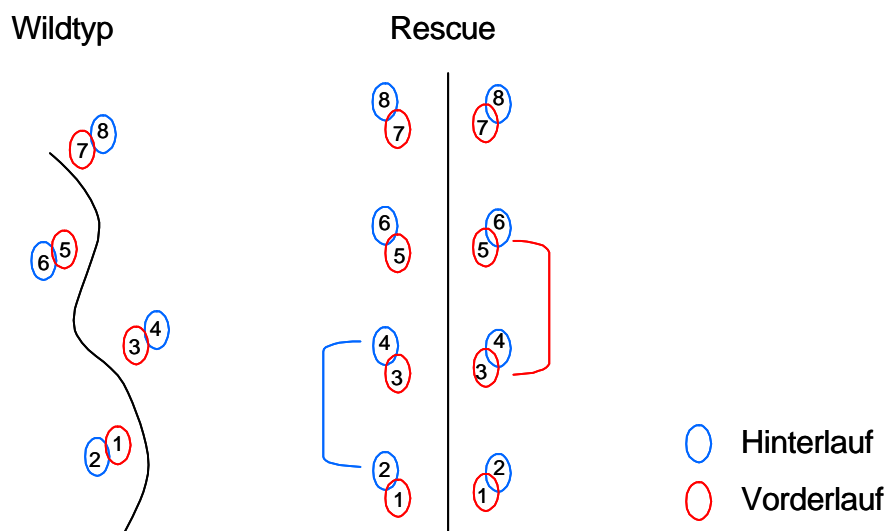


Abb. 3.20 Schematische Darstellung der Fußabdrücke adulter Tiere. Die Nummern kennzeichnen die Reihenfolge der aufgesetzten Vorder- bzw. Hinterläufe.

4 Diskussion

Obwohl die beiden atypischen Protein Kinase C-Isoformen PKC ι/λ und ζ an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt sind, existieren nur unzureichende Kenntnisse hinsichtlich ihrer spezifischen *in vivo*-Funktionen. Erste Hinweise auf spezifische Funktionen wurden durch die Generierung von aPKC-*knockout*-Mäusen erbracht, die zu deutlich unterschiedlichen Phänotypen führten (Leitges et al., 2001; Bandyopadhyay et al., 2004; Soloff et al., 2004). Auf der anderen Seite konnten den strukturell sehr homologen aPKC-Isoformen bislang keine Unterschiede in ihren biochemischen Eigenschaften nachgewiesen werden (Überall et al., 1999; Diaz-Meco and Moscat, 2001). Darüber hinaus deuten zahlreiche Überexpressionsstudien in Säugerzellen darauf hin, dass beide aPKC-Isoformen sich insbesondere bei der Regulierung der epithelalen Zellpolarität gegenseitig funktionell substituieren können (Tabuse et al., 1998; Yamanaka et al., 2003). Im lebenden Organismus setzt diese funktionelle Redundanz allerdings voraus, dass beide Isoformen im gleichen Gewebetyp exprimiert sind.

Um Kenntnisse hinsichtlich ihres möglichen Zusammenwirkens innerhalb eines bestimmten Zell- oder Gewebetyps *in vivo* zu erhalten, wurde die spatio-temporale Expression der aPKC-Isoformen während der Embryonalentwicklung der Maus untersucht. Nach Untersuchungen zur Charakterisierung des embryonal letalen Phänotyps der PKC ι/λ -defizienten Maus konnte über die Analyse der generierten PKC ι/λ *knockout* /PKC ζ -cDNA *knockin* -Mauslinie gezeigt werden, dass die embryonale Sterblichkeit in der PKC ι/λ -Defizienz durch das funktionell-redundante Zusammenwirken der aPKC-Isoformen aufgehoben werden kann.

4.1 Die Expression von PKC ι/λ und ζ in der Embryogenese der Maus

Die Analyse der Expression hat gezeigt, dass beide aPKC-Isoformen ein sehr unterschiedliches spatio-temporales Expressionsprofil während der Embryogenese der Maus aufweisen. Bemerkenswert dabei ist, dass sich das bei beiden Isoformen in den frühen Embryonalstadien festgestellte ubiquitäre Expressionsmuster um den Embryonaltag 12.5 in ein sehr differenziertes, aber komplexes Expressionsprofil übergeht. Dabei ist festzustellen, dass PKC ι/λ während der gesamten Embryonalentwicklung die vorherrschend exprimierte aPKC-Isoform darstellt, während die Transkription von PKC ζ im Vergleich zu PKC ι/λ an allen untersuchten Embryonalstadien schwächer ausfällt.

PKC ν/λ und PKC ζ verfügen in den frühen Stadien E7.5 bis E10.5 über ein überlappendes Expressionsprofil, wobei beide Gene ubiquitär in allen Epithelien und Gewebetypen des sich entwickelnden Embryos exprimiert sind. Dabei wurde die über quantitative PCR ermittelte äußerst schwache PKC ζ -Expression auch auf Translationsebene durch Western Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen PKC ν/λ und ζ an den Embryonalstadien E8.5 und 9.5 bestätigt (Kapitel 3.2.1). In den späteren Stadien, von E12.5 bis E16.5, bleibt PKC ν/λ ebenfalls stark exprimiert, jedoch nimmt die mRNA-Gesamtkonzentration ab, wobei die Expression in bestimmten Gewebetypen eindeutiger abgegrenzt werden kann. Ab E12.5 wird die PKC ζ -Expression sehr spezifisch mit einer ausgeprägten Regionalisierung im Gehirn und Körper des Embryos. Die Unterscheidung spezifischer Expressionsdomänen wurde besonders am Embryonaltag E16.5 deutlich. Während PKC ν/λ weitläufig exprimiert ist, existiert eine transkriptionelle PKC ζ -Aktivität nur im olfaktorischen Epithel, in der Hypophyse, im *Choroid plexus*, in der Lunge, in den medullären Regionen der Niere und im Epithel des Darms. Im Gegensatz dazu ist PKC ν/λ weder im *Choroid plexus* noch in der Hypophyse exprimiert. Eine epidermale Expression wurde nur für PKC ν/λ gefunden (siehe Kapitel 3.2.4). Passend dazu konnte auch nur für PKC ν/λ eine Bedeutung in der TJ-Bildung nachgewiesen werden (Judith A Tunggal, 2005). Für beide Isoformen konnten ebenfalls unterschiedliche Funktionen in der Lunge zugeordnet werden. So ist PKC ν/λ über den Ras/Rac-Signalweg an der Entstehung von Tumoren bei der Maus und beim Menschen beteiligt (Murray et al., 2004; Regala et al., 2005), PKC ζ dagegen ist in die Jak1/Stat6 regulierte Asthmaentwicklung involviert (Martin et al., 2005). Die unterschiedliche Ausprägung in der Expression von PKC ν/λ and ζ zu den späteren Stadien der Embryonalentwicklung stimmt mit bereits publizierten ISH-Analysen am Gehirn adulter Mäuse (Oster et al., 2004) sowie Northern Blot-Daten aus verschiedenen Geweben adulter Mäuse und Zell-Linien überein (Akimoto et al., 1994), liefert aber zusätzliche Details hinsichtlich der zellulären Expressionsdomänen.

Im Hinblick auf die wichtigen Funktionen der aPKCs in zahlreichen biologischen Prozessen während der Embryogenese, wie Zellproliferation und Zellüberleben (Diaz-Meco et al., 1996), Apoptose (Chang et al., 2002), epithelialer Polarisierung (Suzuki et al., 2001) und Zellmigration (Etienne-Manneville and Hall, 2001), können diese Daten eine Hilfestellung bei der Unterscheidung der spezifischen Beteiligung beider aPKC-Isoforms in definierten physiologischen Prozessen darstellen.

4.2 Der Einfluss von PKC ν/λ während der Gastrulation

Die Deletion des PKC ν/λ -Gens führt zu einer embryonalen Sterblichkeit in der sich entwickelnden Maus zum Zeitpunkt der Gastrulation (Bandyopadhyay et al., 2004; Soloff et al., 2004). Vorläufige Untersuchungen an in der Arbeitsgruppe Leitges generierten PKC ν/λ -defizienten Embryonen bestätigen diese frühe embryonale Letalität. Embryogenetische Defekte werden bereits um E7.0 herum beobachtet. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass durch Umklappen am anterioren Ende das embryonale Epithel zusammenhängend, aber abnormal mehrschichtig vorliegt. Eine apikale Orientierung des Epithels ist über die Präsenz der *tight junction*- (TJ) Komponente ZO-1 identifizierbar. Wichtige Musterbildungsgene sind im mutanten Embryo um E7.5-8.5 korrekt exprimiert und werden offensichtlich unabhängig von PKC ν/λ reguliert (M. Leitges, persönliche Mitteilung). Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse hat im Gegensatz zu obigen Untersuchungen gezeigt, dass die embryonalen Epithelzellen nicht fest miteinander verbunden sind. Stattdessen sind sie irregulär in der abnormal verkleinerten Amnionhöhle übereinandergeschichtet. In der elektronenmikroskopischen Analyse sind interzelluläre Kontakte und die selektive Barrierefunktion des embryonalen Epithels im PKC ν/λ -defizienten Embryo sowie eine epitheliale apiko-basale Zellpolarität nicht festzustellen. *Adherens junctions* (AJ), TJs und Desmosomen fehlen völlig. Weiterhin existiert keine klare Abgrenzung der irregulär abgerundeten Zellen des Ektoderms von denen des Mesoderms.

Der Phänotyp des PKC ν/λ -defizienten Embryos erinnert an den der aPKC-Defizienz in *D. melanogaster*, wo ebenfalls zum Zeitpunkt der Gastrulation die Entwicklung abbricht (Wodarz et al., 2000). Bei homozygoten *DaPKC*-defizienten Embryonen von heterozygoten Müttern wurde zudem eine abnormal vielschichtige Struktur des embryonalen Epithels sowie das Fehlen von *Zonula adherens*-Strukturen (AJ bei Vertebraten) und der apiko-basalen Membranpolarität beobachtet (Wodarz et al., 2000). Bei *C. elegans* wurde die weitere Embryonalentwicklung der Mutanten aufgrund von Polaritätsdefekten bereits vor der Epithelbildung gestoppt (Tabuse et al., 1998). Daneben konnte in zahlreichen Studien in Säugerepithelzellen die Beteiligung von aPKCs in der Bildung von TJs und bei der Etablierung epithelialer Zellpolarität über die Regulierung des ternären Par-6/aPKC/Par-3-Komplexes nachgewiesen werden (Joberty et al., 2000; Ohno, 2001; Suzuki et al., 2001; Yamanaka et al., 2001; Hirose et al., 2002; Wodarz, 2002; Henrique and Schweisguth, 2003; Hurd et al., 2003; Yamanaka et al., 2003).

Erste Untersuchungen des PKC ν/λ -defizienten Maus-Embryos deuteten darauf hin, dass in einem früheren Zeitpunkt der Embryonalentwicklung eine epithelartige Struktur ausgebildet

wird. Zusätzlich konnte die TJ-assoziierte Komponente ZO-1 an der apikalen Zellmembran identifiziert werden. Dies führte zu der Hypothese, dass TJs zwar gebildet werden, jedoch ihre physiologischen Funktion als selektive Barriere und zur Abdichtung des Epithels (Kovbasnjuk et al., 1998; Balda and Matter, 2000; Anderson, 2001; Tsukita et al., 2001) nicht mehr oder nur vermindert ausüben können. Der Verlust von membranständigen TJ-Komponenten führt zur Undichtigkeit des Epithels und bewirkt eine erhöhte permeable Diffusion löslicher Ionen durch die Membran (Van Itallie and Anderson, 2006). Für den PKC $\nu\lambda$ -defizienten Embryo würde das bedeuten, dass der Turgor in der Amnionhöhle durch die Durchlässigkeit des Epithels nicht mehr aufrechterhalten werden kann und somit die proliferierenden Epithelzellen des PKC $\nu\lambda$ -defizienten Embryos während der Gastrulation nicht apikalwärts wandern (Keller, 2005), sondern in der Amnionhöhle zu einer mehrschichtigen Epithelstruktur kollabieren.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in den untersuchten mutanten E7.5 Maus-Embryonen keinerlei durch AJs vermittelte Zellkontakte, keine TJs sowie keine Polarität der Zellmembran festgestellt werden konnten. Zur eindeutigen Klärung der Präsenz von epithelialer Zellpolarität und um den Einfluss von PKC $\nu\lambda$ auf die Etablierung der Zellpolarität näher zu definieren, sollten weiterführende Untersuchungen an früheren Embryonalstadien (um E6.0-7.0) der PKC $\nu\lambda$ -defizienten Maus durchgeführt werden. So kann festgestellt werden, an welchem Stadium die Störung auftritt und worin sie begründet liegt. Dabei sollte zunächst die Überprüfung des Epithels auf das Vorhandensein von AJs sowie TJ-bildenden Komponenten wie die membranständigen Occludine und Claudine (Furuse et al., 1993; Furuse et al., 1998) sowie die mit ihnen assoziierten peripheren Membranproteine ZO-1/2 (Stevenson et al., 1986; Anderson, 2001) über immunhistochemische Untersuchungen im Vordergrund stehen, um einen Hinweis auf eine mögliche Regulierung der Polaritäts-abhängigen Rekrutierung definierter TJ-Komponente zu erhalten. Begleitend dazu sollte die Epithelmorphologie und auf die Anwesenheit von AJs und Desmosomen geprüft werden.

Trotz der postulierten Rolle der aPKCs in der Regulierung von Proliferation und Apoptose (Berra et al., 1995; Bjorkoy et al., 1997) wurden keine Veränderungen in der Proliferationsfähigkeit oder zellapoptotische Prozesse im PKC $\nu\lambda$ -defizienten Embryo nachgewiesen. Diese Prozesse können deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit als Ursache für die embryogenetischen Defekte ausgeschlossen werden.

4.3 Die PKC ι/λ *knockout*/PKC ζ -cDNA *knockin*-Maus (*Rescue*-Maus)

Bislang konnten für die aPKC-Isoformen keine biochemischen Unterschiede sowie Unterschiede in der Regulierung von Zellpolarität in Epithelzellen nachgewiesen werden (Joberty et al., 2000; Lin et al., 2000; Suzuki et al., 2001). Weitere Indizien für eine funktionelle Austauschbarkeit wurden auch in der Regulation der Zellproliferation sowie der Polymerisierung des Aktin-Zytoskeletts gezeigt (Überall et al., 1999; Diaz-Meco and Moscat, 2001). Für verschiedene biologische Prozesse, wie beispielsweise in der Embryogenese, der Hämatopoese sowie bei verschiedenen neurobiologischen Prozessen wurde ein funktionell-redundanter Regulationsmechanismus für verschiedene Gene bereits nachgewiesen (Wang et al., 1996; De Franceschi et al., 1997; Grifman et al., 1998; Sacher, 2004). Im Fall der Inaktivierung eines von zwei redundant wirkenden Genen übt dies keinen oder nur einen geringen Effekt auf die betreffende biologische Funktion in einem bestimmten Zelltyp aus (Nowak et al., 1997). Defizienzen des aPKC-Gens bei Invertebraten führten zu einer sehr frühen embryonalen Sterblichkeit, die auf Defekte in der zellulären Polarität zurückzuführen waren (Tabuse et al., 1998; Wodarz et al., 2000). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die funktionellen Unterschiede, die für PKC ι/λ und ζ durch die Analyse der mutanten Maus beobachtet worden waren, auf ihre unterschiedliche Expression und damit auf eine unterschiedliche Regulation ihrer transkriptionellen Aktivität zurückzuführen sein könnten. PKC ζ ist zum Zeitpunkt der embryonalen Letalität in der PKC ι/λ -defizienten Maus nicht bzw. in nur sehr schwach im embryonalen Epithel exprimiert. Das könnte zur Folge haben, dass PKC ζ im Fall der PKC ι/λ -Defizienz durch Ausfall zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung entweder gar nicht oder nur in geringem Maße kompensieren kann. Um dies zu überprüfen und neu zu klären, ob die in Säugerzellen beschriebene Redundanz auch in der Embryogenese vorliegt, wurde eine Mauslinie generiert, bei der in die kodierende PKC ι/λ -Sequenz die PKC ζ -cDNA in das Genom integriert und damit unter die Regulation durch den endogenen Promotor gestellt ist (PKC ι/λ *knockout* / PKC ζ *knockin*; *Rescue*-Maus).

Die Untersuchungen der embryonalen Stadien E7.5-18.5 haben gezeigt, dass die homozygoten Embryonen während der gesamten Embryonalentwicklung keine äußerlich sichtbaren phänotypischen Auffälligkeiten aufweisen. Darüber hinaus gibt es keine signifikanten Abweichungen in der erwarteten mendelschen Verteilung (1:2:1) nach doppelt heterozygoter Verpaarung. Die *Rescue*-Maus ist demnach embryonal voll lebensfähig. Mit diesem Befund kann zum ersten Mal *in vivo* bestätigt werden, dass aPKC-Isoformen in der Embryogenese funktionell redundant wirken. Es kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch

keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Redundanz über die gesamte Embryonalentwicklung oder nur auf den Zeitpunkt des Phänotyps der PKC $\nu\lambda$ -defizienten Maus in E7.5 festgelegt ist. Die Expressionsanalyse hat gezeigt, dass beide Isoformen von E7.5 bis 10.5 ubiquitär innerhalb des Embryos exprimiert sind (siehe Kapitel 3.2.1). Diese überlappende Expression beider Gene kann ein Indiz dafür sein, dass sie in allen Gewebetypen während dieses Zeitraums der Organogenese redundant agieren könnten. Ein konzentrationsabhängiger Einfluss redundant wirkender Gene wurde z.B. für die TJ-Komponenten ZO-1 und ZO-2 (*zonula occludens*) nachgewiesen. Die verzögerte Bildung der TJs in ZO-1-defizienten Epithelzellen der Maus konnte darauf zurückgeführt werden, dass die ZO-Gesamtkonzentration durch endogenes ZO-2 für die temporal abgestimmte TJ-Formierung nicht ausreichend ist (Umeda et al., 2004). Die Quantifizierung der RNA-Transkripte hat ergeben, dass die Aktivität von PKC ζ am kritischen Stadium E7.5 nur ein Drittel von der von PKC $\nu\lambda$ beträgt (siehe Kapitel 3.2.1). Zusammen mit dem normalen Phänotyp der E7.5-*Rescue*-Maus deutet dies darauf hin, dass die spezifische aPKC-Funktion über die Regulation ihrer Transkription erfolgt. Zu diesem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung ist es demnach nicht entscheidend, welche aPKC-Isoform exprimiert ist, sondern, dass eine atypische Isoform die physiologische Funktion ausübt.

Überraschenderweise wurde eine hohe Letalität nach der Analyse der Genotypenverteilung der juvenilen *Rescue*-Nachkommen festgestellt. Vier homozygote Tiere erreichten das Alter von 4 Wochen ($\sim 1x$). Die Tiere waren jedoch phänotypisch unauffällig. Ein Männchen und ein Weibchen starben nach 32 Tagen bzw. 14 Wochen aus nicht geklärten Gründen. Ein in die statistischen Untersuchungen nicht mit einbezogenes weibliches Tier zeigte eine vergrößerte frontale Schädelregion, allgemeine Schwäche und Störungen in der Motorik. Es starb am postnatalen Tag 20 (siehe Kapitel 3.5.2). Um den Zeitpunkt der Letalität näher eingrenzen zu können, wurden zwei Würfe ab dem Tag der Geburt überwacht. Es stellte sich heraus, dass alle homozygoten *Rescue*-Tiere im Gegensatz zu den Wildtypen und Heterozygoten innerhalb der ersten beiden Tage postnatal starben. Die Tiere waren bis dahin phänotypisch unauffällig und wurden von den Müttern normal gesäugt (siehe Kapitel 3.5.3). Zwei homozygote Tiere, die zunächst phänotypisch normal erschienen und das fortpflanzungs-fähige Alter erreichten, entwickelten ab dem zweiten Lebensmonat Defekte in ihrer Motorik mit fortschreitender Ausprägung (siehe Kapitel 3.5.4).

Zusammenfassend ist die *Rescue*-Maus postnatal zu 99% letal. Nur zwei der insgesamt vier zum Zeitpunkt der Genotypisierung identifizierten Tiere sind adult geworden, zeigen aber schwere motorische Defekte. Es stellt sich die Frage, welche Ursachen die postnatale Letalität

der *Rescue*-Maus bedingen. Die phänotypische Analyse hat gezeigt, dass die physiologische Kompensation von PKC ν/λ durch PKC ζ nicht vollständig ist. Die könnte allerdings auf die chimäre Struktur des aus dem PKC ν/λ -Locus exprimierten PKC ζ -Proteins zurückzuführen sein. In der *Rescue*-Maus ist keine vollständige Substitution von PKC ν/λ durch PKC ζ erfolgt, da der N-Terminus des chimäres Proteins noch 28 Aminosäuren des endogenen PKC ν/λ -Proteins enthält. Zusätzlich wurden drei Aminosäuren durch die für die Klonierungsstrategie der PKC ζ -cDNA notwendige Einführung der *SalI*-Schnittstelle mutiert. Das bewirkte eine Inversion der Aminosäuren Threonin und Serin sowie eine Mutation von Isoleucin zu Methionin (siehe Kapitel 3.4.1). Letztgenannte Aminosäuren sind unpolar, so dass das Protein in seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften unverändert bleiben sollte. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Konformation des Proteins beeinträchtigt ist. Die chimäre Region des PKC ν/λ - ζ Fusionsproteins betrifft die für die Regulierung von aPKCs wichtige PB1-Domäne (Sanchez et al., 1998; Joberty et al., 2000; Moscat and Diaz-Meco, 2000). Am äußersten N-terminalen Ende wird die PB1-Funktion über einen Lysinrest innerhalb einer basischen Region vermittelt, der in beiden aPKC-Proteinen konserviert ist. Das für die Protein-Protein-Interaktion mit anderen Signalmolekülen essentielle OPCA-Motiv innerhalb dieser Domäne ist ebenfalls hochkonserviert. Der Bereich für die Par-6-Bindung innerhalb dieses Motivs wie auch die Aminosäuren für die elektrostatisch vermittelten Protein-Interaktionen sind bei beiden aPKC-Proteinen zu 100% identisch (Noda et al., 2003; Hirano et al., 2005). Es ist gezeigt worden, dass nach der Bindung und Phosphorylierung von Par-3 durch aPKCs die Lokalisation des Par-6/aPKC/Par-3 an die apikale Membran für die Formierung der TJ vermittelt wird (Izumi et al., 1998; Hirose et al., 2002; Nagai-Tamai et al., 2002; Henrique and Schweisguth, 2003). Die postulierte Rolle der aPKCs in der Regulation epithelialer Zellpolarität wird im chimären Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit deshalb nicht beeinträchtigt. Sollten weiterführenden Studien der PKC ν/λ -defizienten Maus (diskutiert in Kapitel 4.2) einen aPKC-abhängigen Defekt in der Bildung/Funktion von TJs *in vivo* bestätigen, würde dies zusammen mit der Aufhebung des letalen Phänotyps in der *Rescue*-Maus während der Embryogenese das redundante Wirken der aPKCs in der Regulierung von Zellpolarität durch aPKCs bestätigen.

Die Regulierung des Zellzyklus' beider aPKCs über Bindung ihrer OPCA-Motive an MEK-5 und p62 (Diaz-Meco and Moscat, 2001; Wooten et al., 2001) sollte auch im chimären Protein gewährleistet sein. Trotz der hohen Konservierung in der PB1-Domäne beider aPKS kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass in der chimären PB1-Domäne des *Rescue*-Proteins bislang nicht bekannte Bindungsdomänen zerstört wurden, die eine

reduzierte Interaktion mit ihren Regulatoren und damit verbundene verminderte Aktivierung bedingen können. Denkbar ist auch, dass neue Domänen geschaffen wurden, die zu einer Aktivierung durch neue im Wildtyp normalerweise nicht aPKC-aktivierende Proteine führen können. Allerdings konnten in heterozygoten Tieren keine Defekte beobachtet werden, die auf einen *gain of funktion*-Defekt zurückzuführen wären.

Das chimäre Protein wurde durch die Insertion der PKC ζ -cDNA in das Exon 2 des PKC ι/λ -Lokus generiert, an die direkt der 3'UTR kloniert wurde. Das Protein wurde somit unter die Regulation des endogenen Promotors gestellt, um die transkriptionelle Aktivität durch PKC ι/λ zu gewährleisten (siehe Kapitel 3.4.1). Die transkriptionelle Aktivierung und Modulierung kann aber auch durch verschiedene DNA-Elemente innerhalb und außerhalb der Promotorregion durch Bindung von Transkriptionsfaktoren erfolgen. *Enhancer*-Elemente finden sich im *core*-Promotor oder sind bis zu mehreren Megabasen *upstream* des Promotors lokalisiert und verstärken als positive Regulatoren die Transkription eines Gens (Blackwood and Kadonaga, 1998). *Insulator*-Elemente (Bindungselemente) sind ebenfalls *upstream* der kodierenden Sequenz eines Gens lokalisiert und können als positive oder negative Regulatoren die spatio-temporale Expression von Genen regulieren (Geyer, 1997). Eine besondere Situation stellen die *Silencer* dar. Sie sind positionsunabhängig und können oft auch in Exons und Introns eines Genes auftreten und wirken inhibitorisch auf die Expression eines Gens (Ogbourne and Antalis, 1998). Weiterhin werden durch alternatives Spleißen oder durch interne Promotoren unterschiedliche Transkripte hervorgebracht, wie beispielsweise für die PKC-Isoformen β und ζ gezeigt werden konnte (Ono et al., 1986; Ono et al., 1987; Marshall et al., 2000). Regulatorische Elemente innerhalb eines Gens können auch für die Regulierung eines anderen Gens eine große Rolle spielen. Am Beispiel des für die Entwicklung der Vorderextremitäten erforderlichen *Formin*-Gens wurde gezeigt, dass *frameshift*-Mutationen keine Entwicklungsdefekte in der Maus erzeugten. Jedoch erzeugte die Deletion der vollständigen kodierenden Region desselben Gens den selben phänotypischen Defekt, der bei *Gremlin*-defizienten Mäusen beobachtet worden war. Aufgeklärt wurde dieses Phänomen durch die Entdeckung, dass durch die Deletion ein für die Regulation des *Gremlin*-Gens essentielles *cis*-aktives Element entfernt wurde (Zuniga et al., 2004).

Weitere regulatorische Einflüsse könnten durch die für die positive Selektion rekombinanter ES-Zell-Klone eingeführten Neomycin-Resistenzkassette bedingt sein (Thomas and Capecchi, 1987), die in der *Recue*-Maus im Genlocus enthalten ist. Der Promotor dieser Kassette kann inhibitorische als auch aktivatorische Effekte auf die Expression anderer Gene ausüben. Eine reprimierende Wirkung auf die Expression eines excitotoxisch wirkenden *knockin*-Gens

bewirkte, dass die neonatale Letalität dieser Maus aufgehoben wurde und lebensfähige und fertile Tiere hervorgegangen sind (Schwarz et al., 2006). Ein aberrant durch den Promotor der Neomycin-Resistenzkassette erzeugtes neues Transkript führte in einem anderen Fall zu einem embryonal letalen Phänotyp (Scacheri et al., 2001). Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass klonierungsbedingte Positionseffekte am Phänotyp der *Rescue*-Maus beteiligt sind. Um einen möglichen regulatorischen Einfluss durch die interne Neomycin-Resistenz-Kassette in der *Rescue*-Maus auszuschließen, wurde diese durch Verpaarungen mit einer Cre-Rekombinase exprimierenden Maus entfernt. Eine phänotypische Charakterisierung dieser Mauslinie ist jedoch aus Zeitgründen nicht erfolgt.

Weiterhin stellt sich die Frage, warum es so große Varianzen im Phänotyp der postnatalen *Rescue*-Maus gibt. Die untersuchten Neugeborenen starben innerhalb der ersten beiden Lebenstage aus nicht geklärten Gründen. Zwei juvenile Nachkommen starben ebenfalls ohne erkennbare Ursache, während die beiden adulten Tiere eine normale Lebenszeit hatten und fortschreitende Defekte in ihrer Motorik entwickelten (siehe Kapitel 3.5.2 und 3.5.4). Mutationsstudien des embryonalen zeta-Globin-Gens stellten eindrucksvoll dar, dass somatisch mitotische Rekombinationsereignisse zu einer genetischen Varianz und damit zu unterschiedlicher phänotypischer Penetranz führten (Leder et al., 2005). Zusätzlich wurden Varianzen durch den genetischen Hintergrund der Maus bedingt. Dabei zeigte die C57BL/6-Mauslinie einen deutlich schwereren Phänotyp als es in der 129/SvEv-Mauslinie der Fall war (Leder et al., 2005). Die *Rescue*-Maus ist aus RI-ES-Zellen und einer C57BL/6J-Spender-Blastozyste hervorgegangen und stellt somit einen Hybrid dar (siehe Kapitel 2.7.8). Daher könnte die beobachtete phänotypische Varianz sowohl auf diesen Hybridhintergrund als auch auf somatische Rekombinationsereignisse zurückzuführen sein. Trotz des Sonderfalls, den das Globin-Gen darstellt, können durch den Hybridhintergrund bedingte Varianzen umgangen werden, indem die *Rescue*-Mäuse über mehrere Generationen in den C57BL/6J-Hintergrund zurückgekreuzt werden.

Einen weiteren Aspekt können durch „Überexpression“ von PKC ζ vermittelte Gendosis-Effekte darstellen, da in der *Rescue*-Maus neben den beiden Wildtyp-Allelen noch die beiden zusätzlichen Allele im PKC ν/λ -Lokus exprimiert werden. Beim Menschen sind zahlreiche Hinweise auf den pathogenen Einfluss überexprimierter Gene belegt. Zu den bekanntesten Krankheiten zählen die *Charcot-Marie-Tooth*-Erkrankung und das *Down*-Syndrom (Yamakawa et al., 1998; Perea et al., 2001). Eine autoreaktive Immunantwort wurde durch die Genduplikation des TLR7-Gens (*toll-like receptor 7*) hervorgerufen (Pisitkun et al., 2006).

Die Existenz von zwei atypischen PKCs bei Säugern lässt darauf schließen, dass neben den überlappenden Funktionen auch isoformspezifische Funktionen eine wesentliche Rolle spielen müssen. Eine vollständige Redundanz zweier Gene hätte zur Folge, dass sich im Laufe der Evolution aufgrund des Selektionsdruckes in mindestens einem der Gene Mutationen anhäufen könnten, die zum Funktionsverlust dieses Gens führen würden. Deshalb wird davon ausgegangen, dass die Konservierung in einem biologischen Bereich stattfindet, der nicht redundant zwischen den Genen ist und die spezifische Funktion des Gens ausmacht (Nowak et al., 1997). Die wichtigsten Hinweise spezifischen Wirkens wurde durch die aPKC-defizienten Mäuse erbracht. Demnach konnte für PKC ζ die Regulierung des NF κ B-Signalweges hinsichtlich zellapoptotischer und immunologischer Prozesse nachgewiesen werden (Leitges et al., 2001; Martin et al., 2002; Angeles Durán, 2004; Martin et al., 2005), während PKC ι/λ den Insulinsignalweg reguliert (Bandyopadhyay et al., 2004). In Zellkulturstudien wurde für PKC ι/λ das regulatorisch wirkende Protein LIP (*lambda-interacting protein*) nachgewiesen, das spezifisch mit der C1-Domäne dieser atypischen Isoform interagiert und dadurch eine mitogene Signalkaskade induziert (Diaz-Meco et al., 1996). Zusätzlich ist diese Isoform in die Regulation zellprotektiver Signalwege nach UV-Bestrahlung oder Induktion durch chemische Agenzien involviert (Huang et al., 1996; Murray and Fields, 1997). Im Gegensatz dazu wurde nur für PKC ζ eine Ras-abhängige Aktivierung der ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*) zu der den Zellzyklus regulierenden Cyclin-abhängigen Kinase Cyclin D1 gezeigt (Kampfer et al., 2001). Eine weitere PKC ζ -Spezifität ist für die Regulierung der Migration von Astrozyten belegt worden (Etienne-Manneville and Hall, 2001).

Während das Pseudosubstrat der beiden aPKCs identisch ist, sind die meisten Sequenzunterschiede in der cystinreichen C1-Domäne anzutreffen (Selbie et al., 1993; Akimoto et al., 1994). Möglicherweise wird eine große Anzahl spezifischer Funktionen über die Regulation dieser Domäne gewährleistet. Aufgrund der geringen Kenntnisse hinsichtlich spezifischer Aktivatoren und Signalwege ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt schwer zu beurteilen, welche aPKC-spezifischen Signalmechanismen für den Phänotyp der *Rescue*-Maus in Frage kommen. Dieser Effekt sollte demnach in einem Gewebetyp/Organ zum Tragen kommen, in dem beide Isoformen nicht redundant wirken. Daher könnten PKC ι/λ -spezifische Signalwege, die eine wichtige physiologische Funktion in bestimmten Organen der *Rescue*-Maus innehaben, aufgrund des Verlustes dieses Gens nicht mehr aktiviert werden. Die Aufklärung aPKC-spezifischer Funktionen wird durch eine umfangreiche phänotypische Charakterisierung der *Rescue*-Maus eine große Herausforderung zukünftiger Analysen sein.

Neuronale, metabolische sowie funktionale Defekte konnten als Ursache für eine neonatale Letalität in der Maus bereits nachgewiesen werden (Li et al., 2003; Peters et al., 2003; Ohtoshi and Behringer, 2004). Durch die Analyse der PKC ζ -defizienten Maus muss auch ein Zusammenhang einer möglichen Autoimmunerkrankung in Erwägung gezogen werden. Die Expressionsanalyse hat gezeigt, dass beide Isoformen in der zweiten Schwangerschaftshälfte ein äußerst spezifiziertes Expressionsprofil entwickeln (siehe Kapitel 3.2.2-3.2.4). Falls ein Defekt bereits in der Embryogenese auftritt, kann dies erst nach der Geburt Konsequenzen haben und auf spezifische Funktionen der aPKCs hinweisen. Phänotypische Untersuchungen um den Zeitpunkt der Geburt könnten daher Hinweise auf betroffene Organe und mögliche Funktionsstörungen liefern.

4.3.1 Das Potential der ES-Zell-Linien $\iota\Delta$ /rescue_tag und $\iota\Delta$ /rescue_GFP

Diese ES-Zell-Linien gingen aus der Transfektion mit den *Targeting*-Vektoren TV/tag bzw. TV/GFP in PKC ι / λ ^{+/ $\iota\Delta$} -ES-Zellen hervor. Sie sind auf beiden Allelen defizient für PKC ι / λ , während ein Allel das *rescue*-Allel darstellt. Die Zell-Linie $\iota\Delta$ /rescue_GFP unterscheidet sich von der anderen dadurch, dass sie einen GFP- (grünes fluorszierendes Protein) Marker anstelle der 3'UTR von PKC ι / λ enthält (siehe Kapitel 3.4.2). Die Zell-Linien stellen Werkzeuge dar, die zur Unterscheidung aPKC-spezifischer Funktionen hilfreich sein können. Aufgrund ihrer Pluripotenz haben ES-Zellen die Fähigkeit, zu vielen Zell- und Gewebetypen zu differenzieren. Es gibt inzwischen gut etablierte Methoden, aus ihnen beispielsweise neuronale, Herz-, Bauspeicheldrüsen- und Leberzellen, die Derivate des Ektoderms, Mesoderms und Endoderms darstellen, *in vitro* abzuleiten (Enzmann et al., 2006; Saldeen et al., 2006; Tsutsui et al., 2006; Wang et al., 2006; Wiese et al., 2006). Für den Zebrafisch wurde beispielsweise die polaritätsabhängige Regulierung von Has/PKC ι (*heart and soul*) im Epithel während der Herzmorphogenese, der Retina, des Neuralrohrs und des Verdauungstraktes nachgewiesen (Horne-Badovinac et al., 2001; Rohr et al., 2006). Unter Verwendung der in dieser Arbeit etablierten ES-Zell-Linien könnten funktionelle Unterschiede der aPKCs im Vergleich mit PKC ι / λ -defizienten (Bandyopadhyay et al., 2004) und Wildtyp- ES-Zellen *in vivo* identifiziert werden. In ihre Charakterisierung könnte die Untersuchung auf mögliche Interaktionspartner, ihr Phosphorylierungsstatus und hinsichtlich ihrer Kinase-Aktivität auch potentielle Substrate mit eingeschlossen werden. Ferner kann über den Vergleich der aus den verschiedenen ES-Zell-Linien abgeleitete Epithelzellen die Rolle der aPKCs in der Etablierung von Zellpolarität über endogen exprimierte aPKCs überprüft werden, und würde

damit ein zuverlässigeres Modell darstellen als die Überexpressionsanalysen in Säugerzellen (Lin et al., 2000; Noda et al., 2001; Suzuki et al., 2001; Yamanaka et al., 2001).

5 Literatur

- Ahringer MGaJ. 2001. Axis determination in *C. elegans*: initiating and transducing polarity. *Current Opinion in Genetics & Development* 11:367-373.
- Akimoto K, Mizuno K, Osada S, Hirai S, Tanuma S, Suzuki K, Ohno S. 1994. A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *J Biol Chem* 269:12677-12683.
- Akimoto K, Nakaya M, Yamanaka T, Tanaka J, Matsuda S, Weng QP, Avruch J, Ohno S. 1998. Atypical protein kinase C lambda binds and regulates p70 S6 kinase. *Biochem J* 335 (Pt 2):417-424.
- Albrecht U, Lu, H.-C., Revelli, J.-P., Xu, X.-C., Reuben, L., Eichele, G. 1998. Studying gene expression on tissue sections using *in situ* hybridization. In: Adolph KW, editor. *Human Genome Methods*. Boca Raton: CRC Press. p 93-120.
- Anderson JM. 1996. Cell signalling: MAGUK magic. *Curr Biol* 6:382-384.
- Anderson JM. 2001. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News In Physiological Sciences: An International Journal Of Physiology Produced Jointly By The International Union Of Physiological Sciences And The American Physiological Society* 16:126-130.
- Angeles Durán AR, Pilar Martin, Manuel Serrano, Juana Maria Flores, Michael Leitges, María T Diaz-Meco, and Jorge Moscat. 2004. Crosstalk between PKC ζ and the IL4/Stat6 pathway during T-cell-mediated hepatitis. *EMBO J*. 23:4595–4605.
- Balda MS, Matter K. 2000. Transmembrane proteins of tight junctions. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 11:281-289.
- Balda MS MK. 1998. Tight junctions. *Journal of Cell Science* 111:541-547.
- Bandyopadhyay G, Standaert ML, Sajan MP, Kanoh Y, Miura A, Braun U, Kruse F, Leitges M, Farese RV. 2004. Protein kinase C-lambda knockout in embryonic stem cells and adipocytes impairs insulin-stimulated glucose transport. *Mol Endocrinol* 18:373-383.
- Berra E, Diaz-Meco MT, Dominguez I, Municio MM, Sanz L, Lozano J, Chapkin RS, Moscat J. 1993. Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell* 74:555-563.
- Berra E, Diaz-Meco MT, Lozano J, Frutos S, Municio MM, Sanchez P, Sanz L, Moscat J. 1995. Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *Embo J* 14:6157-6163.
- Bjorkoy G, Perander M, Overvatn A, Johansen T. 1997. Reversion of Ras- and phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C-mediated transformation of NIH 3T3 cells by a dominant interfering mutant of protein kinase C lambda is accompanied by the loss of constitutive nuclear mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *J Biol Chem* 272:11557-11565.
- Blackwood EM, Kadonaga JT. 1998. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281:60-63.
- Blobe GC, Stribling S, Obeid LM, Hannun YA. 1996. Protein kinase C isoenzymes: regulation and function. *Cancer Surv* 27:213-248.
- Burbelo PD, Drechsel D, Hall A. 1995. A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J Biol Chem* 270:29071-29074.

- Castrillo A, Pennington DJ, Otto F, Parker PJ, Owen MJ, Bosca L. 2001. Protein kinase Cepsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *J Exp Med* 194:1231-1242.
- Chad A, Rappleye AT, Rebecca Lyczak, Bruce Bowerman and Raffi V. Aroian. 2002. The Anaphase-Promoting Complex and Separin Are Required for Embryonic Anterior-Posterior Axis Formation. *Cell* 2:Pages 195-206
- Chang S, Kim JH, Shin J. 2002. p62 forms a ternary complex with PKC[zeta] and PAR-4 and antagonizes PAR-4-induced PKC[zeta] inhibition. *FEBS Letters* 510:57-61.
- de Cuevas M, Spradling AC. 1998. Morphogenesis of the Drosophila fusome and its implications for oocyte specification. *Development* 125:2781-2789.
- De Franceschi L, Fumagalli L, Olivieri O, Corrocher R, Lowell CA, Berton G. 1997. Deficiency of Src family kinases Fgr and Hck results in activation of erythrocyte K/Cl cotransport. *J Clin Invest* 99:220-227.
- Diaz-Meco MT, Moscat J. 2001. MEK5, a new target of the atypical protein kinase C isoforms in mitogenic signaling. *Mol Cell Biol* 21:1218-1227.
- Diaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sanchez P, Lozano J, Sanz L, Moscat J. 1996. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* 86:777-786.
- Diaz-Meco MT, Municio MM, Sanchez P, Lozano J, Moscat J. 1996. Lambda-interacting protein, a novel protein that specifically interacts with the zinc finger domain of the atypical protein kinase C isotype lambda/iota and stimulates its kinase activity in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 16:105-114.
- Drubin DG, Nelson WJ. 1996. Origins of cell polarity. *Cell* 84:335-344.
- Eaton S, Simons K. 1995. Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization. *Cell* 82:5-8.
- Ebnet K, Suzuki A, Horikoshi Y, Hirose T, Meyer Zu Brickwedde MK, Ohno S, Vestweber D. 2001. The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *Embo J* 20:3738-3748.
- Enzmann GU, Benton RL, Talbott JF, Cao Q, Whittemore SR. 2006. Functional considerations of stem cell transplantation therapy for spinal cord repair. *J Neurotrauma* 23:479-495.
- Etienne-Manneville S, Hall A. 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106:489-498.
- Etienne-Manneville S, Hall A. 2003. Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr Opin Cell Biol* 15:67-72.
- Evans WH, Martin PE. 2002. Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol* 19:121-136.
- Feinberg AP, Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13.
- Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539-1550.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123:1777-1788.
- Gao L, Joberty G, Macara IG. 2002. Assembly of epithelial tight junctions is negatively regulated by Par6. *Curr Biol* 12:221-225.
- Garrard SM, Capaldo CT, Gao L, Rosen MK, Macara IG, Tomchick DR. 2003. Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6. *Embo J* 22:1125-1133.

- Garrod DR, Merritt AJ, Nie Z. 2002. Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 14:537-545.
- Getsios S, Huen AC, Green KJ. 2004. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:271-281.
- Geyer PK. 1997. The role of insulator elements in defining domains of gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 7:242-248.
- Ghosh PM, Bedolla R, Mikhailova M, Kreisberg JI. 2002. RhoA-dependent murine prostate cancer cell proliferation and apoptosis: role of protein kinase C ζ . *Cancer Res* 62:2630-2636.
- Goodnight J, Kazanietz MG, Blumberg PM, Mushinski JF, Mischak H. 1992. The cDNA sequence, expression pattern and protein characteristics of mouse protein kinase C ζ . *Gene* 122:305-311.
- Grifman M, Galyam N, Seidman S, Soreq H. 1998. Functional redundancy of acetylcholinesterase and neuroigin in mammalian neuritogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13935-13940.
- Gumbiner BM. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345-357.
- Guo S, Kemphues KJ. 1996. Molecular genetics of asymmetric cleavage in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Curr Opin Genet Dev* 6:408-415.
- Henrique D, Schweisguth F. 2003. Cell polarity: the ups and downs of the Par6/aPKC complex. *Curr Opin Genet Dev* 13:341-350.
- Hirai T, Chida K. 2003. Protein kinase C ζ (PKC ζ): activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem (Tokyo)* 133:1-7.
- Hirano Y, Yoshinaga S, Takeya R, Suzuki NN, Horiuchi M, Kohjima M, Sumimoto H, Inagaki F. 2005. Structure of a cell polarity regulator, a complex between atypical PKC and Par6 PB1 domains. *J Biol Chem* 280:9653-9661.
- Hirose T, Izumi Y, Nagashima Y, Tamai-Nagai Y, Kurihara H, Sakai T, Suzuki Y, Yamanaka T, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S. 2002. Involvement of ASIP/PAR-3 in the promotion of epithelial tight junction formation. *J Cell Sci* 115:2485-2495.
- Horne-Badovinac S, Lin D, Waldron S, Schwarz M, Mbamalu G, Pawson T, Jan Y, Stainier DY, Abdelilah-Seyfried S. 2001. Positional cloning of heart and soul reveals multiple roles for PKC lambda in zebrafish organogenesis. *Curr Biol* 11:1492-1502.
- Huang C, Ma W-y, Bowden GT, Dong Z. 1996. Ultraviolet B-induced Activated Protein-1 Activation Does Not Require Epidermal Growth Factor Receptor but Is Blocked by a Dominant Negative PKC lambda /iota. *J. Biol. Chem.* 271:31262-31268.
- Hung TJ aKK. 1999. PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Dev Biol* 126:127-135.
- Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG, Margolis B. 2003. Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol* 5:137-142.
- Ito T, Matsui Y, Ago T, Ota K, Sumimoto H. 2001. Novel modular domain PB1 recognizes PC motif to mediate functional protein-protein interactions. *Embo J* 20:3938-3946.
- Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukita S. 2001. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol* 154:491-497.
- Izumi Y, Hirose T, Tamai Y, Hirai S-i, Nagashima Y, Fujimoto T, Tabuse Y, Kemphues KJ, Ohno S. 1998. An Atypical PKC Directly Associates and Colocalizes at the Epithelial Tight Junction with ASIP, a Mammalian Homologue of *Caenorhabditis elegans* Polarity Protein PAR-3. *J. Cell Biol.* 143:95-106.
- Jean-René Huynh MP, Juergen A. Knoblich and Daniel St Johnston. 2001. Bazooka and PAR-6 are required with PAR-1 for the maintenance of oocyte fate in *Drosophila*. *Current Biology* 11:901-906

- Joberty G, Petersen C, Gao L, Macara IG. 2000. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* 2:531-539.
- Judith A Tunggal IH, Annika Schmitz, Heinz Schwarz, Dorothee Günzel, Michael Fromm, Rolf Kemler, Thomas Krieg, and Carien M Niessen. 2005. E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *Embo J* 23:1146–1156.
- Kampfer S, Windegger M, Hochholdinger F, Schwaiger W, Pestell RG, Baier G, Grunicke HH, Uberall F. 2001. Protein Kinase C Isoforms Involved in the Transcriptional Activation of Cyclin D1 by Transforming Ha-Ras. *J. Biol. Chem.* 276:42834-42842.
- Keller R. 2005. Cell migration during gastrulation. *Curr Opin Cell Biol* 17:533-541.
- Khasar SG, Lin YH, Martin A, Dadgar J, McMahon T, Wang D, Hundle B, Aley KO, Isenberg W, McCarter G, Green PG, Hodge CW, Levine JD, Messing RO. 1999. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron* 24:253-260.
- Kotani K, Ogawa W, Hashiramoto M, Onishi T, Ohno S, Kasuga M. 2000. Inhibition of insulin-induced glucose uptake by atypical protein kinase C isotype-specific interacting protein in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 275:26390-26395.
- Kovbasnjuk O, Leader JP, Weinstein AM, Spring KR. 1998. Water does not flow across the tight junctions of MDCK cell epithelium. *PNAS* 95:6526-6530.
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. 1998. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281:2042-2045.
- Leder A, McMenamin J, Fontaine K, Bishop A, Leder P. 2005. {zeta}-/- Thalassemic mice are affected by two modifying loci and display unanticipated somatic recombination leading to inherited variation. *Hum. Mol. Genet.* 14:615-625.
- Leitges M, Gimborn K, Elis W, Kalesnikoff J, Hughes MR, Krystal G, Huber M. 2002. Protein kinase C-delta is a negative regulator of antigen-induced mast cell degranulation. *Mol Cell Biol* 22:3970-3980.
- Leitges M, Plomann M, Standaert ML, Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Farese RV. 2002. Knockout of PKC alpha enhances insulin signaling through PI3K. *Mol Endocrinol* 16:847-858.
- Leitges M, Sanz L, Martin P, Duran A, Braun U, Garcia JF, Camacho F, Diaz-Meco MT, Rennert PD, Moscat J. 2001. Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Mol Cell* 8:771-780.
- Leitges M, Schmedt C, Guinamard R, Davoust J, Schaal S, Stabel S, Tarakhovsky A. 1996. Immunodeficiency in protein kinase cbeta-deficient mice. *Science* 273:788-791.
- Lemmers C, Medina E, Delgrossi MH, Michel D, Arsanto JP, Le Bivic A. 2002. hINAD1/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J Biol Chem* 277:25408-25415.
- Lewis SL, Tam PP. 2006. Definitive endoderm of the mouse embryo: Formation, cell fates, and morphogenetic function. *Dev Dyn.*
- Li J-P, Gong F, Hagner-McWhirter A, Forsberg E, Abrink M, Kisilevsky R, Zhang X, Lindahl U. 2003. Targeted Disruption of a Murine Glucuronyl C5-epimerase Gene Results in Heparan Sulfate Lacking L-Iduronic Acid and in Neonatal Lethality. *J. Biol. Chem.* 278:28363-28366.
- Lin D, Edwards AS, Fawcett JP, Mbamalu G, Scott JD, Pawson T. 2000. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol* 2:540-547.
- Lin H, Spradling AC. 1995. Fusome asymmetry and oocyte determination in Drosophila. *Dev Genet* 16:6-12.

- Marshall BS, Price G, Powell CT. 2000. Rat protein kinase c zeta gene contains alternative promoters for generation of dual transcripts with 5'-end heterogeneity. *DNA Cell Biol* 19:707-719.
- Martin P, Duran A, Minguet S, Gaspar ML, Diaz-Meco MT, Rennert P, Leitges M, Moscat J. 2002. Role of zeta PKC in B-cell signaling and function. *Embo J* 21:4049-4057.
- Martin P, Villares R, Rodriguez-Mascarenhas S, Zaballos A, Leitges M, Kovac J, Sizing I, Rennert P, Marquez G, Martinez AC, Diaz-Meco MT, Moscat J. 2005. Control of T helper 2 cell function and allergic airway inflammation by PKCzeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9866-9871.
- Mayr M, Chung YL, Mayr U, McGregor E, Troy H, Baier G, Leitges M, Dunn MJ, Griffiths JR, Xu Q. 2004. Loss of PKC-delta alters cardiac metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H937-945.
- Miyamoto A, Nakayama K, Imaki H, Hirose S, Jiang Y, Abe M, Tsukiyama T, Nagahama H, Ohno S, Hatakeyama S, Nakayama KI. 2002. Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cdelta. *Nature* 416:865-869.
- Moscat J, Diaz-Meco MT. 2000. The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep* 1:399-403.
- Moscat J, Diaz-Meco MT, Rennert P. 2003. NF-kappaB activation by protein kinase C isoforms and B-cell function. *EMBO Rep* 4:31-36.
- Muller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K. 1995. PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *Embo J* 14:1961-1969.
- Murray NR, Fields AP. 1997. Atypical Protein Kinase C iota Protects Human Leukemia Cells against Drug-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272:27521-27524.
- Murray NR, Jamieson L, Yu W, Zhang J, Gokmen-Polar Y, Sier D, Anastasiadis P, Gatalica Z, Thompson EA, Fields AP. 2004. Protein kinase C{iota} is required for Ras transformation and colon carcinogenesis *in vivo*. *J. Cell Biol.* 164:797-802.
- Murray NR, Jamieson L, Yu W, Zhang J, Gokmen-Polar Y, Sier D, Anastasiadis P, Gatalica Z, Thompson EA, Fields AP. 2004. Protein kinase Ciota is required for Ras transformation and colon carcinogenesis *in vivo*. *J Cell Biol* 164:797-802.
- Nagai-Tamai Y, Mizuno K, Hirose T, Suzuki A, Ohno S. 2002. Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells* 7:1161-1171.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8424-8428.
- Nakamura R, Sumimoto H, Mizuki K, Hata K, Ago T, Kitajima S, Takeshige K, Sakaki Y, Ito T. 1998. The PC motif: a novel and evolutionarily conserved sequence involved in interaction between p40phox and p67phox, SH3 domain-containing cytosolic factors of the phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Biochem* 251:583-589.
- Nakanishi H, Brewer KA, Exton JH. 1993. Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 268:13-16.
- Newton AC. 2001. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101:2353-2364.
- Nicholson BJ. 2003. Gap junctions - from cell to molecule. *J Cell Sci* 116:4479-4481.
- Nishizuka Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J* 9:484-496.
- Nishizuka Y. 2003. Discovery and Prospect of Protein Kinase C Research: Epilogue. *J Biochem (Tokyo)* 133:155-158.

- Noda Y, Kohjima M, Izaki T, Ota K, Yoshinaga S, Inagaki F, Ito T, Sumimoto H. 2003. Molecular recognition in dimerization between PB1 domains. *J Biol Chem* 278:43516-43524.
- Noda Y, Takeya R, Ohno S, Naito S, Ito T, Sumimoto H. 2001. Human homologues of the *Caenorhabditis elegans* cell polarity protein PAR6 as an adaptor that links the small GTPases Rac and Cdc42 to atypical protein kinase C. *Genes Cells* 6:107-119.
- Nowak MA, Boerlijst MC, Cooke J, Smith JM. 1997. Evolution of genetic redundancy. *Nature* 388:167-171.
- Ogbourne S, Antalis TM. 1998. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J* 331 (Pt 1):1-14.
- Ohno S. 2001. Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 13:641-648.
- Ohtoshi A, Behringer RR. 2004. Neonatal Lethality, Dwarfism, and Abnormal Brain Development in *Dmbx1* Mutant Mice. *Mol. Cell. Biol.* 24:7548-7558.
- Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. 1988. The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. *J Biol Chem* 263:6927-6932.
- Ono Y, Kikkawa U, Ogita K, Fujii T, Kurokawa T, Asaoka Y, Sekiguchi K, Ase K, Igarashi K, Nishizuka Y. 1987. Expression and properties of two types of protein kinase C: alternative splicing from a single gene. *Science* 236:1116-1120.
- Ono Y, Kurokawa T, Fujii T, Kawahara K, Igarashi K, Kikkawa U, Ogita K, Nishizuka Y. 1986. Two types of complementary DNAs of rat brain protein kinase C. Heterogeneity determined by alternative splicing. *FEBS Lett* 206:347-352.
- Oster H, Eichele G, Leitges M. 2004. Differential expression of atypical PKCs in the adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 127:79-88.
- Parker PJ, Murray-Rust J. 2004. PKC at a glance. *J Cell Sci* 117:131-132.
- Parker PJ, Parkinson SJ. 2001. AGC protein kinase phosphorylation and protein kinase C. *Biochem Soc Trans* 29:860-863.
- Pellettieri J, Seydoux G. 2002. Anterior-posterior polarity in *C. elegans* and *Drosophila*--PARallels and differences. *Science* 298:1946-1950.
- Perea J, Robertson A, Tolmachova T, Muddle J, King RH, Ponsford S, Thomas PK, Huxley C. 2001. Induced myelination and demyelination in a conditional mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Hum Mol Genet* 10:1007-1018.
- Peters H, Nefedov M, Sarsero J, Pitt J, Fowler KJ, Gazeas S, Kahler SG, Ioannou PA. 2003. A Knock-out Mouse Model for Methylmalonic Aciduria Resulting in Neonatal Lethality. *J. Biol. Chem.* 278:52909-52913.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* 29:e45-.
- Pisitkun P, Deane JA, Difilippantonio MJ, Tarasenko T, Satterthwaite AB, Bolland S. 2006. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science* 312:1669-1672.
- Ponting CP. 1996. Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci* 5:2353-2357.
- Ponting CP, Ito T, Moscat J, Diaz-Meco MT, Inagaki F, Sumimoto H. 2002. OPR, PC and AID: all in the PB1 family. *Trends Biochem Sci* 27:10.
- Puls A, Schmidt S, Grawe F, Stabel S. 1997. Interaction of protein kinase C zeta with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein. *PNAS* 94:6191-6196.
- Regala RP, Weems C, Jamieson L, Copland JA, Thompson EA, Fields AP. 2005. Atypical protein kinase Ciota plays a critical role in human lung cancer cell growth and tumorigenicity. *J Biol Chem* 280:31109-31115.

- Robertson EJ. 1987. *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*. Oxford/Washington, DC: IRL Press Limited. 71–112.
- Robertson HM, Preston CR, Phillis RW, Johnson-Schlitz DM, Benz WK, Engels WR. 1988. A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118:461-470.
- Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, Margolis B. 2002a. The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *J Biol Chem* 277:27501-27509.
- Roh MH, Makarova O, Liu CJ, Shin K, Lee S, Laurinec S, Goyal M, Wiggins R, Margolis B. 2002b. The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol* 157:161-172.
- Rohr S, Bit-Avrágim N, Abdelilah-Seyfried S. 2006. Heart and soul/PRKCi and nagie oko/Mpp5 regulate myocardial coherence and remodeling during cardiac morphogenesis. *Development* 133:107-115.
- Rolls MM, Albertson R, Shih HP, Lee CY, Doe CQ. 2003. *Drosophila* aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia. *J Cell Biol* 163:1089-1098.
- Sacher F. 2004. Generierung und phänotypische Analyse von Proteinkinase Cdelta/epsilon-doppeldefizienten Mäusen. In: *Schriftenreihe des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Endokrinologie*. Universität Hannover.
- Saldeen J, Kriz V, Agren N, Welsh M. 2006. SHB and angiogenic factors promote ES cell differentiation to insulin-producing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 344:517-524.
- Sanchez P, De Carcer G, Sandoval IV, Moscat J, Diaz-Meco MT. 1998. Localization of Atypical Protein Kinase C Isoforms into Lysosome-Targeted Endosomes through Interaction with p62. *Mol. Cell. Biol.* 18:3069-3080.
- Sanz L, Diaz-Meco MT, Nakano H, Moscat J. 2000. The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *Embo J* 19:1576-1586.
- Sanz L, Sanchez P, Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Moscat J. 1999. The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. *Embo J* 18:3044-3053.
- Scacheri PC, Crabtree JS, Novotny EA, Garrett-Beal L, Chen A, Edgemon KA, Marx SJ, Spiegel AM, Chandrasekharappa SC, Collins FS. 2001. Bidirectional transcriptional activity of PGK-neomycin and unexpected embryonic lethality in heterozygote chimeric knockout mice. *Genesis* 30:259-263.
- Schlessinger J. 2000. *Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases*. *Cell* 103:211-225.
- Schober M, Schaefer M, Knoblich JA. 1999. Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402:548-551.
- Schwarz J, Schwarz SC, Dorigo O, Stutzer A, Wegner F, Labarca C, Deshpande P, Gil JS, Berk AJ, Lester HA. 2006. Enhanced expression of hypersensitive $\alpha 4^*$ nAChR in adult mice increases the loss of midbrain dopaminergic neurons. *FASEB J.* 20:935-946.
- Selbie LA, Schmitz-Peiffer C, Sheng Y, Biden TJ. 1993. Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 268:24296-24302.
- Sepich DS, Calmelet C, Kiskowski M, Solnica-Krezel L. 2005. Initiation of convergence and extension movements of lateral mesoderm during zebrafish gastrulation. *Dev Dyn* 234:279-292.
- Slorach EM, Campbell FC, Dorin JR. 1999. A mouse model of intestinal stem cell function and regeneration. *J Cell Sci* 112 Pt 18:3029-3038.

- Soloff RS, Katayama C, Lin MY, Feramisco JR, Hedrick SM. 2004. Targeted deletion of protein kinase C lambda reveals a distribution of functions between the two atypical protein kinase C isoforms. *J Immunol* 173:3250-3260.
- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103:755-766.
- Sun Z, Arendt CW, Ellmeier W, Schaeffer EM, Sunshine MJ, Gandhi L, Annes J, Petrzilka D, Kupfer A, Schwartzberg PL, Littman DR. 2000. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404:402-407.
- Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T, Manabe N, Mizuno K, Shimizu M, Akimoto K, Izumi Y, Ohnishi T, Ohno S. 2001. Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J Cell Biol* 152:1183-1196.
- Tabuse Y, Izumi Y, Piano F, Kempfues KJ, Miwa J, Ohno S. 1998. Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125:3607-3614.
- Terasawa H, Noda Y, Ito T, Hatanaka H, Ichikawa S, Ogura K, Sumimoto H, Inagaki F. 2001. Structure and ligand recognition of the PB1 domain: a novel protein module binding to the PC motif. *Embo J* 20:3947-3956.
- Tesar PJ. 2005. Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8239-8244.
- Thomas KR, Capecchi MR. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512.
- Toker A. 1998. Signaling through protein kinase C. *Front Biosci* 1:D1134-1147.
- Tsukita S, Furuse M. 1999. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 9:268-273.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. 1999. Structural and signalling molecules come together at tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 11:628-633.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285-293.
- Tsutsui M, Ogawa S, Inada Y, Tomioka E, Kamiyoshi A, Tanaka S, Kishida T, Nishiyama M, Murakami M, Kuroda J, Hashikura Y, Miyagawa S, Satoh F, Shibata N, Tagawa Y. 2006. Characterization of cytochrome P450 expression in murine embryonic stem cell-derived hepatic tissue system. *Drug Metab Dispos* 34:696-701.
- Überall F, Hellbert K, Kampf S, Maly K, Villunger A, Spitaler M, Mwanjewe J, Baier-Bitterlich G, Baier G, Grunicke HH. 1999. Evidence that atypical protein kinase C-lambda and atypical protein kinase C-zeta participate in Ras-mediated reorganization of the F-actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 144:413-425.
- Umeda K, Matsui T, Nakayama M, Furuse K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. 2004. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem* 279:44785-44794.
- Van Itallie CM, Anderson JM. 2006. CLAUDINS AND EPITHELIAL PARACELLULAR TRANSPORT. *Annual Review of Physiology* 68:403-429.
- Wang X, Wei G, Yu W, Zhao Y, Yu X, Ma X. 2006. Scalable Producing Embryoid Bodies by Rotary Cell Culture System and Constructing Engineered Cardiac Tissue with ES-Derived Cardiomyocytes in Vitro. *Biotechnol Prog* 22:811-818.
- Wang Y, Schnegelsberg PN, Dausman J, Jaenisch R. 1996. Functional redundancy of the muscle-specific transcription factors *Myf5* and *myogenin*. *Nature* 379:823-825.
- Ways DK, Cook PP, Webster C, Parker PJ. 1992. Effect of phorbol esters on protein kinase C-zeta. *J Biol Chem* 267:4799-4805.

- Wiese C, Kania G, Rolletschek A, Blyszczuk P, Wobus AM. 2006. Pluripotency: capacity for in vitro differentiation of undifferentiated embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 325:181-205.
- Wodarz A. 2002. Establishing cell polarity in development. *Nat Cell Biol* 4:E39-44.
- Wodarz A, Ramrath A, Grimm A, Knust E. 2000. *Drosophila* atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts. *J Cell Biol* 150:1361-1374.
- Wodarz A, Ramrath A, Kuchinke U, Knust E. 1999. Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402:544-547.
- Wooten MW, Seibenhener ML, Mamidipudi V, Diaz-Meco MT, Barker PA, Moscat J. 2001. The Atypical Protein Kinase C-interacting Protein p62 Is a Scaffold for NF-kappa B Activation by Nerve Growth Factor. *J. Biol. Chem.* 276:7709-7712.
- Yamada A, Irie K, Hirota T, Ooshio T, Fukuhara A, Takai Y. 2005. Involvement of the Annexin II-S100A10 Complex in the Formation of E-cadherin-based Adherens Junctions in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J. Biol. Chem.* 280:6016-6027.
- Yamakawa K, Huot YK, Haendelt MA, Hubert R, Chen XN, Lyons GE, Korenberg JR. 1998. DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. *Hum Mol Genet* 7:227-237.
- Yamanaka T, Horikoshi Y, Sugiyama Y, Ishiyama C, Suzuki A, Hirose T, Iwamatsu A, Shinohara A, Ohno S. 2003. Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol* 13:734-743.
- Yamanaka T, Horikoshi Y, Suzuki A, Sugiyama Y, Kitamura K, Maniwa R, Nagai Y, Yamashita A, Hirose T, Ishikawa H, Ohno S. 2001. PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells* 6:721-731.
- Yaylaoglu MB, Titmus A, Visel A, Alvarez-Bolado G, Thaller C, Eichele G. 2005. Comprehensive expression atlas of fibroblast growth factors and their receptors generated by a novel robotic *in situ* hybridization platform. *Dev Dyn* 234:371-386.
- Zuniga A, Michos O, Spitz F, Haramis A-PG, Panman L, Galli A, Vintersten K, Klasen C, Mansfield W, Kuc S, Duboule D, Dono R, Zeller R. 2004. Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression. *Genes Dev.* 18:1553-1564.

6 Anhang

6.1 PKC ι/λ - und PKC ζ -Aminosäuresequenz-Alignment

Mit Hilfe des Programms CLUSTAL W (1.81; Multiple sequence alignment) wurde bei den Aminosäuresequenzen von PKC ι/λ (586 Aminosäuren, untere Reihe) und PKC ζ (592 Aminosäuren, obere Reihe) eine Homologie von 73% festgestellt.

```

MPSRTDPKMDR--SGGRVRLKAHYGGDILITSDAMTTFKDLCEEVRDMCG
MSHTVACGGGGDHSQVRVKAYYRGDIMITHFEPISIFEGLCSEVRDMCS
* . . . . :*:*: * **:* .: . :*:**.*****.

LHQQHP LTLKWV DSEGD PCTVSSQMELEAFRLVQGRDEVLIHVFPSI
FDNEQPFTMKWIDEGDPCTVSSQLELEAFRLVELNKDELLIHVFPCV
.:.:*:*:*:*.*****:***** .:*. *:****.:

PEQPGMPCPGEDKSIYRRGARRWRKLYRANGHLFQAKRFNRGAYCGQCSE
PERPGMPCPGEDKSIYRRGARRWRKLYCANGHTFQAKRFNRRAHCAICTD
**:*:***** ** * ** * ** * *: * ** * ** *

RIWGLSRQGYRCINCKLLVHKRCHVLVPLTCRRHMSVMPSEQEPPVDGKN
RIWGLGRQGYKCINCKLLVHKKCHKLVTIECGRH--SLPPEPMPMDQTM
****:*:*****:* **.: * * * * * * * * * *

DGVDLPSEETDGIAYISSSRKHDNIKDDSEDLKPVIDGVDGKISQGLGL
H---PDHTQTVIPYNPSS--HESLDQVGE-KEAMNTRESGKASSLGL
. *.. *.* ** *.:.: * * *.: . * *..**

QDFDLIRVIGRGSYAKVLLVRLKKNQIYAMKVVKELVHDEDEDIDWVQT
QDFDLIRVIGRGSYAKVLLVRLKKTDRYAMKVVKELVNDDEDIDWVQT
****:*:*****.*:*****:*****

EKHVFEQASSNPFVLVGLHSCFQTSRLFLVIEYVNGDLMFHMQRQRKLP
EKHVFEQASNHPFLVGLHSCFQTESRLFFVIEYVNGDLMFHMQRQRKLP
*****.:***** **:*:*****

```

```

EEHARFYAAEICIALNFLHERGIYRDLKLDNVLLDADGHIKLTDYGMCK
EEHARFYSAEISLALNYLHERGIYRDLKLDNVLLDSEGHIKLTDYGMCK
*****:*:*****:*****:*****:*****

EGLPGD TTSTFCGTPNYIAPEILRGEYGFVSDWWALGVLFMEMMAGRS
EGLRPGD TTSTFCGTPNYIAPEILRGEYGFVSDWWALGVLFMEMMAGRS
** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

PFDI--TDNPD MNTEDYLFQVILEKPIRIPRFLSVKASHVLKGF LNKDP
PFDIVGSSDNP DQNTEDYLFQVILEKQIRIPRSLVKAASVLKSF LNKDP
***: :*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

KERLGRPQTGFSDIKSHAFFRSIDWDLLEKKQTLPPFPQITDDYGLDN
KERLGCHPQTGFADIQGHFFRNVDWDMMEQKQVVPFKNISGEFGLDN
*****:*:*****:*:*.***.:*:*:*.***:*:*.***:*.***:

FDTQFTSEPVQLTPDDEDVIKRIDQSEFEGFEYINPLLSAEESV
FDSQFTNEPVQLTPDDDIVRKIDQSEFEGFEYINPLLSAEECV
**:*:*****:*:.:*****:*****:*****.*

* - vollständig konservierte Aminosäuren
: - Konservierung starker Gruppen
. - Konservierung schwacher Gruppen
- kein Konsensus

```

6.2 Nukleotid- und Aminosäuresequenzbereiche für die Generierung isoformspezifischer polyklonaler aPKC-Antikörper

Die isoformspezifischen Aminosäure-Sequenzbereiche der aPKC-Peptide sind in blau dargestellt. Das jeweilige Molekulargewicht umfasst 5,71 kDa (PKC ι/λ) bzw. 6,47 kDa (PKC ζ). Die korrespondierenden Nukleotidsequenzen wurden für die gerichtete Klonierung in den Expressionsvektor pGex-6P an den unterstrichenen Nukleotid-Positionen modifiziert. Dabei wurden für PKC ι/λ die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI/*Sal*I und für PKC ζ *Sma*I/*Xho*I eingeführt.

PKC ι/λ

```
aactgcaaactgctgggttcataagaagtgccacaagctgggtcacaattgagtgtggggga
N C K L L V H K K C H K L V T I E C G G
ttctctttgcccaccggaacccatgatgccaatggaccagaccatgcatccagaccacaca
F S L P P E P M M P M D Q T M H P D H T
cagacagtaattccatataatccttcaagtcatgagagtttgaccacaagttggtgaagaa
Q T V I P Y N P S S H E S L D Q V G E E
aaggaggcaatgaacaccagggagagtggtaaagcggtcgtcgagtctaggtctgcaggat
K E A M N T R E S G K A S S S L G L Q D
```

PKC ζ

```
gtcctcgtcccgctgacctgcccggggcatatggattctgtcatgccttcccaagagcct
V L V P L T C P G H M D S V M P S Q E P
ccagtagatggcaagaacgatgggtgtagaccttcttcagaagaaactgatggaattgct
P V D G K N D G V D L P S E E T D G I A
tatatttcttcatctcggaaacatgataatatcaaagatgattctgaggaccttaagcct
Y I S S S R K H D N I K D D S E D L K P
gtcatcgatgggggtggatgggatcaaaaatctctcagggggtggggctgcaagacttcgac
V I D G V D G I K I S E G L G L Q D F D
```

6.3 Abkürzungsverzeichnis

Average	Mittelwert
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol pro Liter
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
A/P	anterior/posterior
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Rinderserum-Albumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cm	Centimeter
CTP	Cytosintri-phosphat
DAB	Diaminobenzamidin
DAG	sn-1,2-Diacylglycerin
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxygenin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtri-phosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	embryonaler Tag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF1a	Elongationsfaktor 1a
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-Aminoethylether)-N,N',N',-Tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
Fitz	Fluoreszeiniso-thiozyanat
GFP	Grün fluoerszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	<i>hour</i> ; Stunde
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
Ig G	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IPTG	Isopropylthiol-β-D-Galactosidase
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
IHC	Immunhistochemie
IP3	1,4,5-myo-Inositoltri-phosphat
kb	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton
KI	<i>knock-in</i>
KO	<i>knock-out</i>
kb	Kilobasenpaare
M	Mol pro Liter
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MG	Molekulargewicht
MeOH	Methanol
min	Minuten

ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
N	Anzahl
NaOAc	Natrium-Acetat
N-Cadherin	neuronaies Cadherin
NP	Neuropelin
OD	Optische Dichte
P	postnataler Tag
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatpuffer, salzhaltig
<i>p.c.</i>	<i>post coitum</i> ; Zeitpunkt nach der Befruchtung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenium; pH-Wert
PKC	Protein Kinase C
PKD	Protein Kinase D
PMA	Phorbol 12-myristat 13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
Rack	Rezeptor für aktivierte C Kinasen
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion
³⁵ S	Schwefelisotop 35
s.o.	siehe oben
Sp6	Sp6-Bakteriophagen-Promoter
s.u.	siehe unten
SD	<i>standard deviation</i> ; Standardabweichung
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec	Sekunden
SH2	Src-homologe Domäne 2
SSC	Natrium-Citratpuffer, salzhaltig
T7	T7-Bakteriophagen-Promoter
TBS	Tris-Puffer, salzhaltig
TdT	Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEA	Triethanolamin
TGF	<i>tumor growth factor</i>
TRIS	Tris[hydroxymethyl]aminoethan
u.a.	unter anderem
U	Unit (Einheit)
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
VE-Cadherin	vaskuläres Endothel-Cadherin
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe. Ich habe die Dissertation nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Arbeit verwendet und, abgesehen von den angegebenen Teilveröffentlichungen, nicht zuvor publiziert.

Hannover, 29. Juni 2006

(Judit Kovac)

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Gregor Eichele dafür, dass er mir die Gelegenheit gegeben hat, meine Arbeit unter den hervorragenden Laborbedingungen seines Instituts anfertigen zu können. Darüber hinaus danke ich für seine Diskussionsbereitschaft bei wissenschaftlichen Fragestellungen sowie für seine bedingungslose Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. Michael Leitges danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für sein Interesse an den Ergebnissen meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller danke ich herzlich für seine freundliche Unterstützung sowie für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Henrik Oster, der mir mit seiner wissenschaftlichen Kompetenz zur Seite stand. Außerdem danke ich für das äußerst konstruktive Korrekturlesen meines Manuskripts sowie für seine freundschaftliche und unermüdliche Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Gudrun Brandes danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Erstellung der elektronenmikroskopischen Daten und bei deren Interpretation.

Den Dres. Frank Sacher, Diya Abraham, Vladimira Jakubcakova und Lars Geffers danke ich für die vielen hilfreichen Diskussionen bei wissenschaftlichen Fragestellungen. Danke auch für die vielen geselligen und schönen Stunden.

Meiner ehemaligen Kollegin Marion Heuer danke ich für ihr Engagement bei der Elektroporation und der Kultivierung von ES-Zellen. Monika Schindler danke ich für die Durchführung der Blastozysteninjektion, die am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt wurde.

Alexandra Menneking und Nadine Naujokat danke ich für die liebevolle und zuverlässige Pflege meiner Mäuse sowie für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Weiterhin danke ich allen Kollegen für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima, allen voran: Pablo Szendro, Ina Klebba, Stephan Busche, Heike Krause, Sabine Bergmann, Markus Uhr, Jens Mittag, Marija Trajkovic, Sarah Herzog, Maren Bürsing, Sarah Schubert, Alexander Prokscha, Axel Visel, Miki Tsukada, Marei Warnecke, Carsten Möller, Polina Spiess und Andreas Riechel.

Herrn Prof. Dr. Karl Bauer und seiner gesamten Arbeitsgruppe danke ich für das gewährte Asyl im zweiten Stock. Vielen Dank für die Unterstützung in der heißen Phase meiner Doktorarbeit.

Nicht unerwähnt bleiben dürfen meine Eltern, denen ich viel zu verdanken habe. Außerdem bedanke ich mich beim Rest meiner großen Familie und bei meinen Freunden dafür, dass sie für mich da waren und mit mir mitgefiebert haben.

Mein liebevoller Dank gilt Jens Meyer für seine Liebe, Toleranz und Unterstützung, auf die ich mich immer verlassen kann.

Publikationen

Veröffentlichungen

M. Leitges, J. Kovac, M. Plomann, D. Linden.

A unique PDZ ligand in PKC α confers induction of cerebellar long-term synaptic depression.

Neuron. 2004 Nov 18;44(4):585-94.

Pilar Martin, Ricardo Villares, Sandra Rodriguez-Mascarenhas, Angel Zaballos, Michael Leitges, Judit Kovac, Irene Sizing, Paul Rennert, Gabriel Márquez, Carlos Martínez-A, María T. Diaz-Meco, and Jorge Moscat.

Control of T helper 2 cell function and allergic airway inflammation by PKC ζ .

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jul 12;102(28):9866-71. Epub 2005 Jun 29.

Violetta Karwacki, Judit Kovac, Grazia Mauceri, Arne Backhaus, Lisa Föhse, Jörg Schmidtke and Stephanie Schubert.

Tspy is nonfunctional in the Mongolian gerbil but functional in the Syrian hamster.

Genomics. 2006 Apr 18

Judit Kovac, Henrik Oster, Michael Leitges.

Expression of the atypical protein kinase C (aPKC) isoforms ι/λ and ζ during mouse embryogenesis.

Gene Expr Patterns. Received 5 April 2006; revised 26 May 2006; accepted 12 July 2006. Available online 15 July 2006.

Konferenzbeiträge

Kovac J and Leitges M.

Atypical Protein Kinase C (aPKC) in Murine Development.

Presentation and Abstract, GfE school 2004, Ulm

Lebenslauf

Name	Judit-Elisabeth Kovac
Geburtsdatum	20.03.1965
Geburtsort	Hildesheim
Familienstand	ledig
Adresse	Kleine Pfahlstraße 7, 30161 Hannover e-mail: judit.kovac@mpihan.mpg.de
Schulabschluss	1984 Abitur an der Marienschule Hildesheim
Berufsausbildungen	<p>1985-1987 Ausbildung zur PTA an der Pharmazieschule Dr. K. Blindow in Hannover</p> <p>1987-1988 Ausbildungsbezogenes Praktikum in der Zentralapotheke Hannover</p> <p>Juli 1988 Abschlussexamen Erlaubnis zum Führen der Berufsbezeichnung "Pharmazeutisch Technische Assistentin"</p> <p>1997-2002 Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Hannover mit abgeschlossener Diplomprüfung im Januar 2002. Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Mikrobiologie, Spezielle Physiologie</p> <p>Februar bis Oktober 2002 Biologische Diplomarbeit im Institut für Humangenetik der Medizinischen Hochschule Hannover Thema der Diplomarbeit: "Molekulargenetische Untersuchungen zur evolutionären Konservierung von <i>tspy</i> bei der Familie <i>Cricetidae</i>"</p>
Promotion	<p>seit Januar 2003 Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie in Hannover Abteilung Prof. Dr. Gregor Eichele AG Leitges</p>

