

**Funktionelle Charakterisierung von Protein
Kinase C- δ durch *gene targeting* in der Maus**

Inaugural-Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
der Universität zu Köln**

vorgelegt von

**Jochen Klock
aus Bernkastel-Kues**

Freiburg 2000

Referent: Prof. A. Radbruch
Koreferent: Prof. A. Ta rakhovsky

Prüfungsvorsitz: Prof. H. W. Klein
Prüfungstag: 12.05.2000

Abkürzungsverzeichnis:

• α	alpha
• β	beta
• γ	gamma
• δ	delta
• ϵ	epsilon
• η	eta
• θ	theta
• ζ	zeta
• ι	iota
• λ	lambda
• A	Ampère
• aa	Aminosäure (amino acid)
• Abb.	Abbildung
• ad	bis zu
• Ara C	1- β -Arabinofuranosylecytosin
• ATP	Adenosintriphosphat
• BrdU	5-Brom-2-deoxy-Uridin
• BSA	Rinderserumalbumin
• cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
• CDK2	`cyclin-dependent kinase 2'
• CHCl ₃	Chloroform
• CHO	`chinese hamster ovarian cells'
• Ci	Curie
• d	Tag
• DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2.]oktan
• DAG	Diacylglycerin
• DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
• DEPC	Diethylpyrocarbonat
• DIG	Dioxygenin
• DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
• DMF	N,N-Dimethylformamid
• DMSO	Dimethylsulfoxid
• DNA	Desoxyribonukleinsäure
• DNase	Desoxyribonuklease
• dpc	Schwangerschaftstag (day post coitum)
• dpw	Tag post Wundsetzung
• DTT	Dithiothreitol
• ECM	extrazelluläre Matrix
• EDTA	Ethylendiamintetraacetat
• EGF-R	Rezeptor für epidermale Wachstumsfaktoren
• EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -Aminoethylether)-N,N,N',N',-Tetraessigsäure
• EMFI	embryonale Fibroblasten
• ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
• EtOH	Ethanol
• F	Farad
• FCS	fötales Kälberserum
• FGF- β	Fibroblasten-Wachstumsfaktor- β
• Fos	Transkriptionsfaktor
• g	Erdbeschleunigung
• G418	Antibiotikum Geneticin
• h	Stunden
• H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
• HCl	Salzsäure
• IC ₅₀	Konzentration zur Inhibition um 50%
• IgE	Immunglobulin E
• IL	Interleukin
• IGF-R	Rezeptor für Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
• IP ₃	Inositoltriphosphat
• ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
• JAK	Januskinase
• Jun	Transkriptionsfaktor
• Kb	Kilobasenpaare
• KDa	Kilo-Dalton

Abkürzungsverzeichnis

• KGF	Keratinozyten-Wachstumsfaktor
• LB	'Luria-Broth'-Medium
• LiCl	Lithiumchlorid
• M	molar
• MAP	mitogen aktivierte Protein Kinase
• MARCKS	'myristolated alanin-reich C kinase substrate'
• MBP	'myelin basic protein'
• MeOH	Methanol
• MgCl ₂	Magnesiumchlorid
• min	Minute
• min	Minute
• mRNA	Messenger- Ribonukleinsäure
• mt	PKC- δ Mutante
• n	Anzahl
• NaAc	Natriumazetat
• NaCl	Natriumchlorid
• NTP	Adenin-/Thymidin-/Guanin-/Cytosin-Triphosphat
• OD	Optische Dichte
• PBS (w/o)	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (ohne Magnesium und Calcium)
• PBST	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,1% Tween
• PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
• PEG	Polyethylenglykol
• PFA	Para-Formaldehyd
• PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
• PKC	Protein Kinase C
• PMSF	Phenylmethylsulfonyl Florid
• raf	raf-Kinase
• RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
• RFPEC	rat fat epididymal endothelial cells
• RNase	Ribonuklease
• rpm	'rounds per minute'-Schüttelfrequenz
• RT	Raumtemperatur
• RT-PCR	reverse Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion
• s	Sekunde
• s.o.	siehe oben
• SDS	Natriumdodecylsulfat
• sHSP	'small heat shock protein'
• src	src-kinase
• STAT	Transkriptionsfaktor
• T	Threoninrest
• TNF- α	Tumor-Nekros-Faktor- α
• TPA	Tumorpromotor der Phorbolsterklasse
• TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
• U	Einheit
• u.a.	unter anderem
• u.U.	unter Umständen
• ü/N	über Nacht
• V	Volt
• vgl.	vergleiche
• Vol.	Volumen
• wt	Wildtyp
• X-Gal	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid
• μ	mikro

1	Einleitung	1
1.1	Protein Kinase C	1
1.1.1	Protein Kinase C	1
1.1.2	Protein Kinase C- δ	3
1.1.2.1	Zelluläre Lokalisation und Substratspezifität von PKC- δ	4
1.1.2.2	Posttranslationale Modifikation von PKC- δ	5
1.1.2.3	Expression von PKC- δ	6
1.1.2.4	Regulation durch PKC- δ	7
1.2	Die Epidermis und Keratinozyten - unter dem Einfluß von Protein Kinase C.....	8
1.3	Gene Targeting.....	12
1.4	Problemstellung der vorgelegten Arbeit.....	15
2	Material.....	16
2.1	Plasmide	16
2.2	Zelllinie.....	16
2.3	Bakterienstämme	16
2.4	Oligonukleotide	16
2.5	Antikörper	17
3	Methoden	18
3.1	Herstellung kompetenter Bakterien	18
3.1.1	Chemisch kompetente Bakterien:.....	18
3.1.2	Elektrisch kompetente Bakterien:	18
3.2	Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten in Plasmidvektoren.....	19
3.2.1	Isolierung von DNA-Fragmenten.....	19
3.2.2	Dephosphorylierung von Restriktionsenden.....	19
3.2.3	Ligation	19
3.2.4	Transformation.....	19
3.3	Gerichtete Mutagenese.....	20
3.4	DNA-Sequenzierung.....	20
3.4.1	Radioaktive Sequenzreaktion	20
3.4.2	Farbmarkierte Sequenzreaktion.....	20
3.5	Präparation von RNA aus Gewebe und Zellen.....	21
3.6	Reverse Transkription	20
3.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
3.7.1	Klonieren von PCR-Fragmenten	22
3.8	Isolierung von λ-Phagenklonen	23
3.8.1	Herstellung der Bakterien-Phagen-Kultur	23
3.8.2	Screening von Phagenbibliotheken	23
3.8.3	Präparation von Phagen-DNA.....	23
3.9	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	24
3.10	Präparation genomischer DNA aus ES-Zellen	24
3.11	Präparation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien.....	25
3.12	Southern-Blot-Analyse	26
3.13	Zellkultur	27
3.13.1	Gewinnung von Embryonalen Fibroblasten (EMFI's).....	27
3.13.2	Mitomycinbehandlung von EMFIs	27
3.13.3	Kultivierung von Embryonalen Stammzellen.....	28
3.13.4	Transfektion, Selektion und Isolation von rekombinanten ES-Zellen.....	28
3.13.5	Isolation und Kultivierung von primären Maus-Keratinozyten	29

3.14	β-Galaktosidasefärbung von transgenen Mausembryonen	30
3.14.1	Klären der Embryonen.....	31
3.15	In situ-Hybridisierung (ISH).....	31
3.15.1	Präparation von Mausembryonen.....	31
3.15.2	Transkription einer cDNA-Probe	32
3.15.3	Whole-mount ISH von Mausembryonen	32
3.15.4	ISH auf Paraffinschnitten	33
3.16	Anfertigung von histologischen Schnitten	33
3.16.1	Kryostat-Schnitte	33
3.16.2	Mikrotom-Schnitte.....	34
3.16.3	Vibratom-Schnitte.....	36
3.17	Immunfluoreszenz	36
3.17.1	Immunfluoreszenzfärbung auf Kryostatschnitten.....	36
3.17.2	Immunfluoreszenzfärbung auf Zellen	37
3.17.3	Proliferationsanalyse in Keratinozyten	37
3.18	Proteinextraktion aus Gewebe und Zellen	37
3.19	Western-Blot-Analyse	38
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Etablierung eines mutanten Allels für das PKC-δ Gen in der Maus.....	39
4.1.1	Charakterisierung des genomischen Lokus des PKC-δ Gens in der Maus	39
4.1.2	Klonierung des lacZ-targeting-Vektor für das Maus PKC-δ Gen	41
4.1.3	Etablierung und Charakterisierung von homolog rekombinierten ES-Zellklonen.....	43
4.1.4	Etablierung einer PKC-δ defizienten Mauslinie.....	46
4.2	Expressionanalyse des PKC-δ Gens in der Mausentwicklung.....	48
4.3	Analyse des Phänotyps PKC-δ defizienter Mäuse.....	54
4.3.1	Potentielle Verhaltensanomalien.....	54
4.3.2	Immunologischer Einfluß auf die Lebenserwartung?	58
4.3.3	Epidermis und Keratinozyten.....	62
4.3.3.1	In vivo-Wundheilung.....	63
4.3.3.2	Keratinozyten	69
4.3.3.2.1	Adhäsion von Keratinozyten.....	70
4.3.3.2.2	Proliferation von Keratinozyten.....	74
4.3.3.2.3	Migration der Keratinozyten.....	78
5	Diskussion.....	85
5.1	Generierung einer PKC-δ mutanten ES-Zelllinie durch homologe Rekombination	85
5.2	Etablierung einer PKC-δ defizienten Mauslinie.....	86
5.3	Expression des PKC-δ/lacZ Fusionsproteins in der Mausentwicklung.....	87
5.4	Besteht ein funktionaler Zusammenhang zwischen neuronaler PKC-δ.....?	89
5.5	Beeinflußt der immunologische Phänotyp die Lebenserwartung der PKC-δ	91
5.6	Der Einfluß von PKC-δ während der Wundheilung.....	92
5.6.1	Die Adhäsion als ein Prozeß der Wundheilung	93
5.6.2	Wie kontrolliert PKC-δ den Zellzyklus?	95
5.6.3	Wie reguliert PKC-δ die Migration?	97
6	Zusammenfassung.....	100
7	Anhang.....	101
7.1	Literaturverzeichnis	101

1 Einleitung

1.1 Protein Kinase C

1.1.1 Protein Kinase C

Protein Kinase C (PKC) Enzyme gehören zu der Familie Ser-/Thr-spezifischer Kinasen. Sie wurden zum ersten Mal 1977 von Nishizuka (Takai et al., 1977) als proteolytisch aktivierte Kinasen im Rindergehirn beschrieben. Heute wird davon ausgegangen, daß PKC eine zentrale Rolle in wichtigen Prozessen der Signalübertragung eukaryontischer Zellen, wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Bredel and Pollack, 1997; Deacon et al., 1997; Schonwasser et al., 1998) spielen. Derartige Signalwege können durch spezifische extrazelluläre Signale, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Hormone oder Neurotransmitter (Rhee, 1991; Rozengurt, 1998; Vaughan et al., 1998) und deren meist membranständige Rezeptoren, wie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Antigen-Rezeptoren oder Integrinen ausgelöst werden (Bredel and Pollack, 1997; Kanashiro and Khalil, 1998; Keenan and Kelleher, 1998; Keenan et al., 1997; Rozengurt, 1998; Wilkinson and Nixon, 1998; Woods and Couchman, 1992). Die Weiterleitung der extrazellulären Signale erfolgt dann über intrazelluläre Signalkaskaden. Ein aktuelles Beispiel dafür ist die JAK-STAT-Signalkaskade. Hier werden STAT-Moleküle von der Januskinase aktiviert, welche dann im Nukleus als Transkriptionsfaktoren fungieren. Eine andere Möglichkeit ist der Hormonsignalweg über den sekundären Botenstoff cAMP und weiter zu Protein Kinase A. Ein weiterer beispielhafter Signalweg ist die Kaskade der MAP Kinasen, die ausgehend von den Kinasen Raf bis zu den ERK-Kinasen letztendlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. Jun oder Fos führen.

Innerhalb der verschiedenen Signalkaskaden kommt es zur Rezeptor-vermittelten Aktivierung von Phospholipase C oder D. In der Folge werden unter anderem bestimmte Membranlipide (PIP₂) hydrolysiert. Dadurch entsteht Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG), die als intrazelluläre sekundäre Botenstoffe bekannt sind und das extrazelluläre Signal weiterleiten und verstärken (Glazer, 1998; Nishizuka, 1984). Für DAG wurde gezeigt, daß es

als endogener Aktivator für PKC Enzyme fungiert, während IP₃ den zytoplasmatischen Calcium-Spiegel hochreguliert und damit zur vollständigen Aktivierung der *klassischen* PKC-Isoformen führt (Hodgkin et al., 1998). Langzeiteffekte wie Proliferations- oder Differenzierungsprozesse erfordern aber einen länger anhaltenden Stimulus, der entweder durch eine kontinuierliche Produktion von DAG oder ungesättigte Fettsäuren erreicht wird (Billah and Anthes, 1990; Hodgkin et al., 1998; Nishizuka, 1992).

Weiterführende Untersuchungen in Säugerzellen haben PKC als den Hauptrezeptor für Tumorpromotoren der Phorbolsterklasse (z.B. TPA) und dessen Derivate identifiziert (Parker et al., 1984). TPA ist in der Lage die Rezeptor-vermittelte PKC-Aktivierung zu umgehen und führt aufgrund konstitutiver Bindung an PKC zu einer anhaltenden Aktivierung (Aihara et al., 1991; Kiss, 1996). Nach Aktivierung translozieren PKC Enzyme, dessen Tatsache als ein Kriterium in der Analyse verwendet wird (Csukai and Mochly-Rosen, 1999; Newton and Johnson, 1998). Das bedeutet, daß inaktive cytoplasmatische oder membranassoziierte Enzyme nach ihrer Aktivierung an andere Membrankompartimente oder Zytoskelettstrukturen translozieren und dort ihre spezifischen Substrate phosphorylieren. Die PKC Familie läßt sich aufgrund struktureller Kriterien in drei unterschiedliche Gruppen

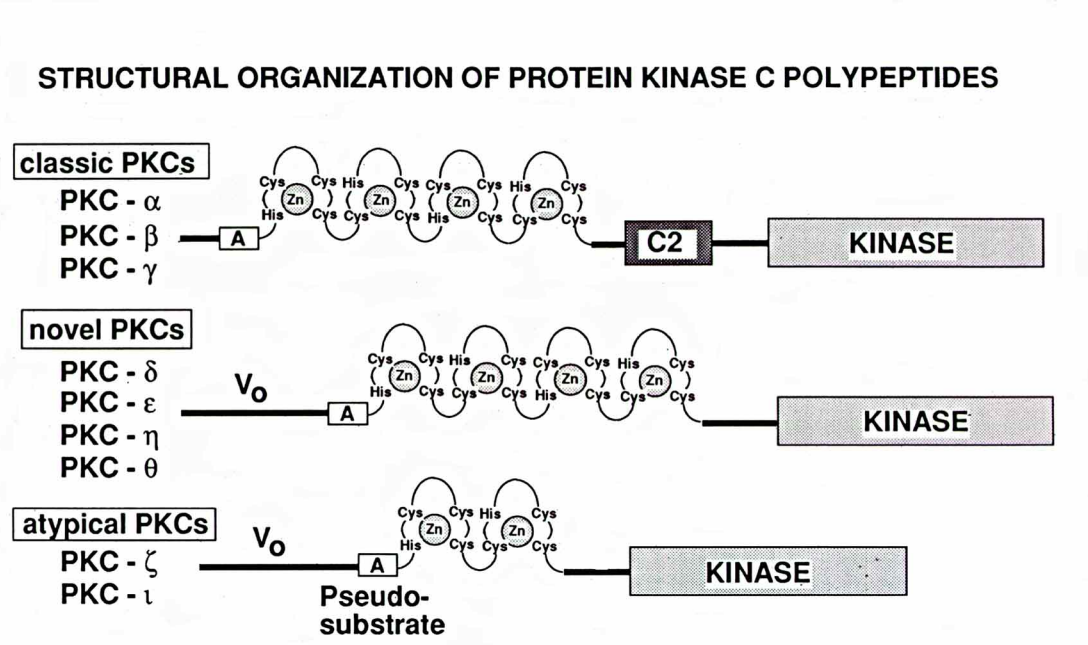


Abb. 1: Struktureller Aufbau der Proteinkinase C Familie: Die katalytische Domäne ist durch die Box 'Kinase' dargestellt. Die *klassischen* PKCs besitzen eine konservierte C2-Region. Eine Zinkfingerregion der regulatorischen Domäne bindet 2 Zinkionen und die N-terminale Pseudosubstratregion ist mit 'A' bezeichnet. 'V₀' kennzeichnet den verlängerten N-Terminus der *neuen* und *atypischen* PKCs. Ref.: (Stabel, 1994).

unterteilen (Mellor and Parker, 1998) (Abb. 1). In der ersten Gruppe, den sogenannten *klassischen* PKCs, werden die Isoformen α , β_I , β_{II} und γ zusammengefaßt. Zu der Gruppe der *neuen* PKCs zählen die Isoformen δ , ϵ , η und θ . Die *atypischen* PKCs ι/λ und ζ stellen die letzte Gruppe dieser Proteinfamilie dar (Mellor and Parker, 1998).

Allen Mitgliedern der PKC Familie gemeinsam ist eine katalytische Domäne am Carboxyterminus mit 2 konservierten Regionen (C3 und C4), die für die ATP- und die katalytische Aktivierung verantwortlich sind (Ono et al., 1988). Der Aminoterminalende der PKC Proteine stellt die sogenannte regulatorische Domäne dar. Diese besteht aus der konservierten Region C1 und einer Pseudosubstratsequenz, deren Funktion die Suppression der Enzymaktivität bei fehlendem Stimulus ist. Die C1-Region setzt sich aus 2 Zinkfingerdomänen zusammen, deren Cystein-reiche Konsensussequenzen jeweils 2 Zinkionen binden können. Diese Zinkfingerstrukturen formen eine Grube, in die DAG- oder Phorbolster bindet. Typisch für alle PKC-Enzyme sind potentielle Bindungsstellen für Lipid-Kofaktoren wie z.B. Phosphatidylserin in der C1-Region (Kazanietz et al., 1995; Zhang et al., 1995). Die C2-Domäne tritt nur bei den *klassischen* PKCs auf und vermittelt die Calcium-Sensitivität des Enzyms, während die *neuen* und *atypischen* PKC-Isoformen einen verlängerten Aminoterminalende besitzen, dessen Funktion noch unklar ist (Kanashiro and Khalil, 1998). Die *atypischen* PKC-Enzyme sind aufgrund nur einer Zinkfingerdomäne nicht mehr in der Lage DAG oder TPA zu binden und aktiviert zu werden.

1.1.2 Protein Kinase C- δ

PKC- δ gehört der Gruppe der *neuen* PKCs an (s. Abb. 1) (Stabel, 1994). Dieses Isoenzym wurde erstmals 1986 von F. Marks beschrieben (Gschwendt et al., 1986). PKC- δ wurde aus Maus-Epidermisgewebe als ein PKC-ähnliches Enzym isoliert, das mit Phorbolestern und Phospholipiden stimuliert werden kann, dem aber die Calcium-Sensitivität fehlte (Gschwendt et al., 1986). Die Klonierung der cDNA erfolgte ein Jahr später aus dem Gehirn der Ratte (Ono et al., 1987).

Im menschlichen Genom ist das PKC- δ Gen auf Chromosom 3 und in dem der Maus auf Chromosom 14 lokalisiert (Huppi et al., 1994). Die transkribierte mRNA besitzt eine Größe von 2,9 Kb, die in ein Protein von 673 aa translatiert wird und einem Molekulargewicht von 77 KDa entspricht (Ono et al., 1988).

1.1.2.1 Zelluläre Lokalisation und Substratspezifität von PKC- δ

Anhand von Überexpressions-, Stimulations- und Inhibitionsstudien wurde versucht eine Isoform-spezifische Funktion von PKC- δ abzuleiten. Hierbei stellte sich heraus, daß Funktion und zelluläre Lokalisation von PKC- δ von Zelllinie zu Zelllinie variieren kann – wie dies für andere PKC Isoformen auch gezeigt wurde - und somit jeweils in Abhängigkeit vom Zelltyp bzw. Gewebe zu sehen sind. So konnte z.B. in Maus-Swiss-3T3-Fibroblasten gezeigt werden, daß PKC- δ im unstimulierten Zustand perinukleär, sowie in bestimmten Bereichen des Zell-Zell-Kontakts lokalisiert ist. Nach Stimulation mit Phorbol ester erfolgt eine Translokation von PKC- δ in die Adhäsionspunkte ('focal adhesions') und teilweise entlang von Aktinfilamenten der Stressfasern, was zu einer Modulation der Zellmorphologie sowie der Migration führt (Barry and Critchley, 1994).

Im Gegensatz dazu konnte PKC- δ nach Überexpression in NIH 3T3 Fibroblasten im Zytoplasma und perinukleär nachgewiesen werden. Eine TPA-Stimulation hat hier eine Translokation an die Zellmembran und an Golgi-Organellen zur Folge, wie durch Koexpression eines Golgi-Markers Mannosidase II gezeigt wurde. Die Folge ist eine verlangsamte Wachstumsrate der Zellen sowie die Beeinflussung des Proteintransports der Zelle (Goodnight et al., 1995).

Somit zeigt sich sogar in zwei unterschiedlichen Fibroblastenlinien eine unterschiedliche Lokalisation und damit auch eine Variation der spezifischen Funktion von PKC- δ .

Mögliche spezifische *in vivo* Funktionen der PKC- δ Isoform kann sich aus der intrinsischen, nach einer Modifikation erwachsenden Substratspezifität und aus einer spezifischen Lokalisation des Isoenzym mit Hilfe verschiedener Ankerproteine ergeben. PKC- δ spezifische Substrate lassen sich entweder aufgrund einer vorhandenen Konsensussequenz und einer Kolo-kalisation sowie durch den Nachweis einer spezifischen Phosphorylierung ableiten.

Ein Beispiel für ein PKC- δ spezifisches Substrat mit noch unbekannter Erkennungssequenz ist der Immunglobulin E (IgE)-Rezeptor. Eine Aktivierung des hochaffinen IgE-Rezeptors in Mastzellen oder Basophilen durch IgE und Antigen führt zur Initiierung von Signalwegen, angefangen mit der intrazellulären Phosphorylierung der Untereinheiten des IgE-Rezeptors und in der Folge zu einer allergischen Reaktion. PKC-Aktivierung durch den Phorbol ester TPA führt teilweise zu einem ähnlichen Zell-Phänotyp wie nach Antigen-Aktivierung. Durch

Immunpräzipitation wurde nachgewiesen, daß PKC- δ - nach Aktivierung in basophilen Leukemiazellen der Ratte - an die β -Kette des hochaffinen IgE-Rezeptors bindet. Gleichzeitig wird nur die γ -Kette an einem Threonin-Rest phosphoryliert, was u.a. zur Internalisierung des IgE-Rezeptors führt und damit als indirekter Nachweis eines spezifischen PKC- δ Substrats angeführt wird (Germano et al., 1994).

Troponin I ist *in vitro* als ein weiteres Substrat von PKC- δ nachgewiesen worden. Aktomyosin Magnesium-ATPase als molekularer Motor der Muskelkontraktion wird z.B. von dem Troponinkomplex reguliert, indem z.B. die Untereinheit Troponin I die ATPase-Aktivität inhibiert. Durch *in situ*-Phosphorylierung und mit Phosphopeptiden konnte gezeigt werden, daß Troponin I selektiv unter den PKC Isoformen von PKC- δ am Serin-Rest 23/24 phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung führt zu einer verminderten Calcium-Sensitivität der Aktomyosin-MgATPase, die letztendlich die ATPase-Aktivität inhibiert (Jideama et al., 1996). PKC-Enzyme insbesondere PKC- δ haben somit nicht nur eine Funktion der Signalweiterleitung im Rahmen der Transkriptionregulation von 'immediate early genes', sondern sind auch in intrazelluläre Prozesse involviert, die z.B. die Zellmorphologie und Sekretionsprozesse modulieren.

1.1.2.2 Posttranslationale Modifikation von PKC- δ

Posttranslationale Modifikationen regulieren zum einen an zellulären Proteinleveln durch Beeinflussung der Translationsrate oder des Degradationsprozesses und zum anderen die Regulation der Enzymaktivität. Eine Möglichkeit der posttranslationalen Regulation von PKC- δ ist die Phosphorylierung des Enzyms selbst. Eine der nachgewiesenen *in vivo* Autophosphorylierungsstellen von PKC- δ stellt der Serin-Rest 643 dar, der die Enzymaktivität entscheidend beeinflusst (Gschwendt et al., 1995; Li et al., 1997; Stempka et al., 1999). Mittels gerichteter Mutagenese konnten ebenfalls mehrere Tyrosin-Reste (52, 187, 512, 523) nachgewiesen werden, die als mögliche *in vivo* Phosphorylierungsstellen von PKC- δ fungieren können (Li et al., 1996; Szallasi et al., 1995). Die detaillierte Konsequenz der Enzymphosphorylierung für einen jeweiligen Zelltyp ist jedoch noch nicht exakt geklärt. Allerdings ist gezeigt worden, daß die Tyrosin-Phosphorylierung die Enzymaktivität für bestimmte Substrate erhöht bzw. erniedrigt und dadurch einzelne Signalwege an- oder abgeschaltet werden können (Gschwendt, 1999). So führt z.B. die Tyrosinphosphorylierung von PKC- δ nach der Stimulation des Insulin-like Wachstumsfaktor-Rezeptor (ILGF-R) zu

einer erhöhten Enzymaktivität und damit zur Zelltransformation (Li et al., 1998). Ein anderer Stimulus konnte zeigen, daß PKC- δ *in vitro* durch src-Kinase mit Hilfe von Kofaktoren an einem Tyrosinrest phosphoryliert wird, wodurch die Substratspezifität für MBP (myelin basic protein) und Histon-III signifikant erhöht wird (Gschwendt et al., 1994). Im Gegensatz dazu bewirkt eine Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) zu einer Verminderung der Enzymaktivität (Denning et al., 1993; Szallasi et al., 1995) (Denning et al., 1996).

Eine andere posttranslationale Modifikation von PKC- δ ist die Phosphorylierung des Threoninrestes (T) 505 in der Aktivierungsschleife der enzymatischen Aktivität. Mit *in vitro* Experimente konnte belegt werden, daß T505 von der Protein Kinase PDK1 phosphoryliert wird und zum Anstieg der Enzymaktivität führt (Le et al., 1998). Für die *klassischen* PKCs ist diese Phosphorylierung physiologisch essentiell, für die atypische PKC- ζ führt es auch *in vivo* zu einer erhöhten Enzymaktivität, während die physiologische Relevanz für PKC- δ noch kontrovers diskutiert wird. Eine zweite Hypothese ist, daß die negative Ladung der Glutaminsäure 500 für die *in vivo* Enzymaktivität verantwortlich ist (Gschwendt, 1999).

1.1.2.3 Expression von PKC- δ

Die Expression von PKC- δ - sowie auch der anderen PKC Isoformen - können je nach Zelltyp stark variieren. Gewebespezifische Expressionanalysen von PKC- δ sind bislang nur sehr spärlich durchgeführt und beschrieben, so daß auch über die *in vivo* Funktionen mehr oder minder nur spekuliert werden kann. Zum Einen ermöglichen verschiedene Stimuli eine unterschiedliche Modulation von PKC- δ und zum Anderen wird PKC- δ weder ubiquitär exprimiert noch in unterschiedlichen Zelltypen gleich reguliert.

Z.B.: In unreifen und reifen Oozyten der Maus ist eine Expression von PKC- δ mit einer Co-Expression der atypischen PKC- ι detektierbar, während alle anderen PKC Isoformen nicht nachweisbar sind (Gangeswaran and Jones, 1997). Diese Tatsache läßt auf eine spezifische Funktion von PKC- δ und - ι während der Fertilisation schließen. In der Spermatogenese der Maus ist die Expression des PKC- δ Gens spezifisch im sogenannten Spermatidenstadium, jedoch bleibt die genaue Funktion noch unklar (Um et al., 1995).

Ein weiteres Beispiel für eine *in vivo* Expression von PKC- δ ist die Entwicklung der Ovarien der Ratte während der Schwangerschaft. Hier konnte gezeigt werden, daß PKC- δ in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft durch einen Östrogen-abhängigen Signalweg in einem Teil

der Ovarien (Corpus Luteum) hochreguliert wird, während das Expressionslevel von PKC- α , - β und - ζ in diesem Differenzierungsprozeß unverändert bleibt (Cutler et al., 1994).

Das Expressionsmuster für PKC- δ im Gehirn ist sowohl entwicklungspezifisch, als auch regional spezifisch reguliert (Jiang et al., 1994; Kim et al., 1992). Durch *in-situ* Hybridisierung und Northern-Blots konnte eine Expression von PKC- δ im gesamten Thalamus von adulten Mäusen detektiert werden (Kim et al., 1993; Kim et al., 1992). Da der Thalamus mit Instinktverhalten in Verbindung gebracht wird, läßt das PKC- δ Expressionsmuster eine Funktion in der Beeinflussung des Instinktverhaltens vermuten. Eine weitere PKC- δ Expression konnte in den Purkinje-Zellen und der molekularen Schicht des Zerebellum durch *in-situ* Hybridisierung nachgewiesen werden (Chen and Hillman, 1994; Kim et al., 1992). Die funktionale Verbindung mit der Expression könnte hier ein Einfluß im Koordinationsverhalten bzw. in der Motorik sein. Der Hippocampus, der eine wichtige Funktion im Lernverhalten besitzt, zeigt im Immunoblot eine PKC- δ Expression und damit eine potentielle Verbindung zur Funktion von PKC- δ (Jiang et al., 1994). Außerdem wird nach einer lokalen Ischämie im Gehirn spezifisch die Transkription von PKC- δ im ischämischen Zentrum und in angrenzenden Bereichen induziert. Andere PKC Isoformen sind zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisbar, das auf eine Isoform-spezifische Funktion schließen läßt (Miettinen et al., 1996). Entsprechend mehrerer publizierter Arbeiten ist PKC- δ auch in hämatopoetischen Zellen wie z.B. in B-Zellen und T-Zellen exprimiert (Mischak et al., 1991; Mischak et al., 1991; Saharinen et al., 1997; Volkov et al., 1998). Aber auch in anderen Organen der Maus wie z.B. in Epithelzellen der Lunge, in Myokard-Zellen, in der Leber und der Niere ließ sich eine PKC- δ Expression nachweisen (Dwyer et al., 1994; Jideama et al., 1996; Wetsel et al., 1992). Zusammenfassend wird PKC- δ in unterschiedlichen Zelltypen bzw. Geweben exprimiert, zeigt aber trotzdem kein ubiquitäres Expressionsmuster.

1.1.2.4 Regulation durch PKC- δ

Funktionelle Daten über PKC- δ stammen primär aus Analysen, die mit etablierten Zelllinien durchgeführt wurden. In humanen Leukämiezellen werden z.B. verschiedene Apoptosewege über PKC- δ weitergeleitet. Apoptose-induzierende Stimuli, wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), anti Fas-Antikörper oder Spingomyelinase, haben die Generierung von Ceramid, eines Lipid-Signalmolekül, zur Folge. Dieser Aktivierungsmechanismus der Apoptose bewirkt gleichzeitig eine Translokation von PKC- δ und - ϵ ins Zytosol, das hier einer Aktivierung

gleichkommt (Sawai et al., 1997). Im Gegensatz hierzu bewirkt 1- β -Arabinofuranosylzytosin (Ara C), ein sehr effektives Agens in der Behandlung von akuten myeloischen Leukämien, eine Induktion der Apoptose. Die selektive proteolytische Spaltung der PKC- δ Isoform durch die CPP32 Protease aktiviert PKC- δ konstitutiv und es kommt zur Translokation in den Nukleus (Datta et al., 1996; Ghayur et al., 1996).

Die Überexpression von PKC- δ in Endothelzellen der Ratte (RFPEC) oder in Ovarialzellen des Hamsters (CHO) führt zur Inhibition der Proliferation als ein Beispiel der Zellzykluskontrolle, während PKC- α , - β und - ζ keinen Effekt zeigen. Die Überexpression von PKC- δ bewirkt eine Akkumulation der Zellen in der G2/M Phase des Zellzyklus bei CHO-Zellen und in der S-Phase bei RFPEC-Zellen (Harrington et al., 1997; Watanabe et al., 1992). Welches Zellzyklusprotein von PKC- δ phosphoryliert wird, ist allerdings noch nicht geklärt.

1.2 Die Epidermis und Keratinozyten unter dem Einfluß von Protein Kinase C

Die Epidermis gehört im Bereich der Säugetiere als äußere Schicht zum Organ Haut und grenzt den Organismus von seiner Umwelt ab. Aufgrund ihrer äußeren Lage hat die Epidermis vielfältige Funktionen zu übernehmen. Sie dient nicht nur als eine mechanische Schutzhülle gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen, sondern stellt auch in Zusammenarbeit mit dem Immunsystem die erste immunologische Barriere gegenüber eindringenden Fremdkörpern dar. Außerdem ist die Epidermis eines der wenigen Organe, die in der Lage sind sich selbstständig zu regenerieren. Dieses vielschichtige Epithelium ist ektodermalen Ursprungs und besteht hauptsächlich aus Keratinozyten in unterschiedlichen Differenzierungsstadien. Die Verbindung zwischen Dermis und Epidermis bildet die Basallamina in Form einer extrazellulären Matrix (Abb. 2). Die basale Zellschicht, das Stratum germinativum, sorgt für die Regeneration der Epidermis, während die darüber liegenden Schichten vom Stratum spinosum über Stratum granulosum bis hin zum Stratum corneum unterschiedliche Stadien der Differenzierung

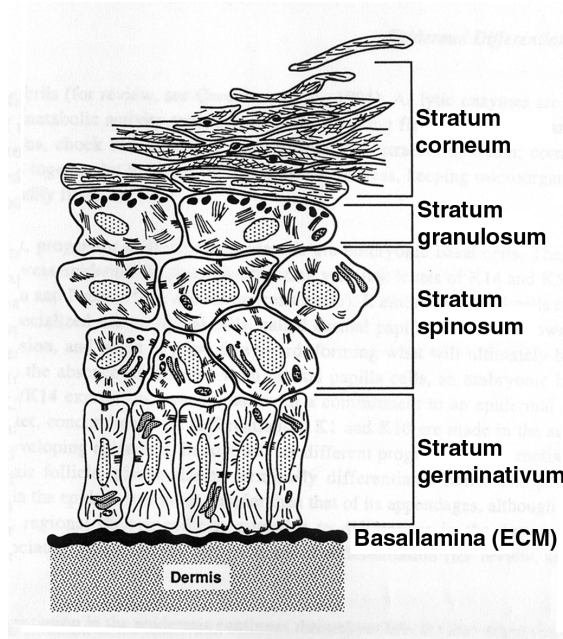


Abb. 2: Schematische Darstellung der Epidermis: Aufbau und Unterteilung in 4 epidermale Schichten in Korrelation zur terminalen Differenzierung. Ref.: (E.Fuchs, 1994)

darstellen. Durch fortwährende Keratineinlagerungen bildet sich hier ein mechanisch stabiles Epithel aus (Abb. 2) (Gilbert, 1997; Holbrook, 1994).

Die Funktionen der einzelnen PKC Isoformen in der Epidermis bzw. den Keratinozyten ist aufgrund dem allgemeinen Problem fehlender Isoform-spezifischer Inhibitoren und Aktivatoren bzw. fehlender experimenteller Ansätze noch weitgehend unklar. In primären Keratinozyten konnten mittels Northernblot-Analyse die klassische Isoform PKC- α , die neuen PKC- δ , - ϵ , - η und die atypische PKC- ζ detektiert werden (Dlugosz et al., 1992). Weiterhin wurde mittels Westernblot-Analysen eine starke Expression der PKC- δ Isoform nachgewiesen, was auf eine wichtige Rolle in der Epidermis der Maus schließen läßt (Gschwendt et al., 1986; Wang et al., 1993). Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß PKC- δ in allen epidermalen Schichten vertreten ist, während z.B. die neue PKC- η Isoform im Stratum germinativum mittels Immunohistochemie und *in-situ*-Hybridisierung nicht detektierbar ist. Erst mit dem Grad der Epidermidifferenzierung steigt auch der Expressionslevel von PKC- η an, was eine Funktion von PKC- η während der terminalen Differenzierung vermuten läßt (Osada et al., 1993). Insgesamt lassen sich in Keratinozyten mindestens 5 verschiedene PKC Isoformen nachweisen, die an Prozessen wie der Modulation von Adhäsion, Proliferation und Migration beteiligt sein können.

Die Proliferation ist in der Epidermis auf das Stratum germinativum begrenzt, das damit die wichtige Aufgabe der Regeneration der Epidermis übernimmt (Abb. 2). In humanen Keratinozytenzelllinien konnte die Beteiligung von PKC an proliferativen Prozessen gezeigt

werden (Hegemann et al., 1992). So konnte beispielsweise die Proliferationsrate dieser Zellen mit verschiedenen PKC Inhibitoren dosisabhängig reduziert werden.

Ein weiterer Versuchsansatz die Rolle der einzelnen PKC Isoformen in der Epidermis zu analysieren, stellt die Untersuchung der Entwicklung von Papilloma und Hautkarzinoma mit Hilfe von oncogenem ras^{HA} in Keratinozyten dar. Es konnte gezeigt werden, daß die Papilloma- und Karzinomentwicklung in der Haut positiv von PKC beeinflusst wird (Yuspa, 1998). Nach ras^{HA} Transformation von Mauskeratinozyten wird unter anderem der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF-R) stimuliert, was zur Aktivierung der src-Kinase führt, die wiederum zu einer Tyrosinphosphorylierung von PKC- δ führt und dadurch die Enzymaktivität herabsetzt (Denning et al., 1996). *In vitro* kann auch PKC- ϵ , - η und - ζ , aber nicht PKC- α , von der src-Kinase phosphoryliert werden. Die erhöhte PKC- α Expression in Verbindung mit einer verringerten Aktivität von PKC- δ in ras^{HA} transformierten Keratinozyten korreliert mit einer verstärkten AP-1 Expression, sowie der Expression von Neoplasie-charakteristischen Markergenen (Yuspa, 1998). In primären Mauskeratinozyten und Keratinozytenzelllinien führt eine Tyrosinphosphorylierung von PKC- δ zu einer verminderten Enzymaktivität. Diese Tyrosinphosphorylierung kann z.B. durch EGF-Stimulation induziert werden (Denning et al., 1993).

Innerhalb der Proliferationsanalyse ist die Erforschung der Rolle einzelner PKC-Isoformen in der Zell-Zyklus-Regulation in primären Mauskeratinozyten ein wichtiger Punkt (Ishino et al., 1998). Im Gegensatz zur allgemein gültigen Annahme, daß PKC Aktivierung zum Anstieg der Proliferationsrate führt, bewirkt eine TPA Stimulation in Keratinozyten eine dosisabhängige Inhibition des Wachstums während der Transition von der G1- zur S-Phase. Der gleiche Effekt wird durch Überexpression von PKC- δ und - η erreicht, während die klassische PKC- α und die atypische PKC- ζ Isoform keinen regulatorischen Einfluß auf den Zellzyklus besitzen. Eine detaillierte Analyse hat gezeigt, daß der Effekt auf eine verminderte Aktivität der Zyklus-abhängigen Kinase 2 (CDK2) zurückzuführen ist. Wachstum und Proliferation von Keratinozyten werden somit entscheidend durch PKC-abhängige Signalwege reguliert.

PKC-Isoformen spielen weiterhin eine Rolle in Zelladhäsion und Migration. Die funktionale Zelladhäsion bedarf einer Verknüpfung zwischen Zytoskelett und Oberflächenrezeptoren, die an Proteine der ECM oder an benachbarte Zellen binden. Die Fähigkeit der Migration von Keratinozyten ist eine wichtige Funktion während der Reepithelialisierung im

Wundheilungsprozeß. Hierbei werden nicht nur die Adhäsionskomplexe moduliert, sondern auch das Aktinzytoskelett dynamisch reorganisiert. Werden humane Keratinozyten mit TPA oder mit Wachstumsfaktoren stimuliert, tritt bei unveränderter Adhäsion eine verminderte Migration auf. Dieses Ergebnis der Inhibition der Migration läßt auf einen negativen Effekt während der Reorganisation des Aktinzytoskelettes schließen (Masson-Gadais et al., 1997). Währenddessen wird der Aufbau von Stressfasern induziert und das Zytoskelett-Netzwerk völlig degradiert. Verschiedenen PKC Inhibitoren verringern die Migration und gleichzeitig aber auch die Adhäsion drastisch, was mit einem Zusammenbruch des Zytoskelettes und einer Disorganisation der Adhäsionspunkte ('focal contacts') korreliert. Die TPA-Stimulation beeinflußt auch die Organisation des Zell-Zell-Kontakts in Keratinozyten. In den Zonula adherens kommt es nach TPA-Stimulation beispielsweise zur Delokalisation von Vinkulin und E-Cadherin (Blum et al., 1994). PKC Stimulation und Inhibition führt in Keratinozyten zu einer Vielzahl von teilweise gegensätzlichen Effekten, da immer mehrere PKC Isoformen gleichzeitig beteiligt sind.

Auch in spezifischen Prozessen der Wundheilung ist PKC funktional beteiligt. Während der Wundheilung exprimieren und sekretieren Keratinozyten die Protease Kollagenase1, um ihre eigene Migration durch Spaltung von Kollagen zu begünstigen. Die Expression der Kollagenase wird über einen PKC-abhängigen Signalweg induziert. Dies ist mittels des PKC-Aktivators DAG und verschiedener PKC-Inhibitoren gezeigt worden (Sudbeck et al., 1994).

Die Feinregulation von Proliferation und Differenzierung in Keratinozyten ist die Grundlage für ein vielschichtiges Epithel. Die terminale Differenzierung ist z.B. ein Calcium-abhängiger Prozeß und kann daher in Keratinozytenkultur induziert werden. Eine Beteiligung von PKC- α an der Expression von Differenzierungsmarkern, wie Lorikrin, Filaggrin und Transglutaminase1 ist mit Hilfe von PKC-Inhibitoren und antisense Oligonukleotiden gezeigt worden (Lee et al., 1997; Stanwell et al., 1996; Stanwell et al., 1996). Als Folge der Translokation und Aktivierung von PKC- α an Membranstrukturen erfolgt im Nukleus die Expression der Differenzierungsgene über die Modulation von Transkriptionsfaktoren der Jun- und Fos-Familie (Rutberg et al., 1996). In Maus-Keratinozyten transloziert PKC- δ während der terminalen Differenzierung an Membranstrukturen sowie an das Zytoskelett, während PKC- ϵ und - ζ nur am Zytoskelett zu finden sind (Stanwell et al., 1996; Stanwell et al., 1996). Allerdings ist die Isoform-spezifische PKC-Funktion noch unklar. Wie oben

erwähnt (S. 17) kommt es nach Überexpression von PKC- δ und - η in humanen Keratinozyten zur verminderten Proliferation und morphologischer Veränderungen mit gleichzeitiger Expression des frühen Differenzierungsmarkergens Transglutaminase1 (Ohba et al., 1998). In einer weiteren Studie wurde ein Cholesterolmetabolit als Stimulus verwendet, der während der späten Differenzierung im Stratum granulosum hoch exprimiert ist (Denning et al., 1995). In Folge dieser Stimulation konnte eine Translokation sowie eine erhöhte Kinaseaktivität von PKC- ϵ , - η und - ζ , aber nicht von PKC- α und - δ festgestellt werden. Diese PKC-Aktivierung korreliert mit der Suppression der frühen Differenzierungsgene Keratin 1 und 10, sowie der Expression der späten Differenzierungsgene Lorikrin und Filaggrin.

Eine weitere Funktion der Epidermis ist das Abstoßen von UV-geschädigten Keratinozyten, die durch Induktion von Apoptose eingeleitet wird (Denning et al., 1998). Innerhalb dieses Apoptosesignalweges wird die Aktivität der Protease Caspase 3 induziert und gleichzeitig ist PKC- δ nur noch als katalytisch aktive Form (konstitutiv aktiv) nachzuweisen. Da dieser Apoptoseweg nicht durch TPA induzierbar, allerdings durch Aktivierung der atypischen PKC- ζ und - ι inhibierbar ist, spielt nur PKC- δ eine entscheidende funktionelle Rolle in der UV-induzierten Apoptose.

Zusammenfassend zeigt PKC eine wichtige Funktion in verschiedenen Prozessen der Epidermis, allerdings sind die Isoform-spezifischen Aufgaben noch weitestgehend unklar.

1.3 Gene Targeting

Genetisch bedingte Erkrankungen weisen zwischen Mensch und anderen Säugern, wie der Maus, physiologisch relevante Parallelen auf. Somit ist die Maus ein ideales Tiermodell für die Erforschung von Krankheiten. Das Verständnis der Krankheiten erfordert aber gleichzeitig die Erforschung der Grundlagen, welche auch zunehmend auf Mausmodelle angewiesen sind, wenn es um Fragen über *in vivo* Funktionen oder Regulation bestimmter Gene bzw. deren Produkte geht. Durch Einführung fremder DNA (Transgen) in das Mausgenom können die Auswirkungen von Mutationen untersucht, Krankheitsmodelle aufgestellt oder aber Genprodukte funktionell erforscht werden.

Das *gene targeting* zur Etablierung einer sogenannten Knockout-Maus ist heute eine weitverbreitete und effektive Methode zur Evaluierung von Genprodukten. Diese Technik

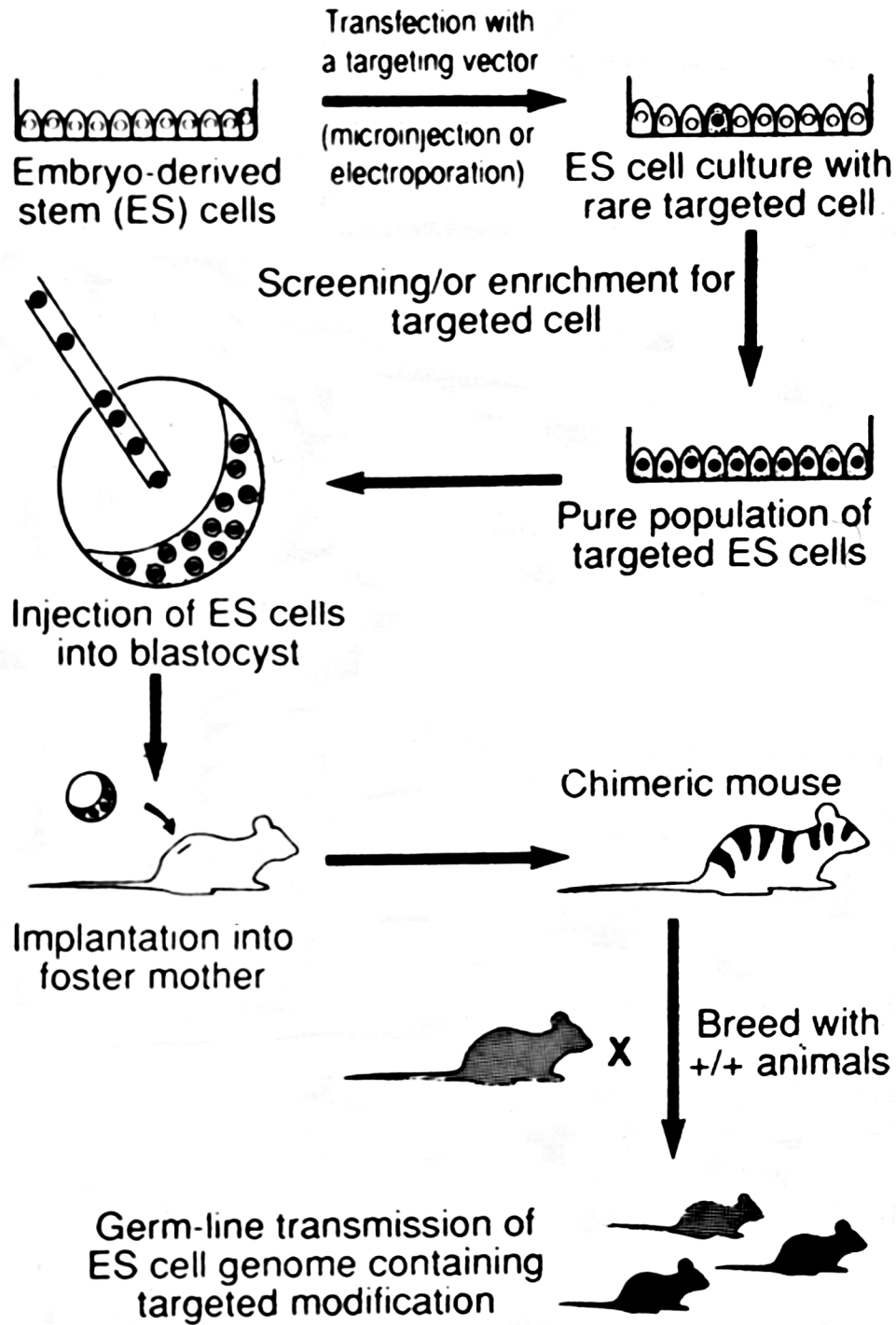


Abb. 3: Der Weg einer Mutation in die Keimbahn der Maus – ausgehend von einem sog. *gene targeting* Vektor über Embryonale Stammzellen: Erläuterungen s. Text. Ref.: (Thomas and Capecchi, 1987)

ermöglicht die gezielte Manipulation eines Gens im Genom der Maus (Capecchi, 1989; Frohman and Martin, 1989). Das *gene targeting* (Abb. 3) beruht auf der Basis der homologen Rekombination zwischen einem sog. *gene targeting*-Vektor und dem Genom embryonaler Stammzellen (ES-Zellen). ES-Zellen stammen aus der inneren Zellmasse von Blastozysten, sind pluripotent und können unbegrenzt in Kultur expandiert werden (Evans and Kaufman, 1981). Die Konstruktion eines *gene targeting*-Vektors kann auf verschiedenen Grundlagen basieren, wie der Insertions- oder der 'Replacement'-Vektor (Hasty & Bradley, 1993). Den meisten Vektoren gemeinsam ist ein positiver Selektionsmarker in Form einer Expressionskassette des bakteriellen Neomycingens (Tsika, 1994), der mit ins ES-Zell Genom integriert. Die homolog rekombinierten ES-Zellen werden in Blastozysten injiziert und diese in scheinchwangere Muttertiere transferiert. Dort nehmen die ES-Zellen an der embryonalen Entwicklung teil (Abb. 3). Die entstehenden Chimäre können anhand ihrer verschiedenen Fellfarbe identifiziert werden. Wenn das modifizierte Gen auch in den Zellen der Keimbahn vorliegt, kann ein Mausstamm etabliert werden, der diese Mutation im Genlokus besitzt (Capecchi, 1989) (Abb. 3).

Bis heute konnte mittels des *gene targeting*-Ansatzes durch homologe Rekombination eine spezifische *in vivo* Funktion von PKC- β z.B. in der B-Zell-vermittelten Immunantwort sowie von PKC- γ z.B. in neuronalen Prozessen gezeigt werden (Abeliovich et al., 1993; Leitges et al., 1996).

1.4 Problemstellung der vorgelegten Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *in vivo* Expression und Funktion der *neuen* PKC- δ Isoform untersucht. Die bisher bekannten Daten zur physiologischen Relevanz von PKC-Enzymen insgesamt sind zum größten Teil auf *in vitro* Experimente zurückzuführen. Insbesondere die Funktionsanalyse der einzelnen PKC-Enzyme ist aufgrund des Fehlens Isoform-spezifischer Modulatoren nur bedingt möglich. Über die neue PKC- δ Isoform weiß man aufgrund von wissenschaftlichen Veröffentlichungen nur, daß sie in den unterschiedlichsten funktionalen Prozesse involviert und ihre Lokalisation auf verschiedene Zelltypen bzw. Gewebe beschränkt ist.

Ein Reporter-gen wie z.B. das LacZ-Gen wird häufig im *gene targeting*-Ansatz integriert, so daß dieses nach der homologen Rekombination unter der Kontrolle des endogenen Promotors des zu analysierenden Gens steht. Die hier verwendete Methode des *gene targetings*, eine zielgerichtete Genänderung durch homologe Rekombination, ermöglichte die Untersuchung der embryonalen und adulten PKC- δ Expression mittels des Reporter-gens *in vivo*. Gleichzeitig bot sich damit die Analyse der physiologischen Funktion durch das Ausschalten, dem sogenannten 'Knock out', des PKC- δ Gens im Mausgenom an. Das Mausmodell als ein 'Knock out'-System eröffnet weiterhin auch die Möglichkeit der Etablierung primärer Zellkultursysteme für eine detaillierte biochemische Analyse.

2 Material

Alle Materialien und Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisendorf, FRG), Roth (Karlsruhe, FRG), La Roche (Mannheim, FRG) und Gibco BRL (Karlsruhe, FRG) - sofern es nicht anders aufgeführt ist - bezogen. Die verwendeten Enzyme stammen von der Firma New England Biolabs (Schwalbach, FRG).

2.1 Plasmide

pBS II SK und KS	(Klonierungsvektor)	Stratagene, Heidelberg, FRG
pSP73	(Klonierungsvektor)	Promega, Heidelberg, FRG
pUC18	(Klonierungsvektor)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pMT2-PKCdelta2	(Ratte PKC- δ cDNA)	(Liyanage et al., 1992)
pLRlacZpA/neopA	(lacZ/neo-Expressions-kassette)	Labor F. Sablitzky

2.2 Zelllinie

E14-1	(ES-Zelllinie aus 129/Ola)	(Hooper et al., 1987)
-------	----------------------------	-----------------------

2.3 Bakterienstämme

XL1-blue	Promega, Mannheim, FRG
XL10-Gold	Stratagene, La Jolla, USA
JM109	Promega, Mannheim, FRG
JM110	Promega, Mannheim, FRG
BNN-132	(Elledge et al., 1991)
TOP 10F'	Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.4 Oligonukleotide

β -Aktin sense	TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G
β -Aktin antisense	TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C
BB1 (PKC delta)-as	GCA GGG AGC CCA GCT CAT AGG
BB2 (PKC delta)-as	GCA CAA TCT GGA TAA CAC GG
PKC delta RT1-s	GCC GTG TTA TCC AGA TTG TG
PKC delta RT2-s	GGA AGG TGA AGT TCT CAA GG
PKC delta RT3-as	GTG GCC AAC CTG TGT GGT ATC AAC C
PKC delta RT4-as	CAG CCT CTT GTC AGG GTC CCT CTC
PKC delta 0.8BH-s	GAG GTA CTA GAA GCT GTT CAC TAC
SP73-Fspsmut	GTT GCG AAA ATT GTT AAC TGG CG

2.5 Antikörper

SPEZIFITÄT	WIRT	FIRMA
m PKC- δ	Maus	Transduction Laboratories, San Diego, USA
m E-Cadherin	Maus	Transduction Laboratories, San Diego, USA
m β -Catenin	Maus	Transduction Laboratories, San Diego, USA
m pp120	Maus	Transduction Laboratories, San Diego, USA
h pan-Keratin (C2562/basal)	Maus	Sigma, Deisenhofen, FRG
h K8.06 Keratin (suprabasal)	Maus	Sigma, Deisenhofen, FRG
m Lorikrin	Kaninchen	BAbCO, Richmond, USA
m CD29 (β_1 -Integrin)	Ratte	Pharmingen, San Diego, USA
m CD104 (β_4 -Integrin)	Ratte	Pharmingen, San Diego, USA
m CD49f (α_6 -Integrin)	Ratte	(Hemler et al., 1989)
m Aktin	Maus	Sigma, Deisenhofen, FRG
m Vinkulin	Maus	Sigma, Deisenhofen, FRG

3 Methoden

Alle molekularbiologischen Standardmethoden als auch Standardlösungen und Medien, die im folgenden nicht aufgeführt sind, wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt bzw. hergestellt.

3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

3.1.1 Chemisch kompetente Bakterien:

100 ml vorgewärmtes LB-Medium wurden mit 3 ml einer Bakterien-Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C bis zum Erreichen der exponentielle Wachstumsphase bei OD_{600} 0,45-0,5 inkubiert. Danach wurde die Kultur für 20 min in Eiswasser inkubiert. Anschließend wurde diese sedimentiert (5 min bei 4°C und 1200x g) und in 5 ml TSS-Medium resuspendiert. 100 µl Aliquot wurden bei -80°C gelagert und bei Bedarf für einen Transformationsansatz auf Eis aufgetaut. Die durchschnittliche Transformationsfrequenz lag bei 1×10^7 Kolonien pro µg pBSII SK.

- TSS-Medium: 85% LB-Medium, 10% PEG₈₀₀₀, 5% DMSO, 50 mM MgCL₂

3.1.2 Elektrisch kompetente Bakterien:

Mit 10 ml einer Bakterien- Übernachtskultur wurden 1 L vorgewärmtes LB-Medium angeimpft. Die Bakterienkultur wurde bis zum Erreichen der exponentielle Wachstumsphase (OD_{600} 0.45-0.5) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum der Bakterien (15 min Eiswasser) gestoppt. Alle weiteren Schritte wurden auf 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. Danach wurden die Bakterien bei 4000 rpm für 15 min sedimentiert. Es folgten zwei Waschstufen in eiskaltem Wasser (in 1 L und 0,5 L). Resuspendiert wurden die Bakterien in 2 ml 10% Glycerol. 50 µl Aliquots wurden bei -80°C eingefroren und gelagert und dienten als ein Transformationsansatz. Die durchschnittliche Transformationsfrequenz lag bei 1×10^9 Kolonien pro µg pBSII SK.

3.2 Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten in Plasmidvektoren

3.2.1 Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur Isolierung von DNA Fragmenten wurde das 'QIAquick Gel Extraction Kit' verwendet. Die DNA wurde im Agarosegel aufgetrennt und ausgeschnitten. Das Fragment wurde mit DNA-bindenden Säulen laut Herstellerangaben von der Agarose getrennt und in geeigneter Konzentration in 10 mM TRIS pH 8.0 eluiert.

- QIAquick Gel Extraction Kits (Quiagen)

3.2.2 Dephosphorylierung von Restriktionsenden

2 µg linearisierte DNA (Plasmidvektor) wurden in einem Endvolumen von 20 µl mit 1 µl Shrimps-alkalischer Phosphatase und entsprechendem Puffer aufgenommen, um die Restriktionsenden zu dephosphorylieren. Die Phosphatasereaktion erfolgt für 1 h bei 37°C und das Enzym wurde anschließend bei 65°C (15 min) inaktiviert. Für eine Ligation wurden 50 ng dieses Vektors in die Ligation eingesetzt.

3.2.3 Ligation

Zur Ligation von isolierten DNA-Fragmenten in dephosphorylierte Vektor-DNA wurden diese in 5-10 fach molarem Überschuß mit 1 Weiss-U T4-DNA-Ligase und entsprechendem Puffer bei 16°C über Nacht inkubiert.

3.2.4 Transformation

Die Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien erfolgte durch Elektroporation. Elektrokompente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, auf ein Volumen von 100 µl mit Wasser aufgefüllt und mit 1-5 µl des Ligationsansatzes vermischt. Die Elektroporation wurde in einem elektrischem Pulsgeber durchgeführt: 0,2 cm Küvette; 2,5 KV; 25 µF; 500 A. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien in 500 µl LB-Medium aufgenommen und für 30 min

bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit einem Antibiotikum entsprechendem der Plasmidresistenz ausgestrichen.

- Gene Pulse-Apparatur (Biorad)

3.3 Gerichtete Mutagenese

Eine gerichtete Mutagenese dient der Sequenzmodifikation, und wurde hier zur Veränderung von Restriktionsschnittstellen durch Basenaustausch benutzt. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben mit dem 'Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit' und entsprechend modifizierten Primern.

- Transformer™ Site-Directed Mutagenesis Kit (CLONTECH Laboratories, Inc.)

3.4 DNA-Sequenzierung

3.4.1 Radioaktive Sequenzreaktion

Plamid DNA wurde mit einer modifizierten Sanger-Methode sequenziert. Die Sequenzreaktion wurde mit dem 'Sequenase Version 2,0 Kit' und einem entsprechendem Primer laut Herstellerangaben durchgeführt. Die Sequenzreaktion wurde anschließend auf einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch analysiert.

- Sequenase Version 2,0 Kit (USB)

3.4.2 Farbmarkierte Sequenzreaktion

Die farbmarkierte Sequenzanalyse mittels PCR-Sequenzierung ('cycle sequencing') basiert auf der von Sanger beschriebenen Methode. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben mit dem 'BIG Dye RR Terminator Cycle Sequencing Kit' und einem entsprechendem Primer in einem Endvolumen von 10 µl und 55°C Annealingtemperatur. Die Reinigung der Extensionprodukte wurde mit 'Centri-Sep spin columns' durchgeführt. Anschließend lieferte eine elektrophoretische Fragmentanalyse mit ABI PRISM™ -System 310 und entsprechender Software die Auftrennung und Analyse.

- BIG Dye RR Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems)
- Centri-Sep spin columns (PE Applied Biosystems)
- ABI PRISM™ -System 310 (PE Applied Biosystems)

3.5 Präparation von RNA aus Gewebe und Zellen

Die RNA-Extraktion wurde für eine cDNA-Synthesereaktionen von Genen benötigt. Mausgewebe (unterschiedliche Organe) wurde in 1 ml TRI-Reagent™ /100 mg Gewebe aufgenommen und anschließend mit einem Homogenisator (Polytron) zerkleinert. Das Homogenat wurde abzentrifugiert (12.000x g; 15 min; 4°C) wodurch es zu einer Phasentrennung in eine obere wässrige und eine untere phenolhaltige Phase kam. Die obere Phase enthielt die RNA und wurde weiter mit Chloroform gereinigt (0.2 ml Chloroform/ml TRI-Reagent™). Nach 10-15 min Inkubation bei RT wurde die Suspension erneut abzentrifugiert. Die wässrigen Oberphase wurde abgenommen und die RNA mit 0.5ml Isopropanol/ ml TRI-Reagent™ gefällt. Anschließend wurde sie nach 5-10 min Inkubation bei RT abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 75% EtOH (1 ml/ml TRI-Reagent™) gewaschen, 5-10 min luftgetrocknet und schließlich in einer entsprechender Menge DEPC-H₂O gelöst (10-15 min; 55°C). Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Bei der RNA-Isolierung aus Keratinozyten wurde das Zellpellet zuerst für 10-15 min auf Trockeneis inkubiert, anschließend in 1 ml TRI-Reagent™/ 0.5-1x10⁷ Zellen aufgenommen und wie oben beschrieben fortgefahren.

- DEPC-H₂O: 1/100 Vol 10% DEPC (Sigma) in 100% EtOH
- TRI-Reagent™ (Guanidinthiozyanat/Phenol-Gemisch: Sigma)

3.6 Reverse Transkription

Ausgehend von isolierter RNA erfolgte die Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA-Strängen als 'Template' für die folgende PCR. 2 µg Gesamt-RNA wurde in einem Volumen von 48 µl in 1x RT-Puffer, 50 mM dNTPs, 500 mM DTT und bei schwach exprimierten Genen mit 100 pmol oligo d(T)₁₂- und 50 pmol Hexamer-Random-Primer aufgenommen. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 65°C und anschließendem Abkühlen für 5 min auf Eis, erfolgte durch Zugabe von 400 U M-MLV-Reverse Transkriptase die cDNA-Synthese für 1 h bei 37°C. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert. Durch eine PCR mit β-Aktin Primern wurde jeweils der Erfolg der Reaktion überprüft.

- M-MLV-Reverse Transkriptase (Boehringer)

- Hexamer-Random-Primer (Boehringer)

3.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion wurde hier als Nachweis von transkribierten Genen verwendet (RT-PCR).

Als PCR-`template` diente jeweils 1 µl cDNA-Stammlösung, die in einem Volumen von 30 µl mit je 10 pmol der Gen-spezifischen Primer 1 und 2 aufgenommen wurde, und mit Mineralöl überschichtet wurden. Der PCR-Reaktionsmix wurde als `hot start` während des ersten Denaturierungsschrittes zugeben und ist im folgenden als Einfachansatz aufgelistet:

5 µl 10x Taq-Puffer incl. 1.5 mM MgCL₂
 1 µl 10mM dNTPs
 0,5 µl Taq-Polymerase (2.5 U)
 13,5 µl H₂O

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermoblock mit folgendem Programm:

3 min	90°C	30 Zyklen für β-Aktin, ansonsten 50 Zyklen
0.5 min	94°C	
1 min	55-72°C entsprechend der Primer	
2 min	72°C	

5-30 µl des PCR-Produktes wurden in einem 1.2% Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

- Taq-Polymerase (Amersham)
- Thermoblock (Biometra)

3.7.1 Klonieren von PCR-Fragmenten

PCR-Produkte besitzen nach Amplifikation mit Taq-Polymerase einen 5'-Überhang der Base Adenosin. Unter Ausnutzung dieses Überhanges wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des `TOPO-TA Cloning[®] Kit` nach den Angaben des Herstellers in einen entsprechenden, vom Hersteller mitgelieferten Vektor kloniert.

- TOPO-TA Cloning[®] Kit (Invitrogen)

3.8 Isolierung von λ -Phagenklonen

Zur Charakterisierung eines Genlokus wurden Phagenklone aus einer genomischen Maus-DNA-Bank (129/SV) isoliert. Die Detektion erfolgte durch Hybridisierung mit einer spezifischen cDNA-Sonde auf Membranen mit quervernetzter DNA der ausplattierten genomischen Maus-DNA-Bank (Stratagene). Die Isolierung, Aufreinigung und weitergehende Analyse wurde laut Herstellerangaben durchgeführt.

3.8.1 Herstellung der Bakterien-Phagen-Kultur

Die Anzucht der Wirtsbakterien (XL1-Blue MRA) sowie deren Infektion mit λ -Phagen wurden nach den Herstellerangaben der genomischen Maus-Bibliothek in dem Lambda Fix[®] II Vektor (Stratagene) durchgeführt.

3.8.2 Screening von Phagenbibliotheken

Die Isolierung von Phagenklonen, die genomische Sequenzen des gesuchten Genlokus enthalten, wurde nach dem Protokoll des Herstellers der genomischen Maus-Bibliothek (129/SV; Stratagene) durchgeführt. Der Rescreen von Phagen eines einzelnen Bakterienplaques erfolgte auf 100 mm Schalen über mehrere Runden bis positive Phagenklone vereinzelt waren.

3.8.3 Präparation von Phagen-DNA

Die DNA-Präparation aus Phagen zur Charakterisierung und Klonierung des *targeting*-Vektors erfolgte nach modifiziertem Protokoll von Sambrook et al (1989). Die Phagen eines reinen Bakterienplaques wurden in 0,5 ml SM-Puffer (+ 100 μ l CHCl₃) für mindestens 2 h resuspendiert. 1 ml einer Über-Nacht-Kultur von Wirtsbakterien (XL1-Blue MRA) wurde mit 250 μ l Phagenüberstand in einem 50 ml-Röhrchen infiziert und 10 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml NZCYM-Medium wurde das Röhrchen über Nacht bis zur Lyse der Bakterien bei 37°C geschüttelt. Zur besseren Aufreinigung der Phagen wurden diese durch Zugabe von 200 μ l CHCl₃ von den Bakterien entfernt. Anschließend wurde gevortext und die Bakterienfragmente für 10 min bei 4500 rpm abzentrifugiert. Der Zentrifugationsschritt wurde mit dem Überstand wiederholt. Der phagenhaltige Überstand wurde nach Zusatz von 10 mM MgCl₂ mit 10 μ g/ml RNase und 10 μ g/ml DNase 30 min bei

37°C inkubiert. Zum Sedimentieren der Phagenpartikel wurde ein 0,5 fachen Volumens einer NaCl/PEG Stammlösung zugegeben, für mind. 3 h (bis ü/N) auf Eis inkubiert und danach für 20 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml NaCl/PEG Stammlösung resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut für 5 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 300 µl Resuspensionspuffer resuspendiert und für 1 h bei 56°C gelöst. Anschließend folgte eine Phenol/Chloroform Reinigung gefolgt von einer Ethanolpräzipitation. Die Phagen-DNA wurde in 100 µl TE aufgenommen und 1-2 h bei 60°C und über Nacht bei RT gelöst.

- SM-Puffer: 5,8 g NaCl; 2,0 g MgSO₄; 50 ml 1M TRIS pH7,5; 5 ml 2% Gelatine
- NZCYM-Medium: 5 g NaCl; 2 g MgSO₄; 5 g Yeast Extrakt; 10 g NZ Amine: pH 7.5
- NaCl/PEG Stammlösung: 1,5M NaCl; 30% PEG₆₀₀₀
- Resuspensionspuffer: 10 mM TRIS pH 7,5; 0,1% SDS; 10 mM EDTA; 50 µg/ml Proteinase K (frisch ansetzen)

3.9 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden nach einer modifizierten Methode von Feinberg & Vogelstein (Feinberg and Vogelstein, 1983) radioaktiv markiert. Ca. 100 ng DNA-Fragment wurde in 33 µl H₂O aufgenommen, durch 5 min Aufkochen denaturiert und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Dem DNA-Mix wurde 1 µl BSA (20 mg/ml), 10 µl Hexamer-Mix, 5 µl α-³²PdCTP (50 µCi) und 1 µl Klenowfragment (2 U) zugegeben, und der Ansatz 3-4 h, bei 37°C oder über Nacht bei RT inkubiert. Nichteingebaute Nukleotide wurden über Sephadex G50-Säulen abgetrennt. Der Einbau von radioaktivem Nukleotid in das DNA-Fragment wird durch Messung der Aktivität kontrolliert.

- Hexamer-Mix wurde entsprechend der Angaben von Feinberg & Vogelstein (Feinberg and Vogelstein, 1983) mit Nukleotiden als Li-Salz (Boehringer) und Random Hexamer Primer (Boehringer) hergestellt.

3.10 Präparation genomischer DNA aus ES-Zellen

Genomische ES-Zell-DNA aus 96 Loch-Zellkulturplatten wurde nach der Methode von (Ramirez-Solis et al., 1992) präpariert. Bei Konfluenz der Zellen wurden diese mit PBS (w/o;

RT) gewaschen, und in 50 µl Lysispuffer über Nacht bei 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit lysiert. Die genomische DNA wurde mit 100 µl eiskaltem Gemisch aus abs. EtOH mit 1,5 µl 5 M NaCl präzipitiert. Die DNA-Flocke wurde in 70% EtOH gewaschen und in 30 µl 10 mM TRIS pH 7,5 gelöst (2 h bei 55°C, ü/N bei 37°C). Für einen Restriktionsverdau mit anschließendem Southern-Blot wurde die komplette DNA verwendet.

- Lysispuffer: 10 mM TRIS; 10 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0.5% Na-Sarcosyl; 1 mg/ml Proteinase K

Die Präparation von genomischer ES-Zell-DNA für Zellzahlen über 10^7 erfolgte nach der Aussalzungsmethode von Miller (Miller et al., 1988). 10^7 Zellen wurde in 3 ml Lysispuffer resuspendiert und nach Zugabe von 100 µl 20% SDS und 1 mg Proteinase K über Nacht bei 37°C verdaut. Durch Zugabe von 1 ml gesättigter NaCl-Lösung (30 s kräftig schütteln) wurde der Aussalzungseffekt der Proteine erreicht. Nach Zentrifugation für 15 min bei 2500 rpm wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und mit einem 2 fachen Volumen 100% EtOH wurde die DNA gefällt. Die DNA-Flocke wurde mit einer Pipettenspitze gefischt, kurz in 70% EtOH gewaschen und in 200-300 µl TE gelöst (2 h bei 55°C, ü/N bei 37°C). Ungefähr 10 µg DNA wurden für einen Restriktionsverdau mit anschließender Southern-Blot-Analyse eingesetzt.

- Lysispuffer: 10 mM TRIS; 400 mM NaCl; 2 mM EDTA; pH 8.2

3.11 Präparation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Die Genotypisierung von Mäusen erfolgte durch Southern-Blot-Analyse. Dazu wurden 0.5 - 1 cm lange Schwanzbiopsien entnommen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 400 µl Extraktionspuffer 12 - 16 h bei 55°C inkubiert. Nach 10 s Vortexen wurden die festen Partikel durch Abzentrifugieren (5 min 14000 rpm) sedimentiert und die DNA aus dem Überstand mit 1 Volumen Isopropanol gefällt. Die DNA-Flocke wurde in 70% EtOH gewaschen und in 100 µl TE gelöst (2h bei 55°C, ü/N bei 37°C). Für einen Restriktionsverdau wurden ca. 10 µg DNA eingesetzt. Je nach Restriktionsenzym war es notwendig die DNA weiter aufzureinigen. Zu diesem Zweck wurde nach der Inkubation in Extraktionspuffer die DNA mit einem gleichen Volumen Phenol/Chloroform extrahiert und wie oben beschrieben fortgeführt.

- Extraktionspuffer: 200 mM TRIS pH 8,0; 50 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS; 1 mg/ml Proteinase K

3.12 Southern-Blot-Analyse

Die Southern-Blot-Analyse diente hier der Identifizierung von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen verursacht durch Einführung eines mutierten Allels oder zur Detektion von kodierenden DNA-Bereichen. Die Methode wurde modifiziert nach Sambrook et al (1989) und der Fa. Amersham durchgeführt. Im Anschluß an einen Restriktionsverdau wurde die genomische DNA in einem 0.6% Agarosegel in 1x TAE-Puffer und 0,1 mg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt (7 V/cm) bis der zu erwartende Polymorphismus ca. 1 cm voneinander getrennt war. Die elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde im Gel in einem ausreichenden Volumen Denaturierungslösung für 40 min denaturiert und anschließend 2x 20 min in entsprechender Neutralisierungslösung auf einen pH 7,0 - 7,5 equilibriert. Der DNA-Transfer erfolgte durch Kapillarkraft auf eine Nylon Membran. Die DNA wurde anschließend durch UV-Quervernetzung (3600 KJ) auf der Membran fixiert. Der Filter wurde für mindestens 3 h bei 65°C in der Prähybridierungslösung inkubiert und anschließend über Nacht bei 65°C mit der radioaktiv-markierten DNA-Probe (vgl. 2.9) hybridisiert.

Am nächsten Tag wurde der Filter 1x 5 min in Waschpuffer I und danach 2x 30 min bei 60°C in Waschpuffer II gewaschen. Die Hybridisierung wurde autoradiographisch analysiert.

Southernblot-Analyse von Plasmid-DNA oder Phagen-DNA erfolgte nach der gleichen Methode.

- TAE Puffer 50x : 2 M TRIS-Azetat; 50 mM EDTA
- Denaturierungspuffer: 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
- Neutralisierungspuffer: 0,5 M TRIS; 1,5 M NaCl: pH 7,0
- Nylon Membran (Amersham Hybond N)
- MP-Mix: 5% SDS; 5% fettarmes Milchpulver in H₂O: durch Erhitzen lösen
- 50% Dextransulfat in H₂O (bei 55°C gelöst)
- Prähybridierungslösung: 8,5 ml H₂O; 3 ml 20x SSC; 3 ml MP-Mix; 0,5 ml Lachsspermien DNA
- Hybridisierungslösung: 2,5 ml H₂O; 2 ml 20x SSC; 2 ml MP-Mix; 0,5 ml Lachsspermien DNA; 4 ml 50% Dextransulfat

- Waschpuffer I (2x SSC; 0,1% SDS in H₂O)
- Waschpuffer II (0,1x SSC; 0,1% SDS in H₂O)

3.13 Zellkultur

Embryonale Fibroblasten sowie embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden in H₂O-gesättigter Atmosphäre bei 37°C und 10% CO₂ in modifizierten DMEM-Medium kultiviert.

- Modifiziertes DMEM-Medium: DMEM; 15% FCS; 6x10⁻⁵ M 2-Mercaptoethanol; 1% von 100x MEM-nichtessentielle Aminosäuren; 2 mM Glutamin; 100 U/ml Penicillin/Streptomycin

3.13.1 Gewinnung von Embryonalen Fibroblasten (EMFI's)

EMFI's wurden für die optimale Kultivierung von ES-Zellen benötigt. Sie waren Neomycin-resistent für den Selektionsschritt der mutierten ES-Zellen. Embryonen einer neo-resistenten Mauslinie wurden am Tag 14,5 dpc. aus dem Uterus präpariert. Kopf und Eingeweide wurden entfernt und das restliche Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert. Die Gewebepartikel wurden 10 min bei 37°C in vorgewärmten Trypsin inkubiert und durch Rühren mit Glaskugeln in der Trypsinlösung (30 min bei RT) vereinzelt. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellsuspension auf 150 mm gelatinisierten Zellkulturschalen kultiviert.

3.13.2 Mitomycinbehandlung von EMFIs

Mitomycin diente der Inaktivierung der Mitose von EMFI's, die als Zellrasen für die Kultivierung der ES-Zellen benötigt werden. Konfluente Kulturschalen mit EMFIs wurden 2-3 h bei 37°C mit 13 µg Mitomycin C /ml Kulturmedium behandelt. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS (w/o) gewaschen und dementsprechend auf neue Kulturschalen gesplittet. Diese Mitose-inaktivierten EMFIs konnten anschließend als Zellrasen für embryonale Stammzellen benutzt werden.

- Mitomycin C Stammlösung: 1 mg/ml in PBS (w/o) und 5% DMSO

3.13.3 Kultivierung von Embryonalen Stammzellen

Embryonale Stammzellen der Maus wurden zum *gene targeting in vitro* benutzt. Die verwendete embryonale Stammzelllinie ist ein Subklon der E14-Zelllinie (Hooper et al., 1987). Die Standard-Kultivierung wurde generell in 60 mm Zellkulturschalen auf einem Zellrasen von EMFIs durchgeführt. Das Kulturmedium wurde täglich gewechselt und jeden 2. - 3. Tag wurden 2×10^5 Zellen auf eine neue Kulturschale passagiert. Zum Splitten der ES-Zellen wurden diese 2x mit vorgewärmten PBS (w/o) gewaschen und anschließend 5-10 min mit vorgewärmten Trypsin behandelt. Trypsin wurde durch Zugabe von 1 Volumen Kulturmedium inaktiviert. Zum Einfrieren der ES-Zellen wurden diese 3 min bei 800 rpm abzentrifugiert, in Einfriermedium resuspendiert und in Kryo-Konservierungsröhrchen überführt. Die Zellen wurden über Nacht bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

- Einfriermedium: modifiziertes DMEM-Medium mit 10% DMSO

3.13.4 Transfektion, Selektion und Isolation von rekombinanten ES-Zellen

ES-Zellen wurden 1 Tag vor der Transfektion mit einem *gene targeting*-Vektor passagiert. 3-4 h vorher wurde das Kulturmedium durch frisches ersetzt. Zellen einer 60 mm Kulturschale (ca. 1×10^7) wurden wie oben beschrieben vereinzelt und in 0,8 ml PBS mit 20-25 μg linearisiertem *gene targeting*-Vektor aufgenommen. Die Transfektion erfolgte in 0,4 cm Elektroporationsküvetten bei einem Puls von 250 V bei 500 μF mit einem Biorad Elektroporator. Das Elektroporat wurde in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, 5-10 min bei RT inkubiert und anschließend in 5x 90 mm Zellkulturschalen auf einem EMFI-Rasen ausgesät. Nach 24 h Kultivierung wurden die transfizierten ES-Zellen unter G418 Selektion gesetzt. Der transfizierte *targeting*-Vektor enthält ein Neomycin-Resistenzgen (Thomas and Capecchi, 1987) und nach Integration des Vektors in das ES-Zellgenom sind diese gegen das Antibiotikum Geneticin (G418) resistent. Die Resistenz-Selektion erfolgte über 10-11 Tage, wobei jeden Tag das Selektionsmedium gewechselt wurde. Im Anschluß an die Selektion wurden ES-Zellklone gepickt, mit Trypsin vereinzelt und über 2-3 Tage - bis zu 60-70%

Konfluenz - in 96 Loch-Zellkulturplatten auf einem EMFI-Rasen expandiert. Diese expandierten ES-Zellkolonien wurden zur Hälfte als sogenannte Masterplatte kryokonserviert und die andere Hälfte zur DNA-Präparation erneut in 96 Loch-Zellkulturplatten expandiert. Die DNA der ES-Zellklone wurde zur weiteren Charakterisierung isoliert. Die kryokonservierten ES-Zellklone (s.o.) wurden für eine detaillierten Analyse einer homologen Rekombination wieder in Kultur genommen und expandiert. Gleichzeitig können die gewünschten ES-Zellklone für eine spätere Blastozysteninjektion wieder kryokonserviert werden.

- Elektroporator (Biorad)
- Selektionsmedium: modifiziertes DMEM-Medium mit 150 µg/ml aktive Substanz G418

3.13.5 Isolation und Kultivierung von primären Maus-Keratinozyten

Die Kultivierung von primären Maus-Keratinozyten diente zur detaillierten Phänotyp-Analyse in PKC- δ mutanten Zellen. Keratinozyten wurden aus der Epidermis von neugeborenen Mäusen präpariert. Die Neugeborenen wurden nach dem Töten in PBS (w/o) gewaschen und die komplette Haut isoliert. Die Hautstücke wurden unter semisterilen Bedingungen 2x in PBS (w/o) gewaschen und anschließend in 5 ml 1x Dispase-Lösung über Nacht auf Eis inkubiert. Dispase ist eine Metalloprotease, die in diesem Fall die Proteine der extrazellulären Matrix abbaut. Alle folgenden Arbeiten wurden unter Zellkultur-sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach der Dispase-Inkubation wurde die Epidermis mit Pinzetten von der Dermis abgezogen. Die Epidermis wurde mittels Skalpell (mechanisch) in kleine Stücke geteilt und in 5 ml vorgewärmten Trypsin (biochemisch) 20-25 min bei 37°C inkubiert. Das Vereinzeln der Keratinozyten wurde in 5 min Abständen durch Schütteln kontrolliert. Wenn eine eindeutige Trübung zu erkennen war, aber noch kein DNA-Schleim vorhanden, wurde die Inkubation durch Zugabe von 1 Volumen Medium mit leicht erhöhter Ca²⁺-Konzentration (Initiierungsmedium) gestoppt. Durch mehrmaliges Auf- und Ab-Pipettieren wurden zusätzlich noch kleinere Zellklumpen vereinzelt. Die Keratinozyten wurden 5 min bei 1200 rpm (ohne Bremse) abzentrifugiert, in frischem Initiierungsmedium resuspendiert und in einer Zelldichte von 2×10^6 / 35 mm Zellkulturschale ausgesät. Pro neugeborene Maus lag die Ausbeute bei ca. 10^7 Keratinozyten. Die Zellkulturschalen wurden zuvor mit Proteinen wie z.B. Gelatine (o/n 37°C) und Kollagen (5 min RT) beschichtet. Der leicht erhöhte Ca²⁺-

Spiegel des Initiierungsmediums ist für eine optimale Adhäsion an Matrixproteine notwendig und wurde nach 8-12 h durch Keratinozyten-Kulturmedium (Proliferationsmedium) mit niedrigem Ca^{2+} -Gehalt ersetzt, danach alle 2 Tage erneuert. Im Folgenden können die Keratinozyten kryokonserviert oder zum Differenzieren gebracht werden. Bei der Kryokonservierung wurde 3-4 h vorher das Proliferationsmedium durch Initiierungsmedium ersetzt und dann 2x mit PBS (w/o) gewaschen, 20 min Trypsinbehandlung bei 37°C , abzentrifugiert und zur Lagerung bei -80°C in Einfriermedium resuspendiert. Die Differenzierung konnte z.B. durch Erhöhen der Ca^{2+} -Konzentration erreicht werden (s. Differenzierungsmedium):

- Dispase-Stammlösung (5x): 25 U/ml oder 27,7 mg/ml PBS (w/o) (Gibco BRL)
- Proliferationsmedium (0,088 mM Ca^{2+}): 'defined Keratinocyte-serum free Medium' mit Supplements (Gibco BRL)
- Initiierungsmedium (0,31 mM Ca^{2+}): 89% Proliferationsmedium und 11% ES-Zellkulturmedium
- Differenzierungsmedium (1,2 mM Ca^{2+}): 20 μl 1 M CaCl_2 auf 18 ml Proliferationsmedium
- Einfriermedium: 70% Initiierungsmedium, 20% FCS, 10% DMSO

3.14 β -Galaktosidasefärbung von transgenen Mausembryonen

Die β -Galaktosidasefärbung wurde in dieser Arbeit zur Analyse der Expression des Reportergens unter der Kontrolle des endogenen PKC- δ Promotors in der Maus benutzt. Expressionsstudien wurden während der Embryonalentwicklung im ganzen Embryo (whole mount), in der Primärkultur von Keratinozyten und in adulten Geweben durchgeführt. Die zu färbenden Präparate wurden in PBS (w/o) gewaschen und in ausreichendem Volumen Fixierlösung für 30 min bei 4°C unter leichtem Schütteln fixiert. Bei Zellen und Embryonen bis 8,5 dpc wurde die Fixierzeit auf die Hälfte reduziert. Die Fixierung von adultem Gehirn erfolgte durch Perfusion mit 4% Paraformaldehyd/0.2% Glutaraldehyd und einer Nachfixierung im Anschluß an die Präparation in der gleichen Fixierlösung. Gewaschen wurde 3x 15 min bei RT in ausreichendem Volumen an Waschpuffer unter leichtem Schütteln. Die Färbelösung wurde über Nacht bei 37°C unter lichtgeschützten Bedingung inkubiert. Das Volumen der Färbelösung richtete sich nach der Größe des Präparates, so daß der pH-Wert der

Färbelösung konstant blieb. Nach der Färbung wurde noch 3x 15 min bei RT mit PBS (w/o) gewaschen und in 4% Formaldehyd/PBS (w/o) nachfixiert (über Nacht bei 4°C).

- Fixierlösung: 10 ml 0.1 M Phosphatpuffer pH 7,6; 1,2 ml Formalin (37%); 20 µl 1 M MgCl₂; 100 µl 0,5 M EGTA
- Waschpuffer: 2 ml 1 M MgCl₂; 10 ml 1% Na-deoxycholat; 10 ml 2% NP-40; ad 1 L 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,6
- Färbelösung: 9,7 ml Waschpuffer; 200 µl 0,2 M K₃[Fe(CN)₆]; 200 µl 0,2 M K₄[Fe(CN)₆]; 100 µl 5% X-Gal (in DMF)

3.14.1 Klären der Embryonen

Zum photographischen Dokumentieren der lacZ-Expression und von *in situ*-Hybridisierungsgefärbten Präparaten wurden ganze Embryonen mehr oder minder stark geklärt. Dadurch wurde auch eine Färbung im Inneren des Embryos sichtbar. Für ein schwaches Klären der Embryonen wurde eine Glycerinreihe von 30%, 50% und 80% verwendet, indem der Embryo jeweils bis zum Absinken inkubiert wurden. Alternativ wurde in einem Gemisch aus 1/3 Benzylalkohol und 2/3 Benzylbenzoat für mehrere Minuten geklärt.

3.15 *In situ*-Hybridisierung (ISH)

Die *in situ*-Hybridisierung diente der Analyse der PKC- δ mRNA-Expression in 'whole mount' Mausembryonen und auf Paraffinschnitten.

3.15.1 Präparation von Mausembryonen

Embryonen für ISH wurden in PBS isoliert, dann über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd (in PBS (w/o)) fixiert, und 2x 5 min in PBS (w/o) bei RT gewaschen. Für whole mount ISH wurden die Embryonen weiter prozessiert oder nach eine Methanolreihe (30%, 50%, 75%, 100% a' 10-15 min bei RT) bei -20°C gelagert. Für eine ISH auf Paraffinschnitten wurden die Embryonen wie folgt in Paraffin überführt - hier für 12.5 - 16.5 dpc Embryonen (Lescher et al., 1998):

1x 1h in 40% EtOH / DEPC-H₂O

1x 1h in 70% EtOH / DEPC-H₂O

- 1x 1h in 95% EtOH / DEPC-H₂O
- 3x 1h in 100% EtOH / DEPC-H₂O
- 3x 1h in Xylol
- 2x 1h in Paraffin
- 1x ü/N in Paraffin

Anschließend wurden die Embryonen in Paraffin eingebettet und 10 µm Schnitte angefertigt. Diese wurden dann für die ISH benutzt.

3.15.2 Transkription einer cDNA-Probe

Die Hybridisierung endogener mRNA mit einer cDNA-Sonde setzt ein antisense Template voraus. Die cDNA wurde in ein für die *in vitro* Transkription geeignetes Plasmid kloniert, auf der 5' Seite linearisiert und von der 3' Seite her transkribiert (antisense). Die Reaktion wurde in einem Volumen von 10-20 µl mit 0,5 µl RNase Inhibitor, 500 ng linearisiertes Template, 10x DIG-RNA-Reaktionsmix, 0,5 µl RNA-Polymerase mit dem entsprechenden Puffer in DEPC-H₂O durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37°C wurde der Erfolg der Transkriptionsreaktion (1/20) auf einem 1.2% Agarosegel kontrolliert. Die DNA wurde mit 1 µl DNaseI (RNase frei) für 15 min bei 37°C verdaut. Das RNA-Transkript wurde mit 100 µl DEPC-H₂O, 10 µl 4 M LiCl und 300 µl EtOH gefällt (10 min auf Trockeneis) und 20 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70% EtOH einmal gewaschen und anschließend in 55 µl DEPC-H₂O gelöst.

- RNase Inhibitor (Boehringer)
- DIG-RNA-Reaktionsmix (Boehringer)
- RNA-Polymerase (Boehringer)
- DNaseI (RNase frei; Boehringer)

3.15.3 Whole-mount ISH von Mausembryonen

Die Embryonen, die in MeOH gelagert waren, wurden in einer absteigenden MeOH/PBST Reihe rehydriert: 75%, 50%, 25% 1x 10 min bei RT und 2x 10 min in PBST bei RT. Die Bleiche erfolgte in 6% H₂O₂ in PBST für 1 h bei RT, danach wurde 3x 5 min bei RT in PBST gewaschen. Die folgende Proteinase K Behandlung richtete sich von der Größe der Embryonen: 12,5dpc 10 min; 11,5dpc 8 min; 10,5dpc 6 min; 9,5dpc 4 min; 8,5dpc 1 min; 10 µg/ml Proteinase K in PBST bei RT. Die enzymatische Reaktion wurde mit 2 mg/ml Glycin in

PBST für 2x 10 min bei RT gestoppt. Die Embryonen wurden erneut 3x 5 min bei RT in PBST gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd für 20 min bei RT nachfixiert. Nach erneutem 3 maligem Waschen für 5 min in PBST wurden die Embryonen mit Prähybridisierungslösung bedeckt und 1-2 h bei 70°C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte bei gleicher Temperatur ü/N in entsprechender Lösung. Am nächsten Tag wurden die Embryonen 3x 30 min in vorgewärmter Lösung I bei 70°C gewaschen. Anschließend 3x 5 min bei RT mit TNT-Puffer für die RNase-Behandlung (1 h 100 µg/ml RNase in TNT-Puffer bei 37°C) equilibriert. Die enzymatische Reaktion wurde durch TNT:Lösung II (1:1) für 5 min bei RT gestoppt und die Embryonen 3x 30 min in vorgewärmter Lösung II bei 65°C gewaschen. Für die Antikörperreaktion erfolgten 3x 5 min Waschschriffe in MAB-Puffer bei RT und ein Präblocken der Embryonen in MAB-Puffer mit 10% Schafserum sowie 2% Blocking-Reagenz (Boehringer) für 2-3 h bei RT. Die Antikörperreaktion erfolgte ü/N bei 4°C in Antikörperlösung. Am folgenden Tag wurde in MAB-Puffer gewaschen: 3x 10 min bei RT , gefolgt von stündlichem Pufferwechsel und anschließend ü/N bei 4°C. Die enzymatische Farbreaktion erfolgte in BM Purple nach dem Equilibrieren in NTMT-Puffer (3x 10 min bei RT). Die Länge der Farbreaktion richtete sich nach der Expressionstärke des untersuchten Gens und lag zwischen mehreren Stunden bis zu 2 Tagen. Gestoppt wurde die enzymatische Reaktion mit PBST pH 4.5 (3x 5 min), und anschließendem Nachfixieren mit 4% Paraformaldehyd ü/N bei 4°C.

- Prähybridisierungslösung: 50% Formamid; 5x SSC pH 4,5; 1% SDS; 50 µg/ml Heparin
- Hybridisierungslösung: 1 µg/ml Probe in Prähybridisierungslösung
- Lösung I: 50% Formamid; 5x SSC pH 4,5; 1% SDS
- Lösung II: 50% Formamid; 2x SSC pH 4,5; 0.2% SDS
- TNT-Puffer: 10 mM TRIS pH 7,5; 0,5 M NaCl; 0.1% Tween-20
- MAB-Puffer: 100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; 2 mM Levamisol; 0.1% Tween-20: pH 7,5
- Antikörperlösung: 1 mg Embryopuder wurde mit 500 µl MAB/2% Blocking Reagenz für 30 min bei 70°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und mit 5 µl Schafserum und 0,5 µl anti-DIG Alkalische Phosphatase-Antikörper versetzt und 1 h bei 4°C inkubiert. Nach 10min Zentrifugation wurde der Überstand auf 2 ml MAB/2% Blocking Reagenz/1% Schafserum aufgefüllt.
- NTMT-Puffer: 100 mM TRIS pH 9,5; 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl
- BM Purple (Boehringer)

3.15.4 ISH auf Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden in Xylol (2x 10 min bei RT) entwachst und rehydriert durch eine absteigende Ethanolreihe (2x 5 min abs. Ethanol; 95% Ethanol/DEPC-H₂O; 90% Ethanol/DEPC-H₂O; 70% Ethanol/DEPC-H₂O; 50% Ethanol/DEPC-H₂O; 30% Ethanol/DEPC-H₂O; a' 1 min bei RT). Vor dem Fixieren wurden die histologischen Schnitte 1x 5 min bei RT in PBS (w/o) gewaschen und für 20 min bei RT in 4% PFA nachfixiert. Nach 2x 5 min Waschen in PBS (w/o) folgt eine Proteinase K Behandlung (10 µg/ml in 0,1 M TRIS pH 7,5) für 10 min bei 37°C, die durch 0,2% Glycin in PBS (w/o) (10 min, in RT) gestoppt wurde. Es folgen 2x 5 min Waschschrte in PBS (w/o) , 15 min waschen in 0,2 N HCl und erneut 2x 5 min waschen in PBS (w/o) . In 0,1 M Triethanolamin pH 8,0 mit 0.25% Essiganhydrid wurden Aminogruppen abgesättigt (10 min Bei RT rühren). Es folgen 2 Waschschrte in PBS (w/o) und einer in DEPC-H₂O für jeweils 5 min. Die histologischen Schnitte wurden 2 h bei 70°C prähybridisiert und die Hybridisierung erfolgte bei 70°C ü/N mit 3 µg/ml DIG-markierter Probe in Prähybridisierungslösung. Die folgenden Schritte und Lösungen entsprechen der 'whole mount'-ISH. Die Farbreaktion mit BM Purple wurde durch 2x 10 min Waschen in PBS (w/o) und Nachfixieren in MEMFA-Puffer (45 min bei RT) gestoppt. Die histologischen Präparate wurden nach 2x 5 min PBS (w/o) in MOVIOL[®] eingedeckelt.

- Prähybridisierungslösung: 50% Formamid; 5x SSC pH 7,0; 1x Denhardts; 0,15 Tween-20; 50 ng/ml Heparin; 0,1% Chaps
- MEMFA: 100 mM MOPS; 2 mM EGTA; 1 mM MgSO₄; 3,7% Formalin

3.16 Anfertigung von histologischen Schnitten

Histologische Schnitte wurden für eine Detail-Analyse der lacZ-Epression der PKC-δ Mutante, der morphologischen Untersuchung sowie für die ISH angefertigt.

3.16.1 Kryostat-Schnitte

β-Galaktosidase-gefärbte Embryonen wurden für eine histologische Analyse ü/N in 30% Saccharose inkubiert und dann in der gewünschten Orientierung in Einbettformen mit 'Tissue-Teck' eingebettet und bei -20°C eingefroren. Für eine histologische Übersicht wurden am

Kryostat Schnitte von 10-20 µm Dicke angefertigt und auf vorbeschichtete Objektträger aufgezogen. Bei einer im Anschluß geplanten Immunfluoreszenz wurden Schnitte von einer Dicke zwischen 1-5 µm angefertigt. Allgemein wurden Kryostat-Schnitte 2 h bei 40°C getrocknet, 10 min in PBS (w/o) und 5 min in H₂O gewaschen. Zur histologischen Analyse wurden die Präparate mit Hämatoxylin (färbt die Zellkerne blau) und Eosin (färbt das Zytoplasma rot) nach Standardbedingungen (s. Herstellerangaben) gegengefärbt. Letztlich wurden die Präparate in MOVIOL[®] eingedeckelt.

- Tissue-Teck (Leica/Benzheim)
- MOVIOL[®] (Calbiochem)

3.16.2 Mikrotom-Schnitte

Im Gegensatz zu Präparaten für ISH wurden β-Galaktosidase-gefärbte Präparate nicht über eine Ethanolreihe und Xylol in Paraffin eingebettet, sondern über eine 2-Propanolreihe, um ein Auswaschen der zytoplasmatischen lacZ-Färbung zu verhindern (Bsp. für 12,5-16,5 dpc Embryonen):

- 1x 1 h in 40% 2-Propanol / H₂O
- 1x 1 h in 70% 2-Propanol / H₂O
- 1x 1 h in 95% 2-Propanol / H₂O
- 3x 1 h in 100% 2-Propanol / H₂O
- 2x 1 h in 1:1 2-Propanol / Paraffin
- 2x 1 h in Paraffin
- 1x ü/N in Paraffin

Anschließend wurde das Präparat in Einbettformen eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden 1-10 µm dicke histologische Schnitte angefertigt, in einem geheizten Wasserbad gestreckt und auf vorbeschichtete Objektträger aufgezogen. Nach dem Trocknen (2 h bei 40°C) wurden die Präparate zum Rehydrieren der 2-Propanolreihe in umgekehrter Reihenfolge unterzogen (a' 2-5 min) und können entweder mit Hämatoxylin und Eosin gegengefärbt oder direkt in MOVIOL[®] eingedeckt werden.

3.16.3 Vibratom-Schnitte

Für die histologische Übersicht der lacZ-Expression in adultem Gehirn eignen sich besonders Vibratomschnitte. Wie schon beschrieben wurde das Gehirn perfundiert und für 1h nachfixiert (4% Paraformaldehyd / 0,2% Glutaraldehyd). Das Präparat wurde in 2-2,5% Agarose eingebettet und nach dem Erstarren in 50 µm Dicke am Vibratom geschnitten. Im folgenden wurden die Präparate X-Gal gefärbt, auf Objektträger aufgezogen und anschließend in MOVIOL® eingedeckelt.

3.17 Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenzfärbungen wurden angefertigt, um bestimmte Proteine in Kryostatschnitten oder in Zellkultur sowie den BrdU-Einbau in Keratinozyten zu analysieren.

3.17.1 Immunfluoreszenzfärbung auf Kryostatschnitten

Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurden die histologischen Schnitte mit vorgekühltem Methanol für 3 min bei -20°C fixiert und anschließend 3x 5 min mit PBS (w/o) gewaschen. Um unspezifische Antigene zu blocken, wurde das Präparat 15 min bei RT mit 0,5% BSA in PBS (w/o) inkubiert und erneut 3x 5 min mit PBS (w/o) gewaschen. Der 1. Antikörper wurde in der zuvor ausgetesteten Verdünnung entweder 1 h bei 37°C oder besser ü/N bei 4°C in H₂O-gesättigter Atmosphäre inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch drei mal Waschen für 10 min in PBS (w/o) entfernt. Der Sekundärantikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung in 0,5% BSA aufgenommen und je nach Spezifität 1 h bei 37°C oder RT in H₂O-gesättigter Atmosphäre unter Lichtausschluß - wie auch alle folgenden Schritte - inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde wie zuvor gewaschen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (3-5 min) gegengefärbt, woraufhin sich 2 weitere Waschschrte anschlossen. Das Präparat wurde in MOVIOL® mit anti-Bleichmittel (30 mg/ml DABCO) eingedeckelt und unter Lichtausschluß getrocknet. Die weitere Analyse erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop in entsprechender Vergrößerung und für eine fotografische Präsentation wurden Fuji Provia 1600 Diafilme verwendet.

3.17.2 Immunfluoreszenzfärbung auf Zellen

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie von Keratinozyten wurden diese auf Deckgläsern kultiviert. Mediumreste wurden mit vorgewärmten PBS (w/o) entfernt und die Zellen mit eiskaltem Methanol für 5 min bei -20°C fixiert. Die Permeabilität der Zellen wurde durch Inkubation mit eiskaltem Azeton für 5 min bei -20°C und anschließender Lufttrocknung (1-2 min bei RT) erzielt. Nach 2 Waschschritten in PBS (w/o) wurde der 1. Antikörper (ca. 50 µl) in entsprechender Verdünnung auf einen Objektträger pipettiert und das Deckglas über Kopf auf den Tropfen Antikörperlösung gelegt. Alle weiteren Schritte folgten obigen Protokoll.

- Deckgläser Ø 18 mm

3.17.3 Proliferationsanalyse in Keratinozyten

Die Proliferation von Zellen wurde in Korrelation von der DNA-Synthese untersucht. Der Einbau von BrdU anstelle von Thymidin wurde mit Hilfe eines 'BrdU-Labeling and Detection Kit I' nach modifizierten Herstellerangaben bestimmt. Bei 50% Konfluenz der Keratinozyten wurden diese 6 -12 h mit dem BrdU-Markierungsreagenz in Proliferationsmedium kultiviert. Der Nachweis erfolgte Immunfluoreszenz-mikroskopisch laut Hersteller mit einem anti-BrdU-Antikörper in H₂O-gesättigter Atmosphäre und wurde mit DAPI gegengefärbt. Die Keratinozyten wurden in MOVIOL[®] mit dem anti-Bleichmittel DABCO eingedeckelt.

- BrdU-Labeling and Detection Kit I (Boehringer)

3.18 Proteinextraktion aus Gewebe und Zellen

Eine Proteinextraktion verschiedener Gewebe wurde für eine Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Nullmutation des PKC-δ Gens durchgeführt. Das entsprechende Gewebe wurde 2x in eiskaltem PBS (w/o) gewaschen, in einem entsprechend festgelegten Volumen eiskaltem Proteinextraktionspuffer aufgenommen und anschließend in einem Homogenisator (Polytron) homogenisiert. Bei der Proteinextraktion aus Zellen (hier Keratinozyten) wurde das Zellpellet zuerst für 10-15 min auf Trockeneis inkubiert, anschließend in 0,1 ml Proteinextraktionspuffer / 5x10⁶ Zellen aufgenommen, mit einem Douncer homogenisiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (30 min 1400 rpm bei 4°C) befanden sich die löslichen Proteine im Überstand. Die unlöslichen Proteine im Pellet konnten durch Erhöhen der Triton X-100 Konzentration auf 2% und kurzes Sonifizieren herausgelöst werden. Um einen

proteolytischen Abbau der Proteine zu verhindern, wurden die Proteinfractionen mit 1/3 Volumen Laemmli-Probenpuffer aufgekocht (5 min) und anschließend bei -20°C gelagert oder direkt auf eine Proteingel aufgetragen.

- Proteinextraktionspuffer: 50 mM TRIS pH 8,0; 2 mM EDTA; 10 mM EGTA; 20 µg/ml Leupeptin; 20 µg/ml Aprotinin; 50 µg/ml PMSF; 0,3% 2-Mercaptoethanol; 0,1% Triton X-100 (Stabel et al., 1991)
- Laemmli-Probenpuffer: 250 mM TRIS pH 6,8; 8% SDS; 20% Glycerol; 0,1 M DTT; 100 µg/ml Bromphenolblau

3.19 Western-Blot-Analyse

Die Auftrennung der Proteine zum Nachweis von Protein Kinase C erfolgte in 8% SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970) in einer Proteingelapparatur (MINI-PROTEAN II). Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose Membran mit einer 'Semi-Dry-Blottingapparatur' nach Herstellerangaben (5 mA/cm²) transferiert. Der Proteinnachweis erfolgte nach der Western-Blot-Methode von (Towbin et al., 1979), wobei die spezifischen Antikörper in entsprechender Verdünnung und ein 'ECL-Chemilumineszenz-Kit' laut Herstellerangaben benutzt wurde.

- Proteingelapparatur: MINI-PROTEAN II (Biorad)
- Nitrozellulose Membran (Amersham)
- Semi-Dry-Blottingapparatur (Fastblot 34; Biometra)
- ECL-Chemilumineszenz-Kit (Amersham)

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung einer PKC- δ defizienten Mauslinie zur Analyse des endogenen Expressionsmusters sowie der *in vivo*-Funktion des PKC- δ Gens in der Maus. Zur Analyse des Expressionsmusters soll ein lacZ-Reportergens unter der Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert werden. Die Insertion des Reportergens hat gleichzeitig einen Transkriptionsstop zur Folge und führt dadurch zur Null-Mutation des PKC- δ Gens. Dies wurde durch die *gene targeting*-Technologie mittels homologer Rekombination in ES-Zellen erreicht (Capecchi, 1989). Im ersten Schritt wurden genomische DNA-Fragmente des PKC- δ Locus isoliert und charakterisiert, um im darauffolgenden Schritt einen sogenannten *gene targeting*-Vektor zu konstruieren. Der *gene targeting*-Vektor trägt die Mutation für das PKC- δ Gen und wurde durch Elektroporation in kultivierte ES-Zellen der Maus transfiziert. Aufgrund eines Neomycin-Phosphotransferase Gen (neo^r -Gen) im *gene targeting*-Vektor, werden ES-Zellen nach dessen Integration resistent gegenüber dem Neomycin-Derivat G418 (Thomas and Capecchi, 1987). G418 resistente ES-Zellklone wurden hinsichtlich eines homologen Rekombinationsereignisses analysiert, das ausschließlich durch Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) geschah. ES-Zellen mit korrekter Integration des *gene targeting*-Vektors wurden im weiteren Verlauf benutzt und sukzessive die eingeführte Mutation im PKC- δ Gen mit den anerkannten standartisierten Methoden der Maustechnologie etabliert.

4.1 Etablierung eines mutanten Allels für das PKC- δ Gen in der Maus

4.1.1 Charakterisierung des genomischen Locus des PKC- δ Gens in der Maus

Die Charakterisierung des PKC- δ Locus ist notwendig, um einen *gene targeting*-Vektor konstruieren zu können und die eingeführte Mutation später im PKC- δ Gen durch Southern-Blot-Analyse zu charakterisieren.

Zur Konstruktion eines *gene targeting*-Vektors wurden Teile des PKC- δ Locus aus einer genomischen Maus-DNA-Bank isoliert und charakterisiert.

Im ersten Schritt wurde eine genomische Maus-Bibliothek (129/SV) mit einer PKC- δ cDNA Sonde (850bp FspI/StuI-Fragment) hybridisiert (Abb. 4a). Die verwendete cDNA Sonde stammte aus der Ratte, die zu 94% zur Mausequenz homolog ist und entspricht fast vollständig der regulatorischen Domäne des Proteins. Die 5' gelegene cDNA-Probe soll die

Phagenscreen für genomische Klone des PKC- δ Lokus

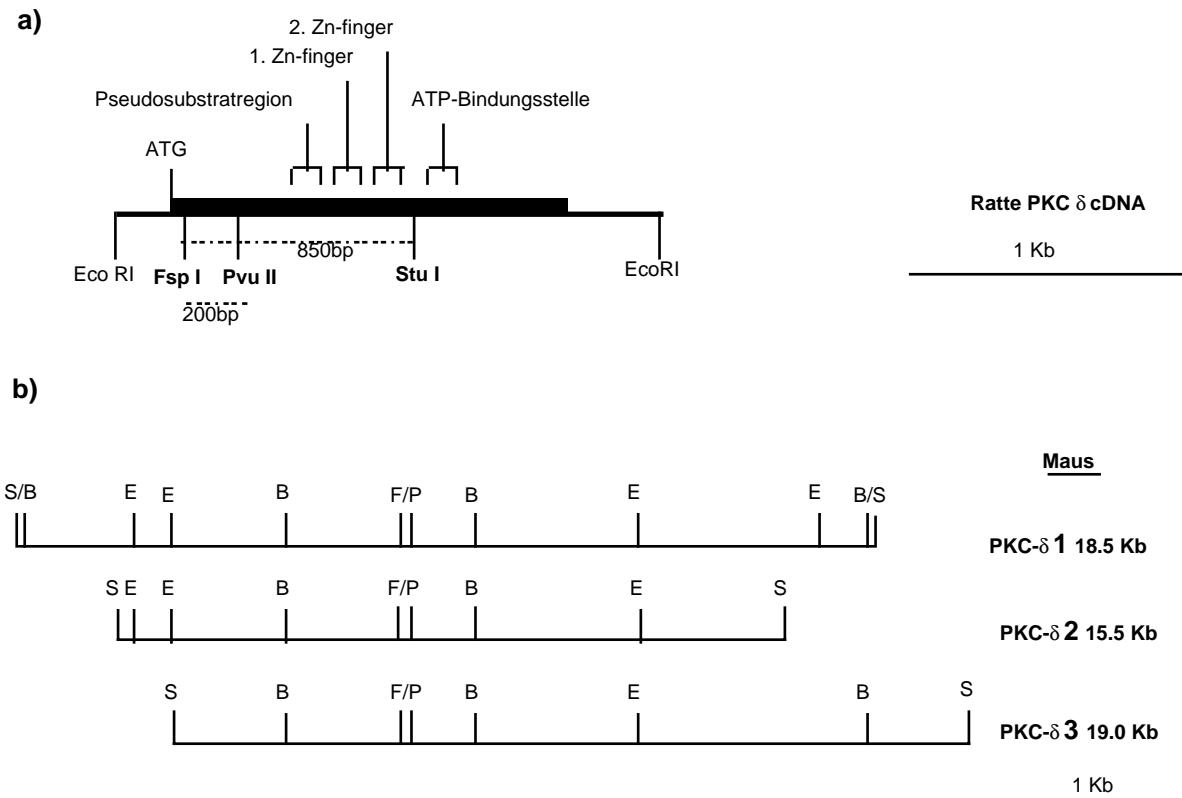


Abb. 4: Genomische Phagenklone aus dem PKC- δ Lokus in der Maus: 1. Hybridisierung mit 850bp FspI/StuI-Fragment PKC- δ cDNA der Ratte und 2. Hybridisierung mit 200bp FspI/PvuII-Fragment. Genomische PKC- δ Klone waren mit Sall in einem EMBL 3A Phagenvektor kloniert. Die Restriktionsschnittstellen waren: S: Sall; B: BamHI; E: EcoRI; F: FspI; P: PvuII.

Genomischer Lokus des PKC- δ Gens

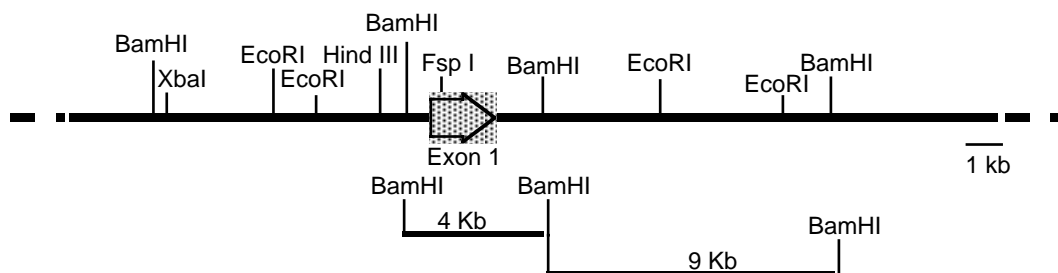


Abb. 5: Genomischer Lokus des PKC- δ Gens in der Maus: Restriktionskarte mit Orientierung und Exonbereich wurde aus den Phagenklonen PKC- δ 1-3 erstellt (s. Abb. 4). Für die Klonierung relevante Subklone sind getrennt angezeigt.

Detektion des ersten kodierenden Exons gewährleisten. Drei genomische PKC- δ Klone wurden aus der Phagenbank isoliert und gereinigt (Abb. 4b).

Anhand einer Restriktionsanalyse mit BamHI und EcoRI und entsprechender Hybridisierung wurde gezeigt, daß die isolierten Phagenklone überlappende Sequenzen enthalten und ca. 22 Kb des PKC- δ Lokus überspannen (Abb. 4b).

Durch Hybridisieren mit cDNA-Subfragmenten der Ratte wurden ca. 6 Kb nicht kodierender 5'-Bereich sowie kodierende Sequenzen der ersten 9 Exons identifiziert. Deren genauere Lokalisation wurde nicht näher kartiert, da diese Exons für die weitere Klonierungsstrategie des *lacZ-targeting*-Vektors nicht relevant waren.

Um das erste Exon mit dem Translationsstart des PKC- δ Gens zu identifizieren, wurden die Phagenklone mit einer 5'gelegenen cDNA- Sonde (200 bp FspI/PvuII Fragment) hybridisiert (Abb. 4a). Dadurch konnte das erste translatierte Exon in einem 4 Kb BamHI Subklon identifiziert werden. Da in der weiteren Klonierung des *targeting*-Vektors das erste Exon verwendet werden sollte, wurde dieser Bereich des Subklons durch eine Sequenzanalyse genauer charakterisiert (Abb. 5). Zusammengefaßt ist der kartierte PKC- δ Lokus in Abbildung 5 dargestellt.

4.1.2 Klonierung des *lacZ-targeting*-Vektor für das Maus PKC- δ Gen

Der *gene targeting*-Vektor ist Mittel zum Zweck eine Mutation durch homologe Rekombination in ein bestimmtes Gen einzuführen. Das erste Exon wurde für die Insertion der Selektionskassette und des Reportergens ausgewählt. Somit steht das *lacZ* Gen unter der direkten Kontrolle des endogenen Promotors und nur die ersten Aminosäuren von PKC- δ werden translatiert. Ein 4 Kb BamHI-Fragment und das sich 3'anschließende 9 Kb BamHI-DNA-Fragment überspannen den größten Teil des kodierenden PKC- δ Lokus und wurden als Grundgerüst für die Klonierung des Vektors ausgewählt (Abb. 5). Beide Subklone wurden aus dem λ -Phagen PKC- δ 1 isoliert (Abb. 4b). Ein Homologiebereich von insgesamt 13 Kb mit einem sogenannten kurzen Arm von ca. 1,5 Kb des *lacZ-targeting*-Vektors ist in Übereinstimmung mit veröffentlichten Arbeiten über eine hohe Frequenz homologer Rekombinationsereignisse (Hasty et al., 1991; Hasty et al., 1992; Hasty et al., 1991).

Im ersten Schritt der Klonierung wurde die FspI-Schnittstelle im Ampizillin-Resistenzgen des Klonierungsvektors pSP73 mutiert, um im folgenden die FspI-Schnittstelle des genomischen

Subklons verwenden zu können. Durch zielgerichtete Mutagenese mit einem Primer, der als SP73-Fspmut bezeichnet wird, wurde die FspI-Restriktionsschnittstelle im Ampizillin-Resistenzgen des Klonierungsvektors pSP73 mutiert (silence mutation)(Abb. 6; pSP73mut). Danach wurde das 9 Kb BamHI-Fragment in den BamHI- und BglIII-geschnittenen Vektor pSP73mut kloniert (Abb. 6, 1.). Im nächsten Klonierungsschritt wurde das 4 Kb BamHI-Fragment in der entsprechenden Orientierung in die 5'-verbleibende BamHI-Schnittstelle des pSPmut δ 9KbB/B-Plamids kloniert (Abb. 6, 2.). Aus dem resultierenden Plasmid pSPmut δ 9KbB/B wurde im letzten Klonierungsschritt durch 'blind-end'-Ligation der lacZ/neo^r-Kassette in die verbliebene FspI-Schnittstelle der *targeting*-Vektor pSPmut δ 1 18,2Kb B/B.

Klonierungsstrategie für des lacZ-targeting-Vektors

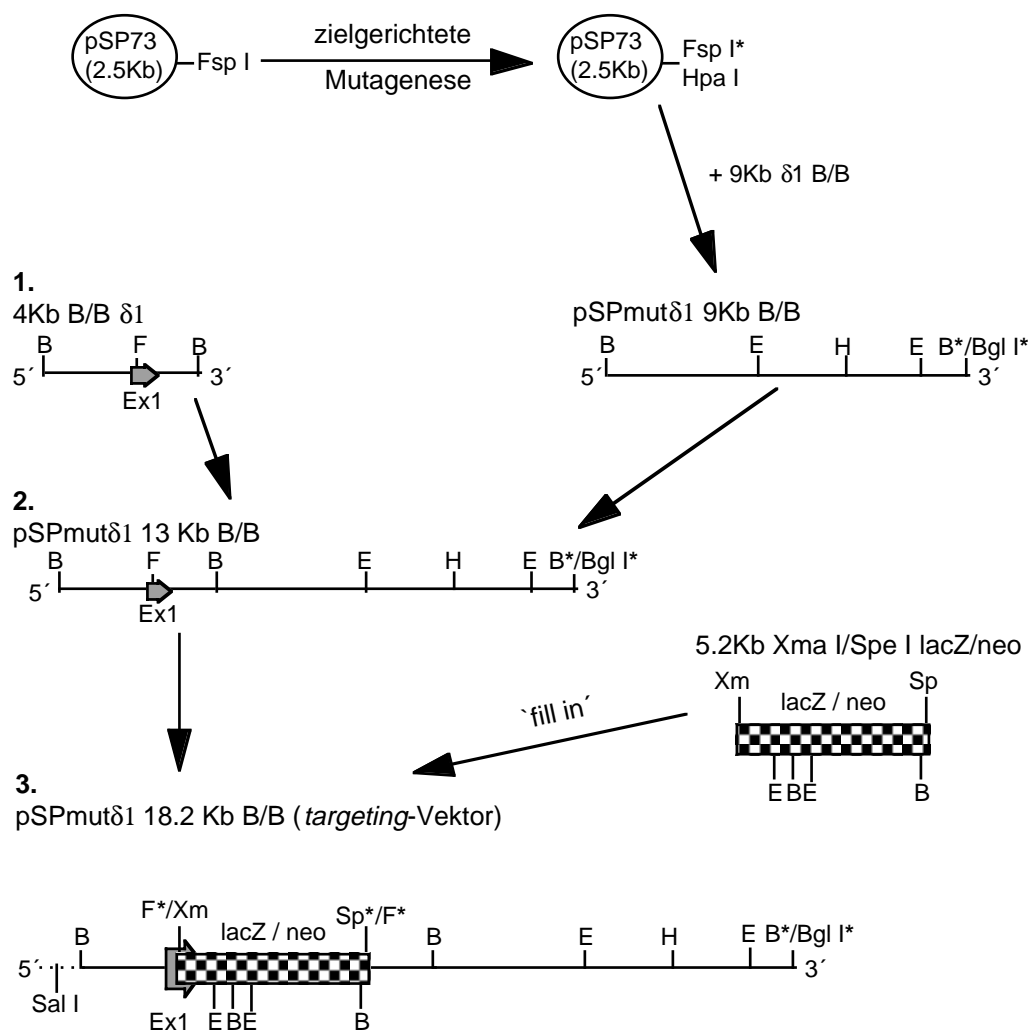


Abb. 6: Klonierungsstrategie für einen lacZ-targeting-Vektor im PKC- δ Lokus. Die einzelnen Klonierungsschritte wurden im Text erläutert (s. Abschnitt 1.1.2.2). Verwendete Abkürzungen sind: B: BamHI; E: EcoRI; Ex: Exon; F: FspI; fill in: Auffüllen von Restriktionsüberhängen; H: HindIII; pSP73: Klonierungsvektor; Sp: SpeI; X: XbaI; Xm: XmaI; *: mutierte Schnittstelle

Der korrekte Übergang des PKC- δ Gens in das Reporter-gen wurde durch Sequenzieren überprüft. Der resultierende *targeting*-Vektor enthält ein promotorloses lacZ-Reporter-gen, das sich im offenen Leseraster des PKC- δ Gens befindet und dadurch unter der Kontrolle des endogenen PKC- δ Promotors steht. Um zu gewährleisten, daß die Transkription bzw. die Translation abbricht, befinden sich innerhalb der lacZ/neo^r-Kassette mehrere Stopkodons in allen 3 Leserastern sowie Poly-A-Signale. Die korrekte Klonierung des lacZ-*targeting*-Vektors (Abb. 6) wurde vor der Transfektion in ES-Zellen anhand detaillierter Restriktionsanalysen überprüft.

4.1.3 Etablierung und Charakterisierung von homolog rekombinierten ES-Zellklonen

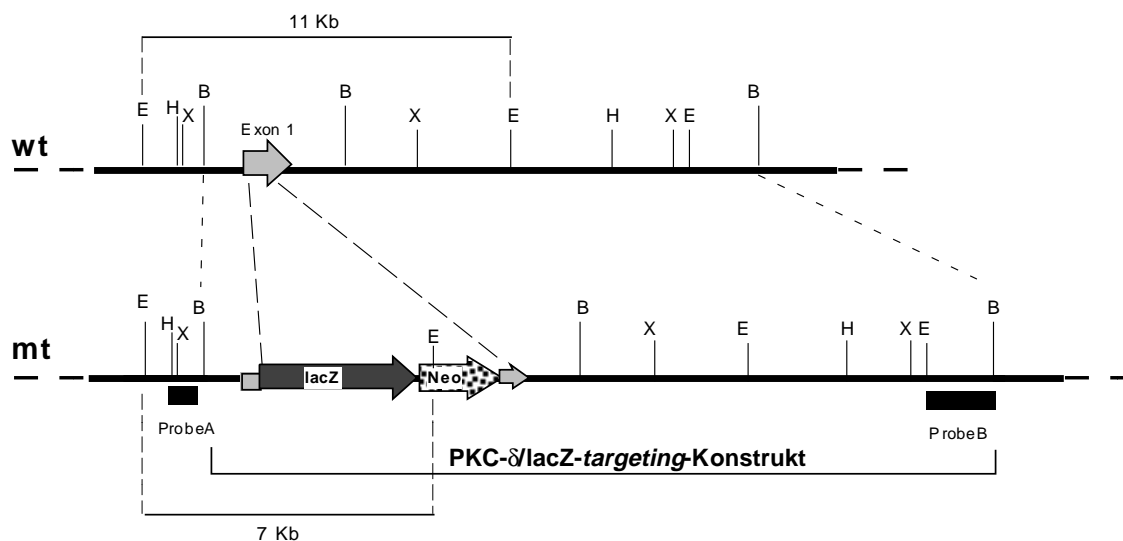
Ziel ist die Integration des lacZ-*targeting*-Vektors in den PKC- δ Lokus der Maus mittels der homologen Rekombination. Die homologe Rekombination des Vektors wird anhand eines **Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)** in Neomycin-resistenten ES-Zellklonen analysiert. Zur Transfektion wurden E14.1-Zellen verwendet. ES-Zellen sind pluripotent und somit in der Lage an der Entwicklung der Keimbahnzellen teilzunehmen (Hooper et al., 1987). Diese Pluripotenz wird durch Kultivierung auf den sogenannten embryonalen Fibroblastenzellen (EMFI's) unter besonderen Zellkulturbedingungen aufrechterhalten (Doetschman et al., 1985).

Zur Elektroporation wurden 25 μ g linearisierter *targeting*-Vektor verwendet. Es wurden 1×10^7 ES-Zellen in PBS mit dem linearen Vektor elektroporiert und auf einem EMFI-Rasen in unterschiedlichen Verdünnungen ausplattiert, um später Einzelkolonien isolieren zu können. Nach 10 Tagen Selektion mit G418 (150 μ g/ml Medium aktive Substanz) wurden insgesamt 4x 96 resistente Zellklone in 96 Loch-Zellkulturschalen vereinzelt und expandiert. Zur Identifikation eines homologen Rekombinationsereignisses wurde im Southern-Blot mit der Sonde A der RFLP analysiert (Abb. 7). Durch die Insertion einer zusätzlichen EcoRI-Schnittstelle im neo^r-Gen verkleinerte sich ein Wildtyp EcoRI-Fragment von 11 Kb auf 7 Kb im mutierten PKC- δ Lokus und konnte somit als RFLP mit Sonde A nachgewiesen werden (Abb. 7 & 8). Insgesamt konnten 5% der transfizierten und analysierten ES-Zellklone mit dem obigen RFLP identifiziert werden.

Vier davon wurden expandiert und weiter charakterisiert, um diese im weiteren Verlauf für die Etablierung der PKC- δ mutanten Mauslinie zu verwenden. Die detaillierte Charakterisierung der homologen Rekombination wurde für zwei ES-Zellklone H4 und H11 in Abb. 9 & 10 mit Wildtyp E14-DNA sowie einem nicht homolog rekombinierten ES-Zellklon (H9) als Kontrolle gezeigt.

Die verwendete Sonde A liegt außerhalb des *gene targeting*-Vektors und detektiert somit entweder das Wildtyp-Allel oder das Mutierte nach der homologen Rekombination. In der Southern-Blot-Analyse mit Sonde A wurde für die Klone H4 und H11 RFLP-Signale von 11 Kb und 7 Kb nach einem EcoRI-Verdau, nach einem XbaI-Verdau von 4,5 Kb und 10 Kb sowie nach einem HindIII-Verdau von 11 Kb und 16 Kb erwartet (Abb. 7). Für die Klone E14 und H9 wurde nur ein Signal für das Wildtyp-Allel erwartet und nachgewiesen (Abb. 7). Alle erwarteten RFLPs mit Sonde A wurden in der Southern-Blot-Analyse detektiert und sind in Abbildung 9 gezeigt.

Genomischer wildtyp und homolog rekombinierter Lokus des PKC- δ Gens in der Maus



	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	<i>Xba</i> I	<i>Hind</i> III
Sonde A	5Kb	11Kb → 7Kb	4,5Kb → 10Kb	11Kb → 16Kb
Sonde B	/	8Kb	6,5Kb	7Kb

Abb. 7: Genomischer Lokus des PKC- δ Gens in der Maus. Es ist das Wildtyp-Allel und das mutierte Allel nach Transfektion des *lacZ-targeting*-Konstrukts mit dem RFLP nach EcoRI-Verdau und Sonde A dargestellt. Die angehängte Tabelle zeigt die erwarteten RFLPs durch Southern-Blot Signale nach homologer Integration der *lacZ/neo^r*-Kassette. Abkürzungen: wt: Wildtypallel; mt: homolog rekombiniertes Allel; B: BamHI; E: EcoRI; H: HindIII; X: XbaI.

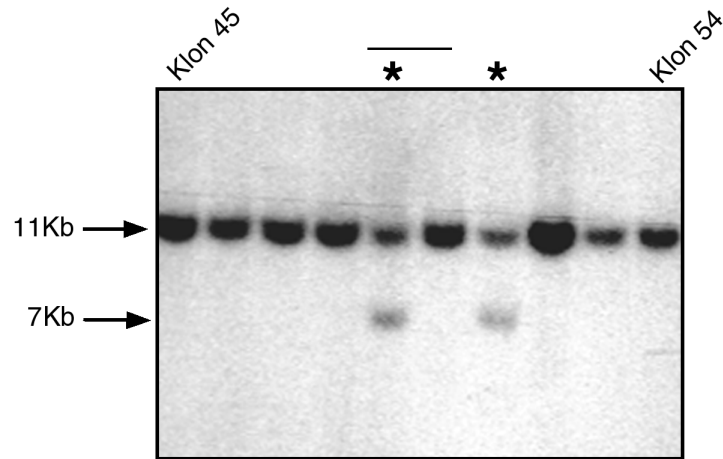


Abb. 8: Southern-Blot-Analyse EcoRI-verdauter genomischer ES-Zell-DNA nach Transfektion des lacZ-targeting-Konstrukts mit der 5'-Probe.

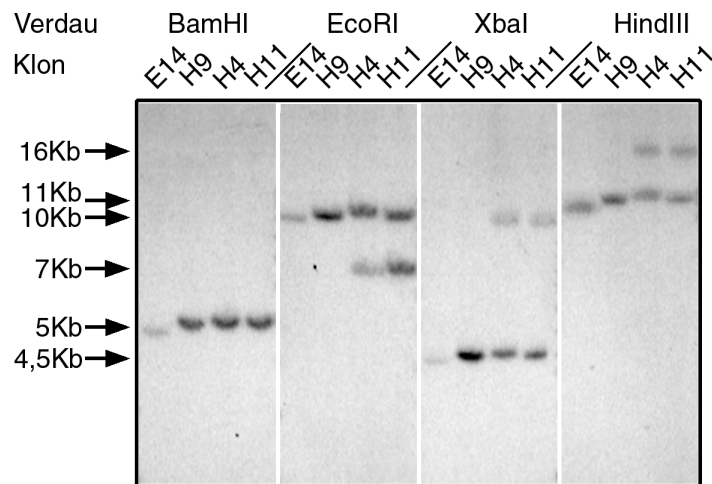


Abb. 9: Charakterisierung homolog rekombinanter ES-Zell-Klone nach Transfektion des lacZ-targeting-Konstrukts. Eine Southern-Blot-Analyse wurde mit verschiedenen Enzymen und der 5'-Probe durchgeführt.

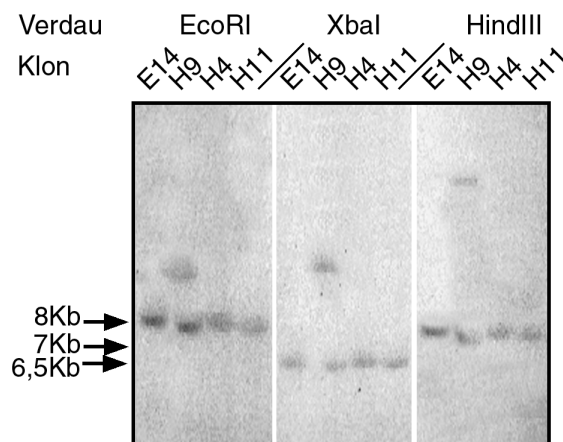


Abb. 10: Weitere Charakterisierung der homolog rekombinanten ES-Zell-Klone nach Transfektion des lacZ-targeting-Konstrukts. Eine Southern Blot Analyse wurde mit verschiedenen Enzymen und der 3'-Probe durchgeführt

Die Southern-Blot-Analyse mit der Vektor-internen Sonde B charakterisierte die Integrationshäufigkeit. Jede weitere, nicht homologe Integration kann mit einer Sonde aus dem Vektor als ein zusätzliches Signal detektierbar werden. Die homolog rekombinierten Klone H4 und H11 zeigten nur ein Signal im Southern-Blot entsprechend dem Wildtyp (Abb. 10).

Eine Übersicht des genomischen und mutierten PKC- δ Lokus wurde in Abbildung 7 dargestellt. Durch diese detaillierte Charakterisierung wurde gezeigt, daß der *lacZ-targeting*-Vektor korrekt in das ES-Zellgenom integriert ist.

Anhand der beiden ES-Zell-Klone H4 und H11 wurde mit den Sonden A und B sowie mehrerer Restriktionsenzyme ein homologes Rekombinationsereignis charakterisiert. Das Ergebnis waren zwei unabhängige ES-Zell-Klone, die jeweils ein mutiertes PKC- δ Allel tragen wie es in Abb. 7 dargestellt wurde.

4.1.4 Etablierung einer PKC- δ defizienten Mauslinie

In diesem Abschnitt wird die Etablierung einer PKC- δ defizienten Mauslinie beschrieben. Hierbei ist eine Voraussetzung, daß ein PKC- δ mutierter ES-Zellklon an der Entwicklung der Keimbahnzellen teilnimmt.

Die mutierten ES-Zellklone H4 und H11 wurden in C57BL/6-Blastozysten injiziert, um chimäre Mäuse zu generieren. Die entstandenen Chimäre werden mit Wildtyp C57BL/6-Mäusen verpaart, um Keimbahntransmission anhand der Fellfarbe in der F1-Generation zu identifizieren. (Die Manipulation der Embryonen wurde von Michael Leitges durchgeführt.)

Zur Genotypisierung der F1-Nachkommen wurde aus einer Schwanzbiopsie DNA präpariert und im Southern-Blot nach Eco RI-Verdau mit der Sonde A (Abb. 7) analysiert. Damit konnte die Keimbahntransmission des mutierten Allels nachgewiesen werden. Heterozygote wurden miteinander verpaart, um in der F2-Generation homozygote, PKC- δ defiziente Mäuse zu generieren.

Abbildung 11 zeigt ein Beispiel einer Genotypisierung von Nachkommen einer heterozygoten Verpaarung. Wie der Autoradiographie zu entnehmen ist sind sowohl Wildtyp (Maus #5), Heterozygote (Maus #10) als auch Homozygote Tiere (Maus #1) zu identifizieren (Abb. 11). Eine statistische Auswertung von heterozygoten Verpaarungen ergab eine Gleichverteilung der Geschlechter mit 51% Weibchen und 49% Männchen (n=260). Die unabhängige Mendelsche

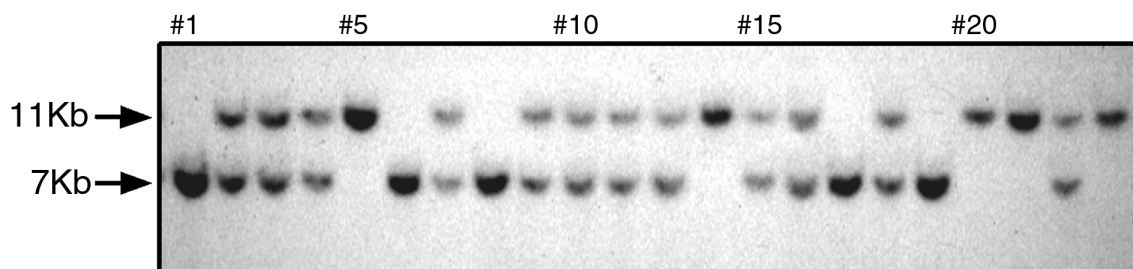


Abb. 11: Genotypisierung heterozygoter Verpaarung aus der F₂-Generation: Southern-Blot-Analyse nach Eco RI-Verdau mit Sonde A. 11 Kb zeigte den RFLP des Wildtyp-Allels und 7 Kb den des mutierten Allels an.

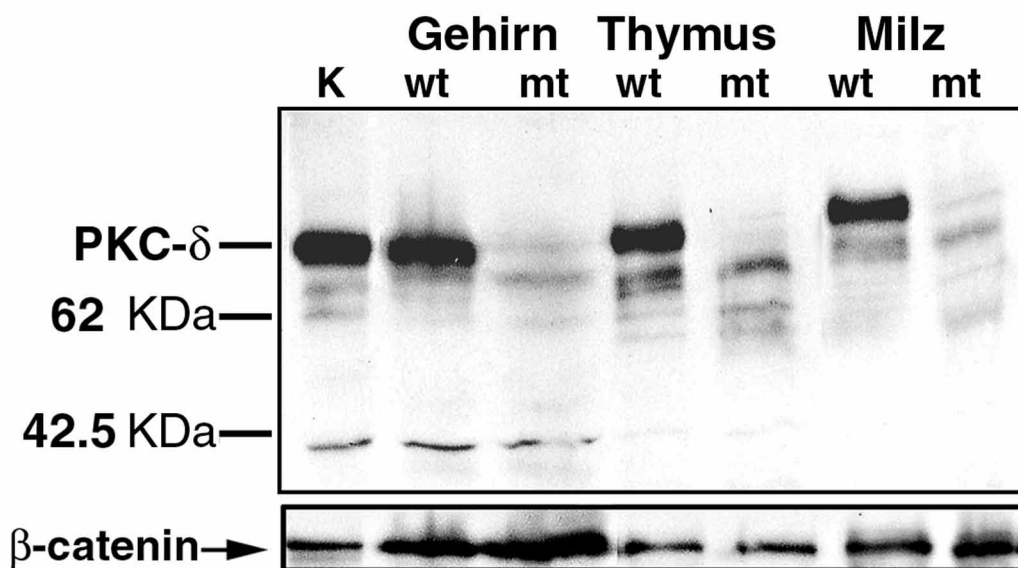


Abb. 12: Nachweis der PKC- δ Defizienz auf Proteinebene in verschiedenen adulten Geweben der Maus: K: Antikörper-Kontrolllysate aus Rattengehirn; wt: Wildtyp; mt: Mutante; PKC- δ (76 KDa) und β -Catenin (93 KDa) als Proteinladekontrolle zwischen wt und mt.

Vererbung zweier Allele von 25% Wildtyp, 50% Heterozygot und 25% Homozygot blieb im PKC- δ Knock out gewahrt. Der Signifikanzbereich für die homozygoten Tiere lag bei einer Stringenz von 95% bei \pm 2,7% und damit entsprachen 23% PKC- δ Homozygote keiner signifikanten Abweichung. Folglich sind homozygote PKC- δ Mäuse nicht embryonal lethal.

Zum Nachweis der Nullmutation für PKC- δ in der Maus ist in Abbildung 12 eine Western-Blot-Analyse gezeigt. Es wurde aus verschiedenen Geweben einer adulten Maus wie Gehirn, Thymus und Milz Gesamtprotein präpariert. Die Western-Blot-Analyse konnte nur in Wildtyp Gewebeextrakten eine PKC- δ Bande in Höhe von 76 KDa nachweisen und zeigte somit deutlich, daß in homozygoten Tieren kein PKC- δ Protein exprimiert wird (Abb. 12). Als Kontrolle der Proteinmengen zwischen Wildtyp- und mutantern Gewebe wurde das Protein β -Catenin auf dem selben Western-Blot nachgewiesen.

Zusammenfassend konnte eine PKC- δ defiziente Mauslinie etabliert werden. Die eingeführte Mutation zeigte keine Beeinflussung der mendelschen Verteilung. Durch Western-Blot-Analyse wurde der Nachweis der Nullmutation für das PKC- δ Gen geführt.

4.2 Expressionanalyse des PKC- δ Gens in der Mausentwicklung

Die *in vivo*-Expression von PKC- δ während der Embryonalentwicklung der Maus sollte mit Hilfe des lacZ-Reportergens analysiert werden. Die Daten der lacZ-Expressionsanalyse wurden in bestimmten Entwicklungsstadien mit einer *in-situ*-Hybridisierung bestätigt. Für diese Analyse wurden heterozygote PKC- δ Mäuse miteinander verpaart, um dadurch Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien und Genotypen zu gewinnen, die dann hinsichtlich ihrer lacZ-Expression untersucht wurden. Die lacZ-positiven Strukturen wurden nach M.H. Kaufman (Kaufman, 1992) identifiziert.

Anhand der Expressionsanalyse konnte eine zeitliche und räumliche Regulation des PKC- δ Gens während der Embryonalentwicklung der Maus und später auch im adulten Tier nachgewiesen werden.

Die erste (sehr schwache) Expression des lacZ-Reportergens ist mit dem Beginn der Gastrulation um 7,0 day post coitum (dpc) erkennbar. Abbildung 13a zeigt einen 7,5 dpc alten heterozygoten Mausembryo in lateraler Ansicht mit einer Expression in den extraembryonalen Geweben Chorion und Allantois. Herz- und Vorderdarm-Anlage exprimieren das Reportergen zwischen 7,5 dpc und 8,5 dpc (Abb. 13b). In den folgenden Entwicklungsstadien (9,5 dpc-11,5 dpc; Abb. 13c-e) reduziert sich die lacZ-Expression auf das Pericard. Nach dem Entwicklungstag 11,5 dpc waren auch diese Zellen nicht mehr lacZ-positiv.

Am Tag 9,5 dpc der Entwicklung (Abb. 13c) sind einzelne lacZ-positive Zellengruppen im Hinterhirn und zeitlich verschoben im ersten bis dritten Kiemenbogen nachzuweisen. Möglicherweise handelte es sich hier um Neuralleistenzellen, die von definierten Rhombomeren ausgehend in die einzelnen Kiemenbögen wandern und dort z.B. an der Entwicklung von sensorischen, sympathischen und parasymphatischen Kranialganglien teilnehmen (Gilbert, 1997). Eine starke lacZ-Expression wurde am Tag 10,5 dpc während der Entwicklung der kranialen Trigeminalganglien (V) (Abb. 13d-f; Abb. 14a-d, 5) und der Präganglienkomplexe facialis-statoacusticus (VII/VIII) (Abb. 13d-f; Abb. 14b-d, 7) in paariger Anordnung im Kopfbereich sowie der Spinalganglien (Abb. 13d-f; Abb. 14c&e, 8) paarig

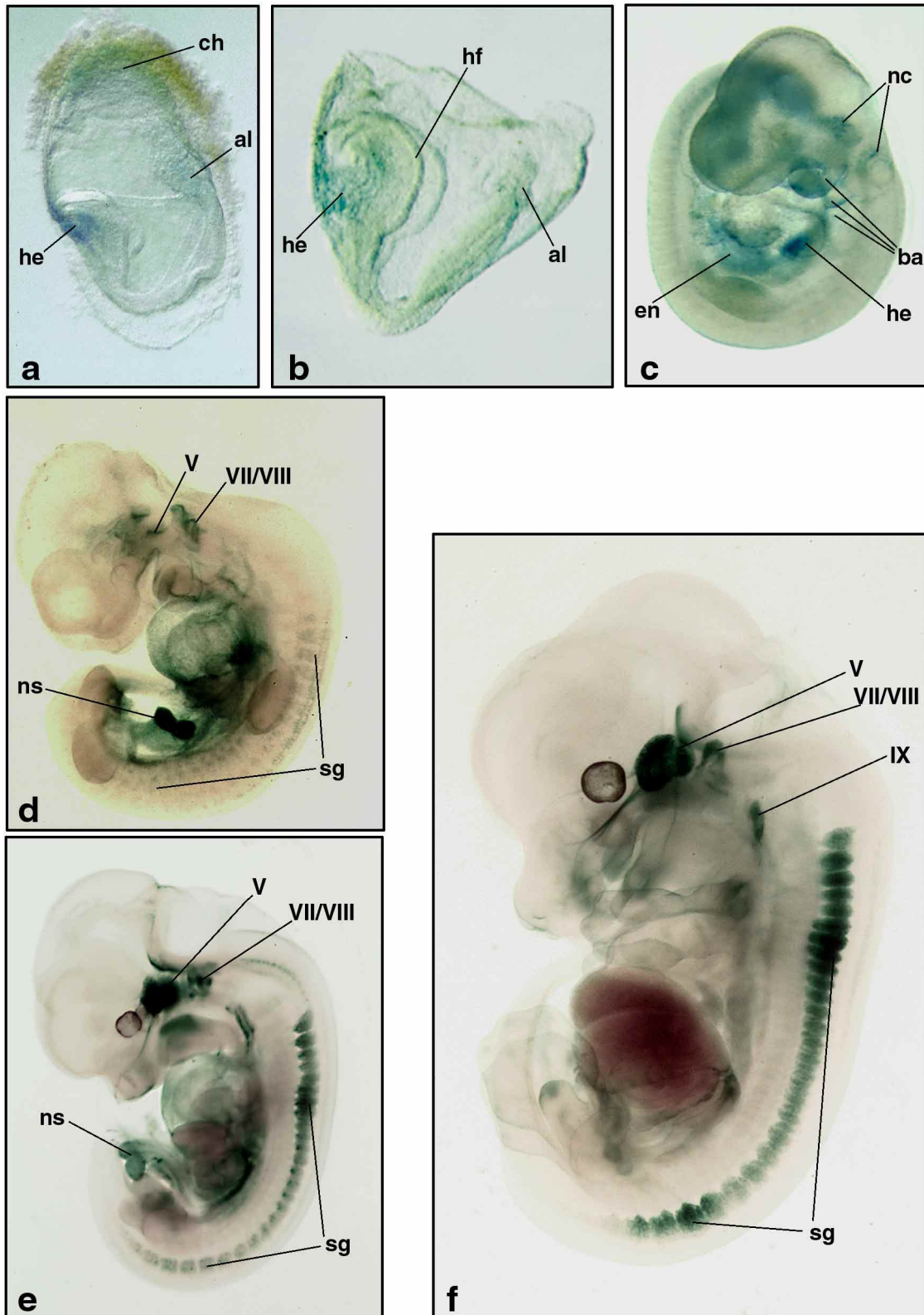


Abb. 13: Zeitreihe von heterozygoten PKC- δ Embryonen nach X-Gal Färbung: **a)** 7,5 dpc, **b)** 8,5 dpc, anterior ist links und dorsal ist oben; **c)** 9,5 dpc, **d)** 10,5 dpc, **e)** 11,5 dpc, **f)** 12,5 dpc ventral ist links und cranial ist oben. Abkürzungen: he: Herz- und Vorderdarmanlage; ch: Chorion; al: Allantois; hf: Kopfanlage; ba: Kiemenbögen; nc: neuronale Vorläuferzellen; en: Endothel von Darm, Blutgefäßen und Vorläuferleber; sg: Spinalganglion; V: Trigeminalganglion; VII/VIII: Präganglionkomplex fazialis und statoacusticus; IX: Ganglion glossopharyngeus.

entlang der sich entwickelnden Wirbelsäule detektiert. Eine Detail-Übersicht der lacZ-positiven Ganglien in Abb. 14 zeigt, daß sich im Entwicklungsstadium 12,5 dpc der Präganglionkomplex in das Ganglion facialis (VII) und in das Ganglion statoacusticus (VIII) getrennt hatten (Abb. 14c, 7+8) (Tremblay et al., 1995). Diese zeitlich und räumliche Entwicklung der einzelnen Kranialganglien teilweise aus Präganglienkomplexen kann mittels der lacZ-Expression detektiert und verfolgt werden. Zusätzlich kann eine PKC- δ Expression im Ganglion glossopharyngeus (IX) identifiziert werden (Abb. 13f; Abb. 14c, 9). Am Embryonaltag 12,5 dpc weitete sich das PKC- δ Expressionsmuster auf die Radix trigeminalis bis zum Pons aus (Abb. 14c, 10). Ab dem Embryonaltag 12,5 dpc ist auch eine β -Galaktosidasefärbung in den Nerven der Kranialganglien wie der Nervus ophthalmicus (Abb.

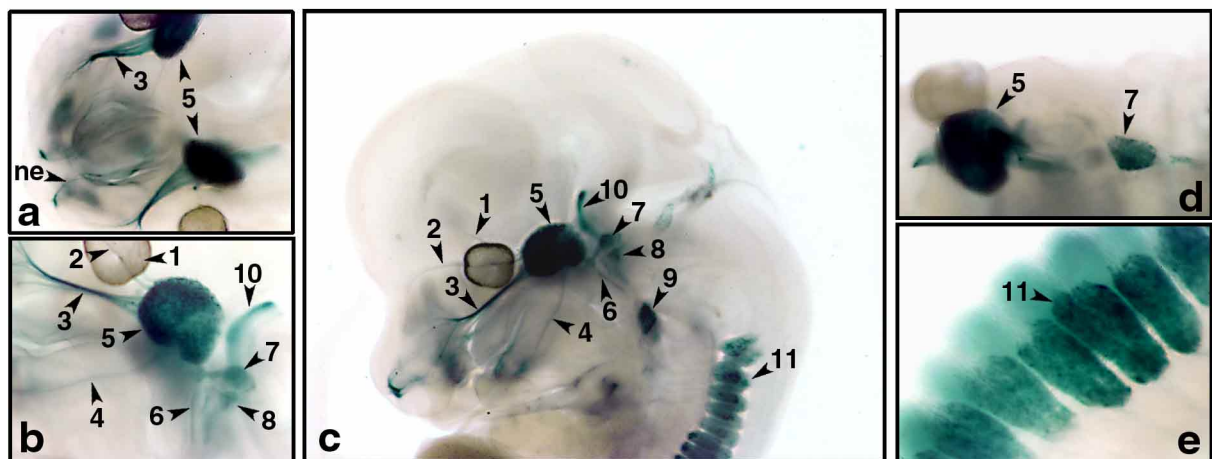


Abb. 14: X-Gal Färbung der Ganglien im 12,5 dpc alten heterozygoten Embryo: **a)** Schnauze, **b)** Bereich des Trigeminalganglions, **c)** Kopf, **d)** Trigeminal- & Ganglion facialis, **e)** Spinalganglia; a und d in cranialer Ansicht; b,c,e und f in lateraler Ansicht; 1: Nervus ophthalmicus; 2: Nervus frontalis; 3: Nervus maxillaris; 4: Nervus mandibularis; 5: Trigeminalganglion (V); 6: Nervus facialis; 7: Ganglion facialis (VII); 8: Ganglion statoacusticus (VIII); 9: Ganglion glossopharyngeus (IX); 10: Radix trigeminalis bis zum Pons; 11: Spinalganglion.

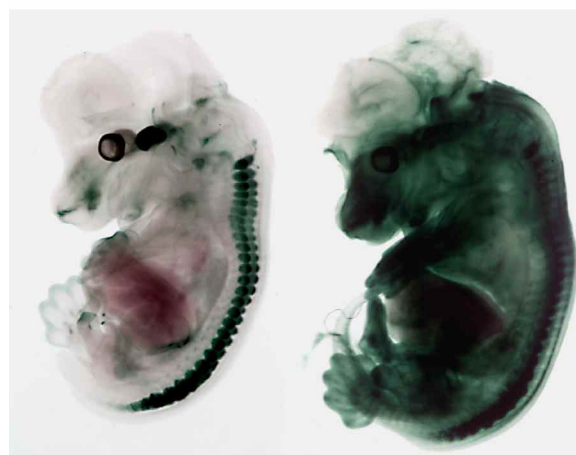


Abb. 15: Hetero- (links) und Homozygoter (rechts) PKC- δ Embryo nach X-Gal Färbung: laterale Ansicht von Tag 13,5 dpc Embryonen; Schädeldecke wurde jeweils wegpräpariert.

14c, 1), der Nervus frontalis (Abb. 14c, 2), der Nervus maxillaris (Abb. 14c, 3) sowie der Nervus mandibularis (Abb. 14c, 4) sichtbar.

In der späteren Entwicklung, hier am Beispiel eines 14,5 dpc Embryonen durch *in-situ*-Hybridisierung auf Paraffinschnitten gezeigt (Abb. 16), exprimieren der vestibulare und cochleare Teil des Ganglion statoacusticus (VIII) PKC- δ (Abb. 16d, 2+3). Gleiches traf auf den superioren und den inferioren Teil des Ganglion glossopharyngeus (IX) zu (Abb. 16d, 4+5). In diesem Zusammenhang festzuhalten bleibt, daß nicht alle Kopfganglien PKC- δ

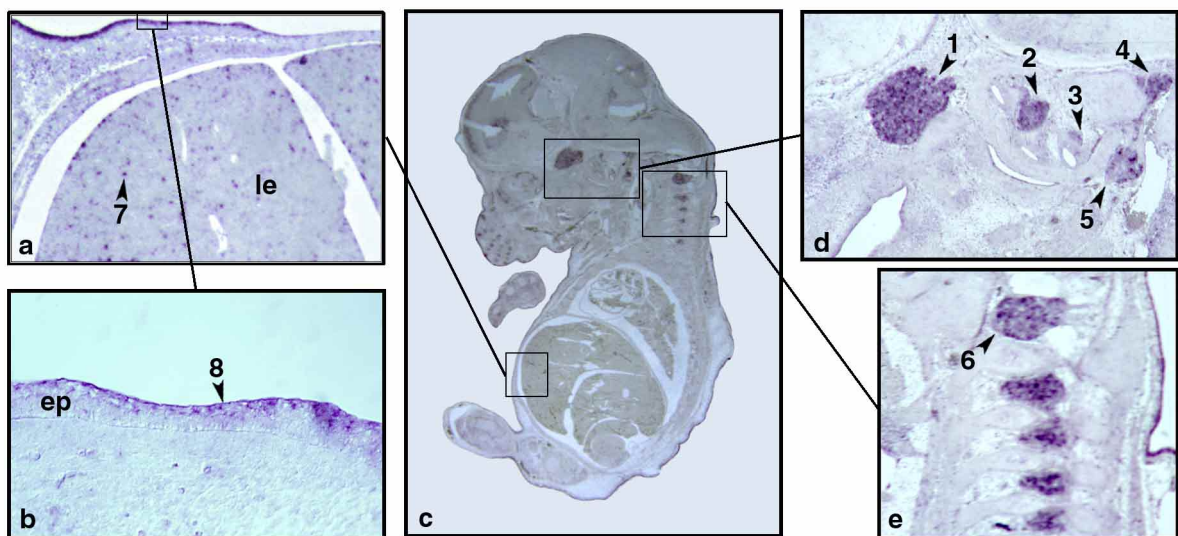


Abb. 16: *In-situ*-Hybridisierung auf Schnitten von 14,5 dpc Embryonen mit einer PKC- δ Probe: **a:** Leber und Epidermis (Ausschnitt aus c); **b:** Epidermis (Ausschnitt aus a); **c:** Übersicht als Sagittalschnitt; **d:** Kopfganglien (Ausschnitt aus c); **e:** Spinalganglien (Ausschnitt aus c); Abkürzungen: 1: Trigeminaleganglion (V); 2: Vestibularganglion (VIII); 3: Cochlearganglion (VIII); 4: Ganglion glossopharyngeus/superior (IX); 5: Ganglion glossopharyngeus/inferior (IX); 6: Spinalganglion; 7: einzelne Leberzellen; 8: Periderm und Basalschicht; le: Leber; ep: Epidermis.

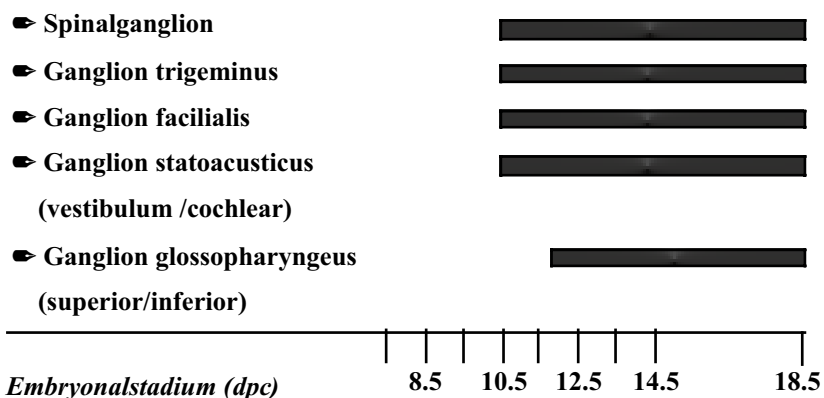


Abb. 17: Übersicht der PKC- δ Expression in verschiedenen Ganglien während der Embryonalentwicklung

exprimieren, wie z.B. die Ganglien III, IV, X und XI. In Abbildung 17 ist nochmals zusammengefaßt, daß die hier aufgeführten (V; VII; VIII; IX; sg) Ganglien in der lacZ-Analyse als auch in der *in situ*-Hybridisierung eine Expression über die gesamte embryonale Mausentwicklung zeigen.

Eine weitere Expressionsdomäne sind die epithelialen Zellen der Kiemenbögen vom Entwicklungsstadium 9,5 dpc bis 12,5 dpc (Abb. 13c-f). Ab dem Embryonaltag 14,5 dpc sind lacZ-positive Zellen in allen stratifizierten Schichten der Epidermis eines heterozygoten Embryos detektiert, was hier am Beispiel einer *in situ*-Hybridisierung in Abb. 16b gezeigt ist. Das Epithel ist zu diesem Zeitpunkt dreischichtig. Die pallisadenförmigen Zellen des basalen Stratum germinativum begrenzen die darunterliegende Dermis. Apikal befindet sich eine zweite Basalschicht, die später zum Stratum spinosum wird. Die äußerste, temporäre Hüllschicht bildet das Periderm (Roberts, 1993; Gilbert, 1997). Das Periderm und die Basalschicht zeigen die stärkste PKC- δ Expression, das Stratum germinativum hingegen exprimiert PKC- δ nur sehr schwach (Abb. 16b). Während der weiteren Stratifizierung der Epidermis ist zusätzlich das gesamte Stratum granulosum lacZ-positiv (Abb. 18, 16,5 dpc). Diese Zellen sind nur noch in der Lage zu differenzieren und bilden durch vermehrte Keratineinlagerung das Stratum corneum (Abb. 18, 18,5 dpc). Das Stratum corneum ersetzt das Periderm als temporäre Hüllschicht und zeigt auch eine Expression des Reportergens.

Mit Beginn der Stratifizierung der Epidermis zwischen 13,0 dpc und 14,0 dpc, ist zum ersten Mal ein Unterschied zwischen heterozygotem und homozygotem Expressionsmuster

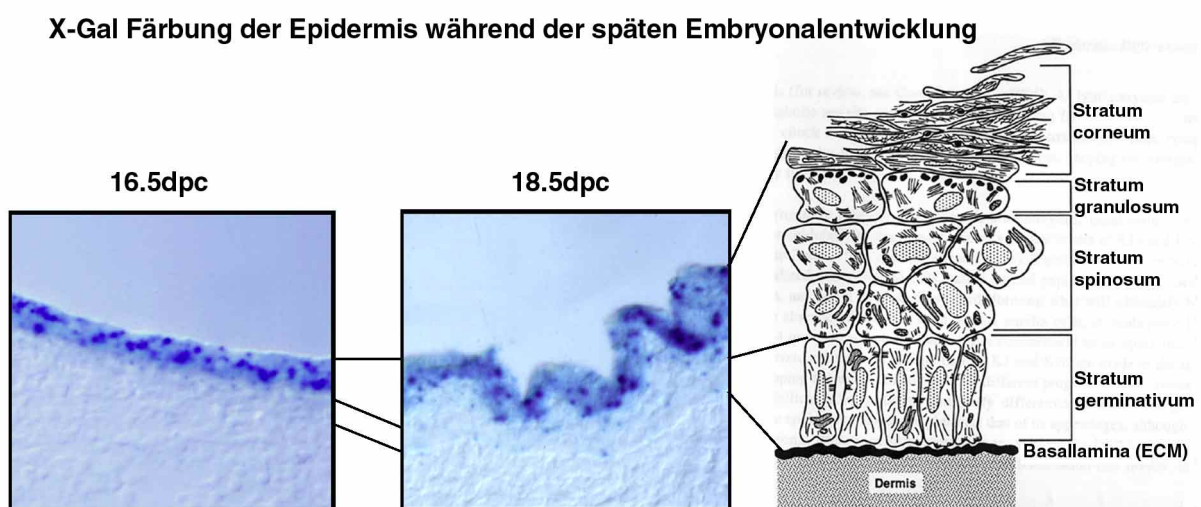


Abb. 18: LacZ-Expression in 16,5 dpc und 18,5 dpc transversen Kryoschnitten der Epidermis. Zur Übersicht die schematische Darstellung der Epidermis (E. Fuchs, 1994)

detektiert worden (Abb. 14). Homozygote Embryonen zeigen zu diesem Zeitpunkt eine intensive β -Galaktosidasefärbung der gesamten embryonalen Epidermis, während in Heterozygoten noch keine starke epitheliale lacZ-Expression detektierbar ist. Dieses genotypisch unterschiedliche Expressionsmuster deutet auf einen negativ regulatorischen Einfluß des PKC- δ Proteins auf die eigene Expression zu Beginn der epidermalen Stratifizierung hin (Harris et al., 1997).

Eine Auflistung der weiteren zeitlichen und gewebespezifischen Expression des lacZ-Fusionsproteins während der Embryonalentwicklung wird im folgenden Abschnitt gegeben (Daten nicht gezeigt).

Im Anfangsstadium der Hämatopoese (8,5 dpc - 9,5 dpc) lassen sich lacZ-positive Zellen im Mesoderm der dorsaler Aorta, der Gonaden und des Mesonephros (AGM-Region) nachweisen. Die β -Galaktosidasefärbung setzt sich in hämatopoetisch aktiven Geweben fort, wie im Leberprimordium am Tag 9,5 dpc, ab 11,5 dpc nur noch in vereinzelt Zellen der Leber. Ab 14,5 dpc ist eine PKC- δ Expression in der Milz und ein Tag später (15,5 dpc) auch im Knochenmark nachzuweisen. LacZ-Expression im Thymus ist erst ab 16,5 dpc detektierbar (Gilbert, 1997)(Robb, 1997).

Zusätzlich zur Epidermis zeigen Gewebe ektodermalen Ursprungs wie das orale und nasale Epithel (ab 11,5 dpc) sowie die Linse (ab 10,5 dpc) eine Expression von PKC- δ .

Weiterhin sind viele Endothelien wie z.B. das Darmendothel (ab 9,5 dpc), das Lungen- (ab sowie das Magenendothel (ab 10,5 dpc) lacZ-positiv. Auch die Endothelzellen des gesamten Blutgefäßsystems zeigen in der späten Embryonalentwicklung (16,5 dpc) eine β -Galaktosidasefärbung.

Zusammenfassend läßt sich eine Expression von PKC- δ in einer Reihe Neuralleistenderivaten, in epithelialen und endothelialen Geweben sowie in lymphatischen Organen während der Embryonalentwicklung in einer zeitlich und gewebespezifisch streng kontrollierten Form nachweisen.

4.3 Analyse des Phänotyps PKC- δ defizienter Mäuse

Welche Funktion hat PKC- δ in der adulten Maus? Diese Frage soll anhand der etablierten PKC- δ defizienten Mauslinie analysiert werden. Ansätze für eine mögliche physiologische Funktion von PKC- δ soll anhand der lacZ-Expression und der Untersuchungen von adulten Mäusen gegeben werden. In der Epidermis wird die PKC- δ Funktion detaillierter analysiert.

Die Untersuchung von Nachkommen aus heterozygoten Verpaarungen in einem Alter *post natal* bis juvenil ergab keinen Unterschied in Bezug auf Größe, Gewicht sowie das Säugeverhalten zwischen Wildtyp und Homozygot.

4.3.1 Potentielle Verhaltensanomalien

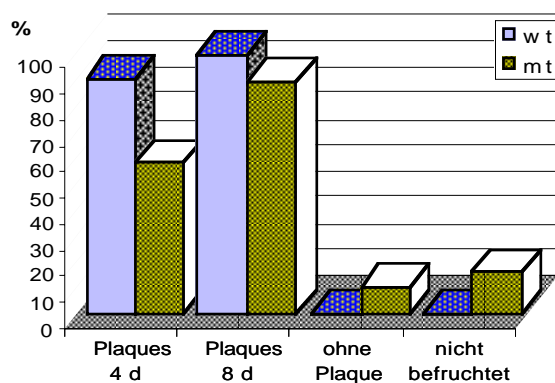
Erste Beobachtungen von PKC- δ mutanten Mäusen deuteten auf mögliche Verhaltensanomalien in der Reproduktion hin. Dies gilt sowohl für männliche als auch für weibliche Tiere. Das Verhalten von männlichen Mäusen im Hinblick auf eine Verpaarungsbereitschaft und deren Durchführung ist primär durch Instinktverhalten gesteuert und führt unter Normalbedingungen zu einer hohen Erfolgsquote. Die Befruchtungsrate von Wildtypweibchen nach Verpaarungen mit homozygoten Männchen war eindeutig herabgesetzt.

Um die Sterilität zu testen, wurden 20 homozygote Männchen im Alter von 10 Wochen mit jeweils 3 Wildtypweibchen (NMRI) verpaart (Abb. 19). Der Erfolg der Verpaarung wurde täglich anhand des Vaginalpfropfs (plug) beim Weibchen überprüft. Das Weibchen wurde *post coitum* separiert, um im folgenden die Befruchtung zu analysieren. Während des 4 Tage-Zyklus der Weibchen (Wasarman & DePamphilis, 1993) kam es bei 90% der Kontrollgruppe (Wildtypmännchen) zum Koitus (Abb. 19; wt). Homozygot mutante Männchen zeigten in dieser Zeit eine verminderte Koitusrate von 58% (Abb. 19; mt). Während des folgenden Zyklus (8 d) ergab sich mit insgesamt 89% an produzierten plugs bei PKC- δ mutanten Männchen immer noch eine Erniedrigung im Vergleich zur Kontrollgruppe (100%; Abb. 19).

Zusammenfassend zeigten PKC- δ defiziente Männchen selbst nach einem doppelten Verpaarungszeitraum (8 d) im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Koitusrate von 11%. Gleichzeitig ergab sich nach 8 d auch eine verminderte Befruchtungsrate *post coitum* von

16% (Abb. 19). Andererseits ist aber der Prozentsatz an sterilen PKC- δ defizienten Männchen nicht signifikant erhöht.

Um einen möglichen Defekt in der Spermatogenese der PKC- δ mutanten Männchen als Ursache für dieses Verhalten auszuschließen, wurden Testes histologisch und anhand der lacZ-Expression analysiert. Abbildung 20a zeigt ein charakteristisches Bild der β -Galaktosidasefärbung an 5 Monate alten Testes von homozygoten Männchen. Ausschließlich Endothelzellen des Blutgefäßsystems konnten mittels serieller Schnitte als lacZ-positiv identifiziert werden. Die Reifung der Spermadien wie die Anzahl der ins Lumen des Tubulus ragenden Spermien oder Größe und Form der Spermienkörper weisen keine morphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp und Homozygoten auf, wie Abbildung 20b & c am Beispiel von Homozygoten zeigt. Funktionale Tests, wie z.B. die Beweglichkeit der Spermien, wurden aufgrund eines fehlenden Zusammenhangs zwischen PKC- δ Expression und der Spermatogenese nicht durchgeführt.



in %	wt	mt
Plaques 4 d	90	58
Plaques 8 d	100	89
ohne Plaque	0	11
nicht befruchtet	0	16

Abb. 19: Verpaarungsexperiment mit homozygoten PKC- δ Mäusen: Verpaarung von 1 Männchen (10 Monate) mit jeweils 3 NMRI-Weibchen (Wildtyp) über 8 Tage (d). Die Gruppe der homozygoten PKC- δ Mäuse (mt) bestand aus 20 Tieren und die heterozygote Kontrollgruppe (wt) aus 10 Tieren. Plaques wurden täglich überprüft und positive Weibchen separiert. 'Ohne Plaque': kein Plaque detektierbar und nicht befruchtet; 'nicht befruchtet': Plaque-positiv, aber unbefruchtet.



Abb. 20: Analyse geschlechtsreifer, homozygoter PKC- δ Testes: **a:** β -Galaktosidasefärbung von Blutgefäßen in 'whole mount'-Testes (5 M); **b:** Paraffinschnitt (5 μ m) von Testes (5 M) nach Hämatoxylinfärbung (100 fach vergrößert); **c:** 630 fache Vergrößerung von b.

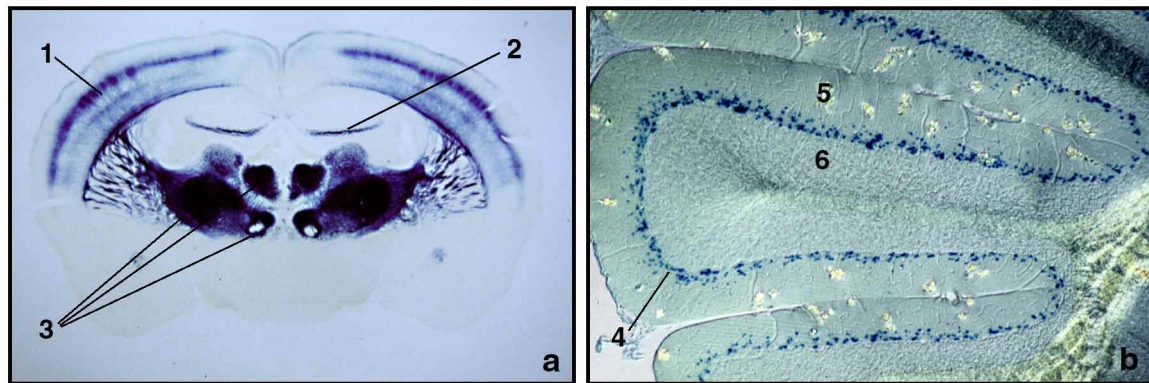


Abb. 21: β -Galaktosidasefärbung von adultem Gehirn einer PKC- δ defizienten Maus: **a:** coronaler Vibratomschnitt (50 μ m); **b:** sagitaler Ausschnitt des Zerebellum; 1: Kortex; 2: C3/4 Region des Hippocampus; 3: Thalamus; 4: Purkinje-Zellen; 5: molekulare Schicht; 6: Granuläre Schicht.

Aus ersten Beobachtungen von PKC- δ defizienter Weibchen ging hervor, daß diese ein verändertes Fürsorgeverhalten zeigen. Während Wildtypweibchen nach dem Werfen (*post partal*) ihre Nachkommen im Nest zusammenhalten, wärmen und säugen, zeigen homozygote Muttertiere kein oder ein sehr vermindertes Fürsorgeverhalten. Dies ist unabhängig vom Genotyp der Neugeborenen. Als Folge starben alle Nachkommen binnen der ersten drei bis vier Tage (Abb. 22). Während der ersten Tage *post partal* verließen Wildtypweibchen ihr Nest mit den Nachkommen nur selten (wie z.B. zur Nahrungsaufnahme) und zeigen daher ein sehr intensives Fürsorgeverhalten.

Als Mittel um dieses maternale Verhalten statistisch zu erfassen, wurde zum Einen die Verweildauer der Mutter im Nest innerhalb der ersten postpartalen 12 h über 20 min untersucht (Brown et al., 1996) (Abb. 23b). Die durchschnittliche Verweildauer von heterozygoten Muttertieren entsprach exakt der des Wildtyps (19 min), während PKC- δ defiziente Weibchen mit 9,5 min im Nest deutlich unter diesem Wert blieben (Abb. 23b).

Zum Anderen wurde das Zurückbringen der Nachkommen ins Nest untersucht (Brown et al., 1996). Hierzu wurden in den ersten 24 h *post partal* die Neugeborenen für 1 h aus dem Käfig entfernt, und danach 3 Junge in die Käfigecken außerhalb des Nests gelegt. Das Diagramm in Abbildung 23a gibt die benötigte Zeit für das Einsammeln der Neugeborenen durch das Muttertier und das anschließende Wärmen der Jungen über einen Zeitraum von 20 min wieder. PKC- δ defiziente Weibchen benötigten durchschnittlich mehr als 6 min um die 3 Neugeborenen zurück ins Nest zu bringen, während die Kontrolltiere weniger als 1 min brauchten. Das anschließende Wärmen der Jungen betrug bei den homozygoten Tieren nur noch durchschnittlich 11 min im Vergleich zu 18 min beim Wildtyp.

Dies führte zum Tod der Neugeborenen während der ersten Lebensstage (Abb. 22).



Abb. 22: PKC- δ defizientes Muttertier im Alter von 10 Wochen mit ihren vier Nachkommen, die innerhalb von drei bis vier Tagen an Unterernährung starben. Dieses Foto entstand drei Tage *post partal*.

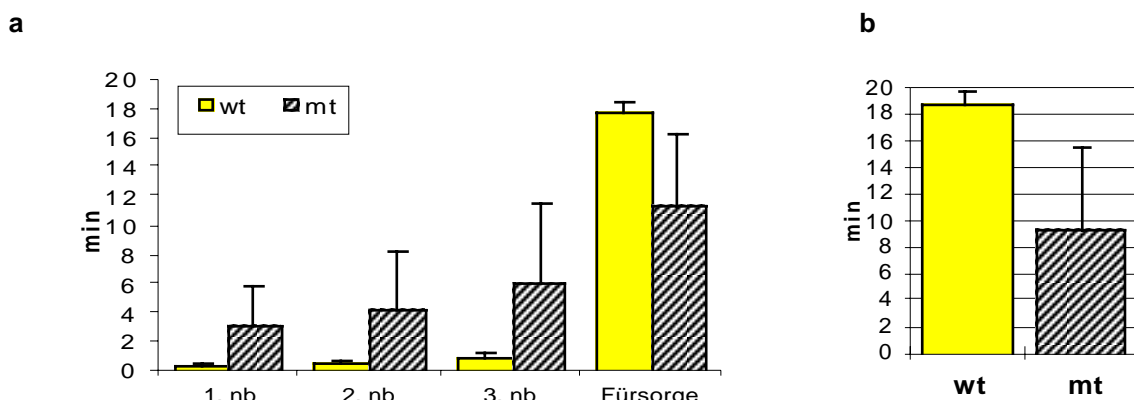


Abb. 23: Fürsorgeverhalten von PKC- δ defizienten und Wildtyp Mäusen: **a:** benötigte Zeit (min), um die Neugeborenen (nb) zurück ins Netz zu bringen mit anschließendem Fürsorge-Verhalten innerhalb der ersten 24 h nach der Geburt über einen Zeitraum von 20 min. **b:** Maternales Verhalten innerhalb der ersten 12 h *post partal* über einen Zeitraum von 20 min im Vergleich von Wildtyp (wt; n=12) und PKC- δ defizienten Tieren (mt; n=6). Alle Angaben entsprechen dem Mittelwert mit entsprechender Abweichung als Fehlerangabe. Weitere experimentelle Erläuterungen s. Text.

Einen Zusammenhang zwischen maternalem Verhalten und PKC- δ Expression könnte die Analyse des Expressionsmusters im Gehirn liefern. Zu diesem Zweck wurden Vibratonschnitte von adultem Gehirn angefertigt und eine β -Galaktosidasefärbung durchgeführt.

In Abbildung 21a ist ein coronaler Vibratonschnitt eines adulten PKC- δ defizienten Gehirns dargestellt. Es zeigte sich eine intensive β -Galaktosidasefärbung im gesamten Thalamus (Abb. 21 #3), in den Axonen, die vom Thalamus in den Kortex projizieren, sowie einzelnen Schichten des Kortex (Abb. 21 #1). Die Expression im Hippocampus beschränkte sich auf die sogenannte CA3/4 Region (Abb. 21 #2). Im Zerebellum trat eine β -Galaktosidasefärbung in der Schicht der Purkinje-Zellen (Abb. 21 #4), die zwischen der molekularen Schicht (Abb. 21 #5) und der granulären Schicht (Abb. 21 #6) liegt, auf (Abb. 21b).

Der Thalamus im Zusammenspiel mit dem Kortex wird in der Maus als Zentrum der Regulation für Instinktverhalten, wie Aggression oder die Fürsorge gegenüber Nachkommen,

betrachtet. Eine intensive lacZ-Expression im Thalamus und Kortexarealen deutet auf mögliche funktionale Defekte in Gehirnzentren für die Verhaltensregulation hin und kann eine mögliche Erklärung für das veränderte Fürsorgeverhalten von PKC- δ defizienten Weibchen sein (Schmidt R.F. & Thews G., 1985).

Während der weiteren Verpaarung über Generationen zur Generierung von homozygoten Tieren, wurde festgestellt, daß in der Verhaltensanalyse die Nachkommen eines homozygoten Weibchens überleben. Der anfangs drastische Phänotyp wurde mit zunehmender Generationenzahl immer mehr abgeschwächt. Dies könnte die Folge von Heterozygotenverpaarungen untereinander und folglich einer Durchmischung des 'Genpools' über mehrere Generation sein. PKC- δ mutante Tiere sind während dieser Phänotyp-Analyse nicht isogen, d.h. sie bestehen immer noch aus Anteilen der 129/SV ES-Zellen und C57BL/6 Blastozysten.

4.3.2 Immunologischer Einfluß auf die Lebenserwartung?

Die Haltung von PKC- δ defizienten Mäusen zeigte, daß diese im Vergleich zum Wildtyp eine verkürzte Lebenserwartung von ungefähr 0,5-1,0 Jahren besitzen. Im Gegensatz dazu liegt die durchschnittliche Lebenserwartung einer Wildtypmaus bei ca. 1,5-2,0 Jahren (Wasarman & DePamphilis, 1993). Eine statistische Auswertung von 22 PKC- δ defizienten Tieren ergab eine durchschnittliche Lebenserwartung von 5 Monaten +/- 1,45. Eine *post mortem* Untersuchung des Situs der inneren Organe ließ eine deutliche Splenomegalie erkennen. Im Mittel konnte eine Gewichtszunahme um das 3-4 fache einer Wildtypmaus beobachtet werden. Gleichzeitig wurde im direkten Vergleich mit dem Wildtyp festgestellt, daß der Thymus fast vollständig degradiert ist. Eine Situs-Analyse in Abhängigkeit vom Alter der Tiere zeigte, daß sich bereits nach 3-4 Monaten eine Splenomegalie in PKC- δ defizienten Mäusen manifestierte. Gleichzeitig konnte eine verstärkte Thymusdegradation festgestellt werden. Abbildung 24 zeigt den Situs einer 5 Monate alten PKC- δ defizienten Maus im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Beide Mäuse zeigten äußerlich keine Auffälligkeiten. Deutlich ist zu sehen, daß die Milz der Wildtypmaus (Abb. 24a) 100 mg wog, während die der PKC- δ homozygoten Maus 400 mg wog (Abb. 24b). Die Gewichtsverhältnisse für den Thymus waren umgekehrt, der homozygote Thymus wog 20 mg (Abb. 24d), der Wildtyp-Thymus besaß ein Gewicht von 60 mg (Abb. 24c). Der zeitliche Verlauf der Veränderung dieser

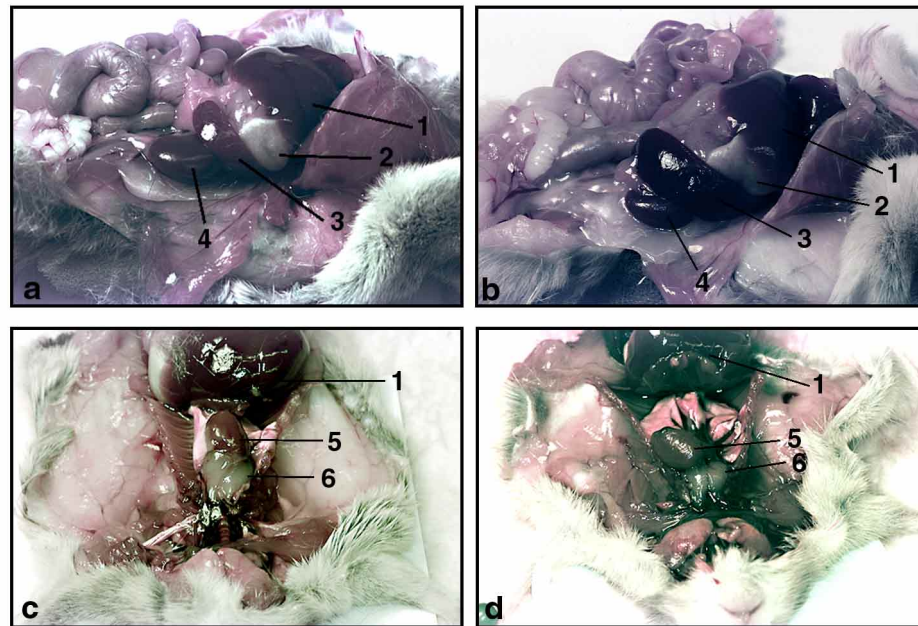


Abb. 24: Situs einer 5 Monate alten Wildtyp und PKC- δ defizienten Maus: **a + c:** Wildtyp; **b + d:** PKC- δ Knock out Maus; **a + b:** Situs Bauchraum; **c + d:** Situs Brustraum; 1: Leber; 2: Magen; 3: Milz; 4: Niere; 5: Herz; 6: Thymus

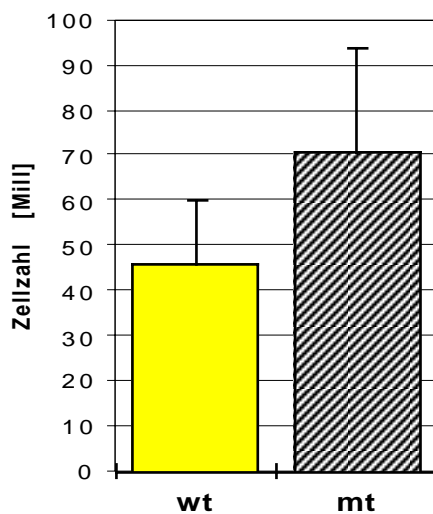


Abb. 25: FACS-Analyse von B-Lymphozyten aus der Milz: Die Milz wurde aus 6 Monaten alten Wildtyp (wt) und PKC- δ Knock out (mt) Mäusen präpariert. Reife B-Lymphozyten wurden als B220⁺ / IgM⁺ definiert. Zellzahlen waren Mittelwerte von 6 Tieren inklusive der Standardabweichung. (Daten entstammen dem Labor von Prof. A. Tarakhovsky)

lymphatischen Organe war signifikant, aber altersabhängige Fixpunkte wiesen eine hohe Variabilität auf. Bezüglich der oben beschriebenen Beobachtung wird eine detailliertere Untersuchung von Lymphozyten im Rahmen einer Doktorarbeit im Labor von Prof. A. Tarakhovsky (Institut für Genetik der Universität zu Köln) durchgeführt. Erste Resultate zeigen eine erhöhte Anzahl (Faktor 2) an reifen B-Zellen der Milz in älteren PKC- δ defizienten Mäusen (Abb. 25). Auch die Anzahl der übrigen Milzzellen ist proportional mit den reifen B-Lymphozyten angestiegen. B-Zellen des Peritoneums, sowie unreife B-Zellen des Knochenmarks zeigen bei PKC- δ defizienten Mäusen keine Veränderungen. Die Populationen

von Thymozyten scheinen sich nicht von denen der Wildtypmaus zu unterscheiden. Weitere Untersuchungen der reifen B-Zellen in PKC- δ defizienten Mäusen, die z.B. die Lebensspanne bzw. das apoptotische Verhalten untersuchen, sind Gegenstand aktueller Analysen (Labor von Prof. A. Tarakhovsky).

4.3.3 Epidermis und Keratinozyten

Die Epidermis ist ein stratifiziertes Epithel und besteht hauptsächlich aus Keratinozyten. Ziel ist die Analyse der physiologischen Funktion von PKC- δ in Keratinozyten mittels der eingefügten Nullmutation in das PKC- δ Gen. In diesem Abschnitt wird ein möglicher Einfluß von PKC- δ in der *in vivo*-Wundheilung sowie den damit verbundenen epidermalen Prozessen der Adhäsion, Proliferation und Migration in Keratinozyten analysiert.

Eine β -Galaktosidasefärbung von PKC- δ defizienter, postnataler Haut zeigt in Abbildung 26a, daß die Expression in allen epidermalen Stratifizierungen detektiert werden kann.

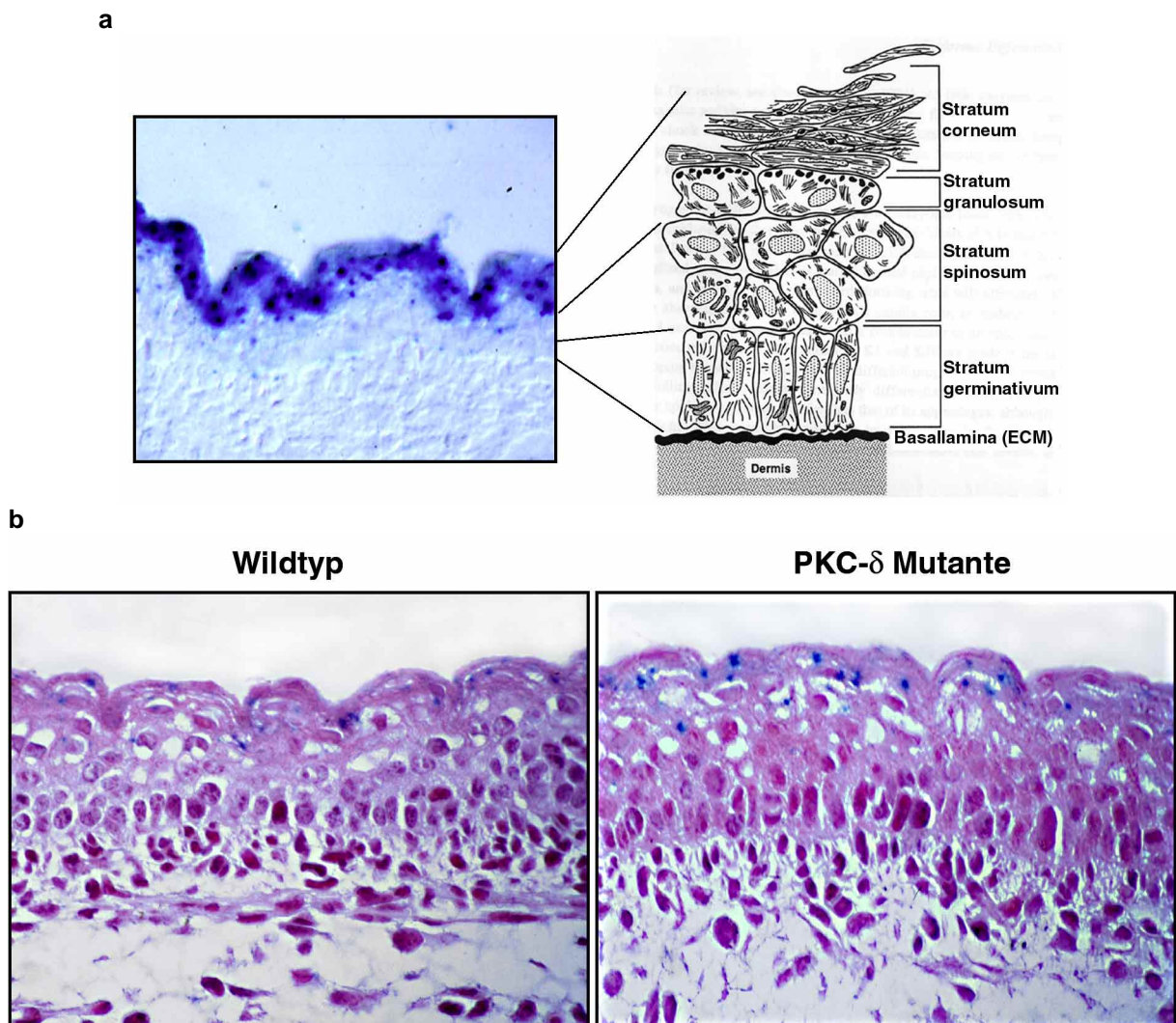


Abb. 26: **a:** X-Gal Färbung eines Sagittalschnittes postnataler PKC- δ defizienter Haut: Gezeigt ist ein Kryostatschnitt (10 μ m) und die schematische Unterteilung der einzelnen Epidermisschichten (Ref.: E. Fuchs, 1994). **b:** Histologie postnataler Wildtyp und PKC- δ defizienter Haut. Paraffinschnitte (2 μ m) wurden mit Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt.

Dieses Expressionsmuster, eine starke Expression der PKC- δ Isoform anhand von RT-PCR in der gesamten Epidermis sowie Resultate aus diversen *in vitro*-Studien postulieren ihre funktionelle Bedeutung in diesem Gewebe (Gschwendt et al., 1986; Wang et al., 1993). *Post natale* Haut wurde zur morphologischen und immunhistochemischen Analyse verwendet, da zu diesem Zeitpunkt die Stratifizierung am besten erkennbar ist. Die Haut von PKC- δ defizienten Mäusen zeigt in der histologischen Analyse – unter Berücksichtigung der natürlichen Varianz - keinen Unterschied in ihrer Stratifizierung und regeneriert sich vollkommen unauffällig im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 26b).

4.3.3.1 *In vivo*-Wundheilung

Die Haut von PKC- δ defizienten Mäusen läßt nach oberflächlicher Betrachtung im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied erkennen. Zur Untersuchung der Epidermis unter Stressbedingungen wurden Wundheilungsexperimente durchgeführt, um die Rolle von PKC- δ während der *in vivo*-Wundheilung in der Epidermis zu analysieren. Ein Wundheilungsexperiment hat im Gegensatz zum Regenerationsvorgang der Epidermis den Vorteil, die basalen Prozesse der Keratinozyten, wie Proliferation, Adhäsion und Migration, zu induzieren (Martin, 1997).

Nach einer Verletzung der Epidermis entsteht zum schnellen Wundverschluß zuerst ein Wundpfropf (Abb. 27, 1). Die basalen Keratinozyten der Epidermis sind für den Vorgang der Reepithelialisierung, die Wiederherstellung der epidermalen Schicht, verantwortlich. Wesentliche Prozesse für den Heilungsprozeß, die in den Keratinozyten am Wundrand ablaufen (Abb. 27d, 4), sind einerseits das Herunterregulieren von Adhäsionsmolekülen und die Expression neuer Integrine, um die Migration zu ermöglichen. Andererseits müssen an der Wundheilung beteiligte Keratinozyten (Abb. 27d, 5) einen proliferativen Schub durchlaufen, um den 'Zellpool' für die Reepithelialisierung zu liefern. Der Wundpfropf wird durch einwandernde Keratinozyten verdrängt und das Epithel ist somit wieder regeneriert.

Das eigentliche Wundheilungsexperiment wurde wie folgt durchgeführt: Wildtyp und PKC- δ defiziente Mäuse wurden im Alter von 2-3 Monaten nach Betäubung auf dem Rücken rasiert und anschließend auf Höhe der dorsalen Mittellinie zwei kreisförmige Wunden gesetzt. Die Tierhaltung erfolgte in Einzelkäfigen und der Nullpunkt der Wundheilung ergab einen durchschnittlichen Wunddurchmesser von 8 mm. Die Präparation der Wunden erfolgte zu den Zeitpunkten 3, 5 und 7 Tage post Wundsetzung (dpw). Die Wunden wurden großflächig, mit

dem darunterliegenden Gewebe ausgeschnitten, um diese nicht zu beschädigen. Das Präparat wurde jeweils auf einen Nylonfilter plaziert und in 4% Paraformaldehydlösung fixiert, um eine morphologische Analyse und *in situ*-Hybridisierung durchzuführen. Das Wundheilungsexperiment erfolgte unter Anleitung von Dr. B. Eckes und Dr. H. Smola (Hautklinik der Universitätsklinik zu Köln, Abt. Prof. Krieg) und wurde mit insgesamt 11 Tieren durchgeführt. Abbildung 27 zeigt einen Querschnitt einer Wunde nach 5 dpw für Wildtyp (Abb. 27a+c) und für PKC- δ Knock out (Abb. 27b+d). Die epidermale Schicht war im Wildtyp nach 5 dpw vollständig rekonstituiert (Abb. 27c, 3). Im PKC- δ Knock out ließ sich eine Verzögerung in der Reepithelialisierung erkennen (Abb. 27b+d, 4) und eine durchgehende epitheliale Schicht wurde erst ab 7 dpw detektiert (Daten nicht gezeigt). Durch eine PKC- δ *in-situ*-Hybridisierung auf Wundsnitten konnte gezeigt werden, daß der

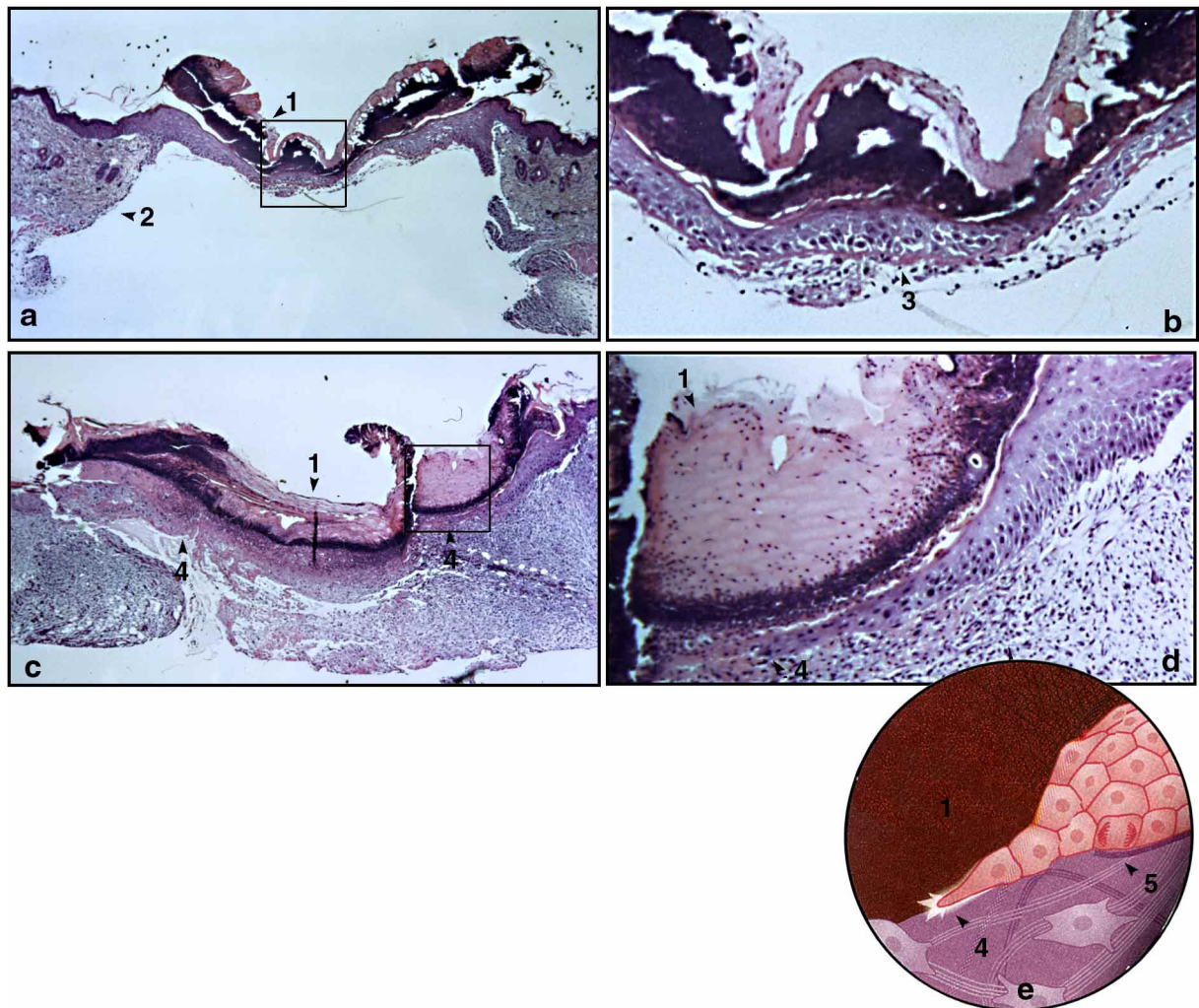


Abb. 27: *In vivo*-Wundheilung von Wildtyp und PKC- δ defizienten Mäusen: HE-Färbung von Paraffinschnitten nach 5 Tagen. **a:** + **b:** Wildtyp; **c:** + **d:** PKC- δ Mutante; **e:** schematische Darstellung der Reepithelialisierung; **a** + **b:** 5 fache, **d** + **d:** 20 fache Vergrößerung; 1: Wundpropp; 2: Dermis; 3: epidermaler Wundverschluß (Reepithelialisierung); 4: migrierende Keratinozyten; 5: proliferierende Keratinozyten.

Unterschied in der Wundheilung zwischen Wildtyp und Knock out mit einer PKC- δ Expression während der Reepithelialisierung korreliert werden kann (Abb. 28). PKC- δ konnte sowohl im frühen Stadium der Wundheilung (3 dpw; Abb. 28 a) als auch in späteren Stadien der Wundheilung (5 dpw; Abb. 28b) in Keratinozyten detektiert werden. Eine PKC- δ Expression ließ sich in der unverletzten Epidermis (Abb. 28, 5) sowie in den Keratinozyten des gesamten Bereichs der Reepithelialisierung (Abb. 28, 3 + 4) nachweisen. PKC- δ wurde außerdem während der Regeneration des dermalen Gewebes exprimiert (Abb. 28, 2), was allerdings hier nicht weiter verfolgt wurde. Abbildung 28c zeigt eine *in situ*-Hybridisierung auf

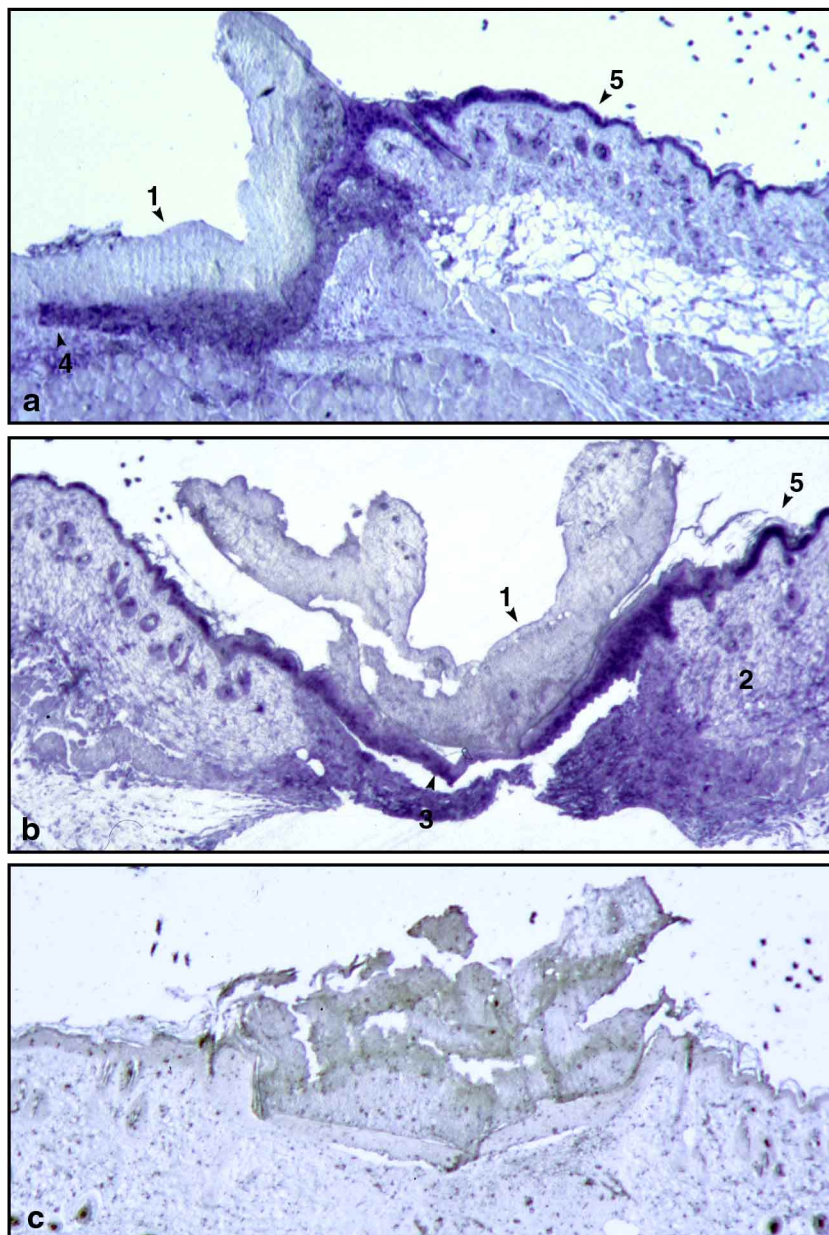


Abb. 28: PKC- δ *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten von Wildtyp-Wunden: **a:** 3dpw; **b:** 5dpw; **c:** Negativkontrolle: PKC- δ *in situ* auf PKC- δ mutanter Wunde (5 dpw). Vergrößerung jeweils 10fach; 1: Wundpfropf; 2: Dermis; 3: epidermaler Wundverschluss (Reepithelialisierung); 4: migrierende Keratinozyten; 5: unverletzte Epidermis.

PKC- δ mutantern Gewebe als Kontrolle und belegt somit die Spezifität der PKC- δ Probe.

Um auf molekularer Ebene einen Effekt der PKC- δ Defizienz zu detektieren, wurden Kryostat-Schnitte der Epidermis beider Genotypen verwendet. In Abbildung 29-31 ist eine immunhistochemische Analyse von Wildtyp und PKC- δ defizienten Hautschnitten gezeigt, die die Expression von Stratifizierungsmarkern, Zell-Matrix- sowie Zell-Zell-

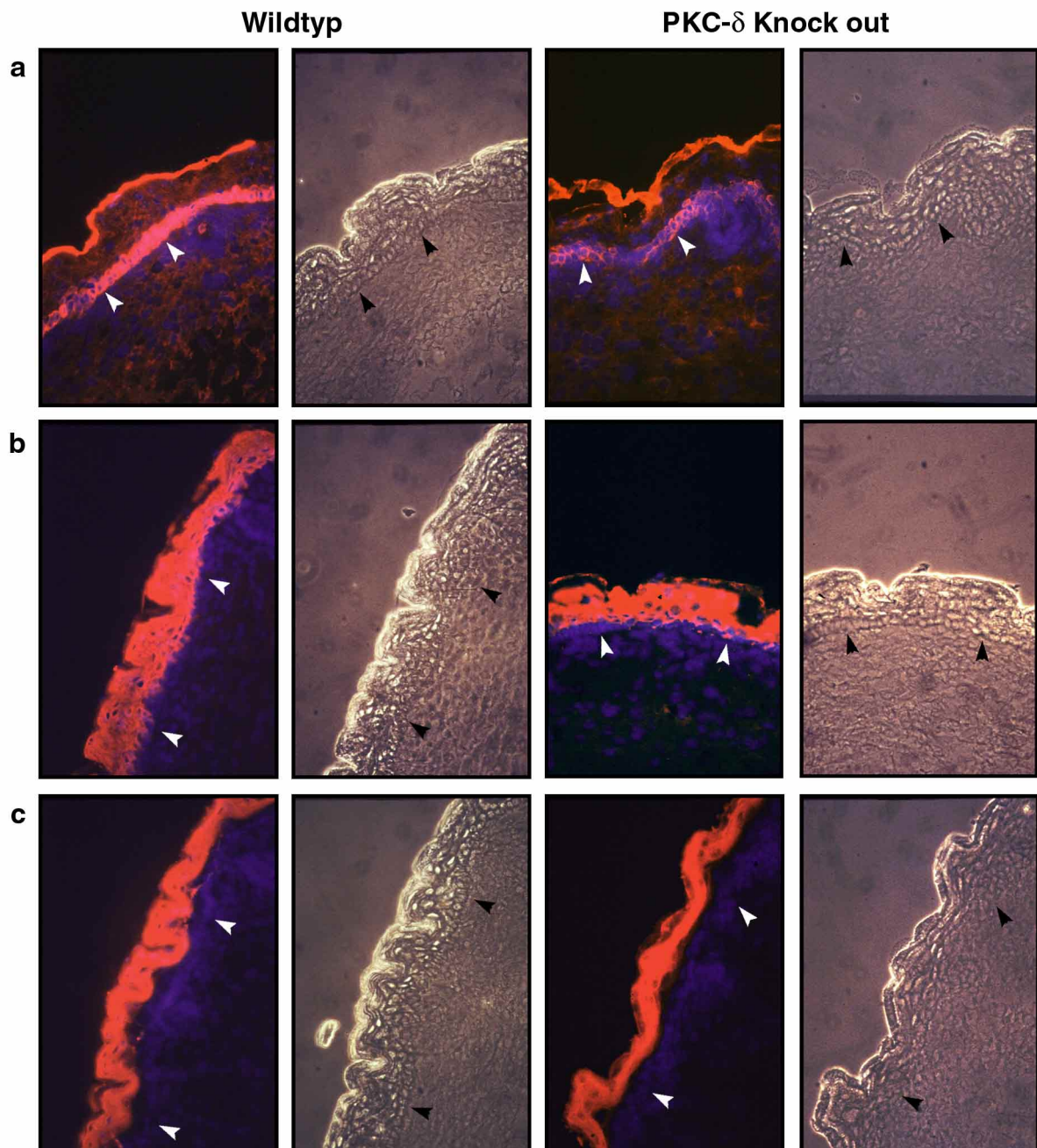


Abb. 29: Immunohistochemie auf Kryostatschnitten von Wildtyp und PKC- δ defizienter Epidermis: **a:** Keratin 5 & 14; **b:** Keratin 1 & 10; **c:** Lorikrin. Die linken Spalten zeigen den Wildtyp und die rechten die PKC- δ Mutante jeweils als Immunohistochemie und zur Übersicht eine Phasenkontrastaufnahme. Die Pfeile deuten zur besseren Orientierung immer auf das Stratum germinativum hin. Die Detektion erfolgte mit einem anti-Isotyp-Cy3 Antikörper und Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt.

Adhäsionsmolekülen und Zytoskelettproteinen analysiert.

Keratine bilden ein statisches Zytoskelett in Keratinozyten und werden entsprechend dem Differenzierungsstatus einer Zelle spezifisch exprimiert. Keratin 5 und 14 wurden als Marker für das Stratum germinativum als Vergleich zwischen Wildtyp und PKC- δ Mutante verwendet (Abb. 29a). Für die weiter differenzierten Epidermisschichten wurden Keratin 1 und 10 als früher Marker für die suprabasalen Schichten wie das Stratum spinosum (Abb.

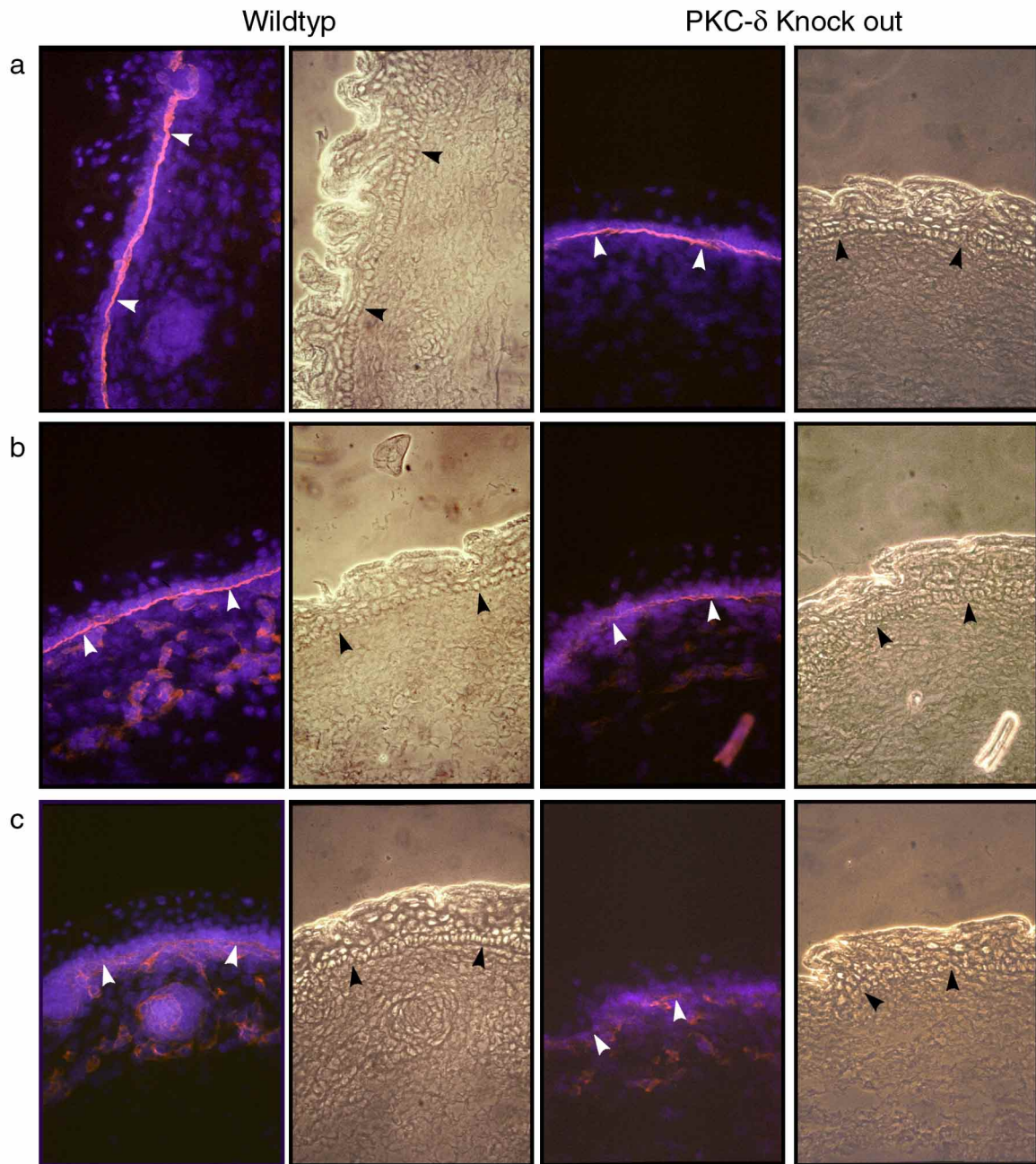


Abb. 30: Immunhistochemie auf Kryostatenschnitten von Wildtyp und PKC- δ defizienter Epidermis: **a:** Integrin $\beta 4$; **b:** Integrin $\alpha 6$; **c:** Integrin $\beta 1$; Die linken Spalten zeigen den Wildtyp und die rechten die PKC- δ Mutante jeweils als Immunhistochemie und zur Übersicht eine Phasenkontrastaufnahme. Die Pfeile deuten zur besseren Orientierung immer auf das Stratum germinativum hin. Die Detektion erfolgte mit einem anti-Isotyp-Cy3 Antikörper und Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt.

29b) und Lorikrin als ein später Marker für das Stratum granulosum (Abb. 29c) benutzt. In der Analyse der Stratifizierungsmarker der Epidermis läßt sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und PKC- δ Mutante detektieren (Abb. 29).

Die Integrinrezeptoren sind die wichtigsten Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen der Epidermis. Sie bilden funktionelle Heterodimer bestehend aus jeweils einer α - und einer β -Kette. Intrazellulär sind die Integrine mit dem Keratinzytoskelett, wie z.B. $\alpha 6/\beta 4$ -Integrin als

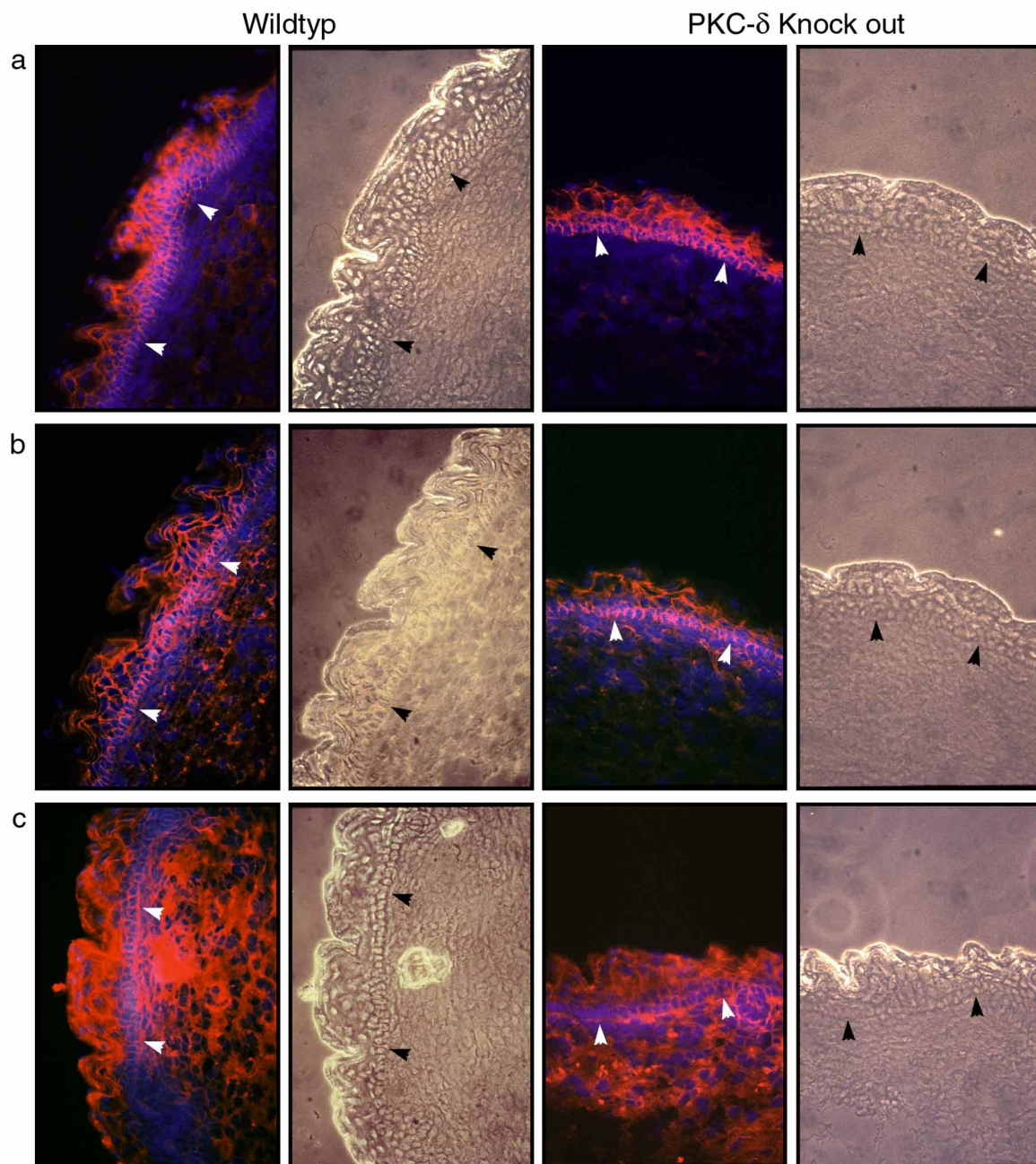


Abb. 31: Immunhistochemie auf Kryostatschnitten von Wildtyp und PKC- δ defizienter Epidermis: **a:** E-Cadherin; **b:** β -Catenin; **c:** Aktin; Die linken Spalten zeigen den Wildtyp und die rechten die PKC- δ Mutante jeweils als Immunhistochemie und zur Übersicht eine Phasenkontrastaufnahme. Die Pfeile deuten zur besseren Orientierung immer auf das Stratum germinativum hin. Die Detektion erfolgte mit einem anti-Isotyp-Cy3 Antikörper und Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Bestandteil der Hemidesmosomen, verknüpft oder, wie z.B. $\alpha 2/\beta 1$ -Integrin, mit dem Aktinzytoskelett und haben damit einen entscheidenden Einfluß auf die Migration. Die Integrinrezeptoren der Epidermis besitzen fast ausschließlich eine $\beta 1$ - oder eine $\beta 4$ -Kette. In Abbildung 30 ist ein Vergleich der Expression von $\beta 1$ - (Abb. 30c), $\beta 4$ - (Abb. 30a) und $\alpha 6$ -Integrin (Abb. 30b) zwischen Wildtyp und PKC- δ Knock out gezeigt. Die Expression von $\alpha 6$ - und $\beta 4$ -Integrin beschränkte sich im Wildtyp und der PKC- δ Mutante auf die basale Membran der Keratinozyten des Stratum germinativum, während $\beta 1$ -Integrin auch in Bereichen des Zell-Zell-Kontakts in der Dermis zu finden war (Abb. 30).

Die Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin und β -Catenin sind als Bestandteile der *Zonula adhaerens* intrazellulär auch mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Die Analyse der *Zonula adhaerens* und des Aktinzytoskelett wird in Abbildung 31 dargestellt. E-Cadherin (Abb. 31a) und β -Catenin (Abb. 31b) zeigten eine Expression in Bereichen des Zell-Zell-Kontakts in der Epidermis. Eine Analyse des Aktinzytoskeletts zeigte eine ubiquitäre Expression (Abb. 31c). In der Analyse der Integrine als auch der *Zonula adhaerens* zeigt sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und PKC- δ Mutante.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß PKC- δ in der gesamten Epidermis exprimiert wird (Abb. 26) und im Wundheilungsexperiment eine Verzögerung der Reepithelialisierung in der PKC- δ Mutante nachgewiesen werden konnte (Abb. 27). Nach morphologischen und immunhistochemischen Kriterien ließ sich jedoch kein Unterschied in der Expression von Stratifizierungsmarkern sowie verschiedener funktionell bedeutender Proteine in der Epidermis (Abb. 29-31) zwischen Wildtyp und PKC- δ Mutante nachweisen.

4.3.3.2 Keratinozyten

In vivo-Experimente wie die Wundheilung zeigen eine große Varianz in ihren Ergebnissen und verlangen für eine statistische Aussage eine große Anzahl an Tieren. Insbesondere für die molekulare Untersuchung ist es somit von Vorteil eine Analyse im Zellkultursystem durchzuführen.

Ziel ist die funktionelle Analyse der verzögerten Reepithelialisierung in der Epidermis der PKC- δ Mutante während der Wundheilung. Dazu wurde ein Zellkultursystem von primären Keratinozyten verwendet. Im primären Zellkultursystem können die Basisprozesse der Reepithelialisierung wie Adhäsion, Proliferation und Migration von Keratinozyten analysiert werden (Bjare, 1992). Die Primärkultur von Keratinozyten unterscheidet zwischen

Proliferation und Differenzierung (Hennings et al., 1980) und garantiert gleichzeitig die Konstanz von *in vivo*-Bedingungen wie beispielsweise Morphologie und physiologische Marker (Judd & Battista, 1997). Unter Proliferationsbedingungen wurde die Präsenz der *in vivo*-Marker Keratin 5 und 14 als auch die Abwesenheit der frühen Differenzierungsmarker 1 und 10 in der Primärkultur der Keratinozyten bestätigt (Daten nicht gezeigt).

4.3.3.2.1 Adhäsion von Keratinozyten

Das Ziel ist die Analyse der Adhäsion von primären Keratinozyten als ein wichtiger Prozeß in der Reepithelialisierung. Die *in vitro*-Adhäsion von Keratinozyten wird unterteilt in das Anheften ('attachment') von Zellen an Matrixproteine und in der Folge das Ausbreiten sowie der Aufbau des Aktinzytoskeletts ('spreading'). Adhäsive Moleküle der Keratinozyten sind die Integrinrezeptoren, die z.B. Hemidesmosomen und Adhäsionspunkte bilden. Die wichtigsten Moleküle unter ihnen sind $\alpha 2/\beta 1$ -, $\alpha 3/\beta 1$ - und $\alpha 6/\beta 4$ -Integrine, die überlappend an Matrixproteine binden und jeweils nur mit spezifischen Liganden interagieren können (Watt & Hertle, 1994).

Durch die Kultivierung von primären Keratinozyten zeigte sich deutlich, daß Zellen von PKC- δ defizienten Mäusen nach dem Ausplattieren schlechter adhäreren als Wildtypzellen. Frisch isolierte Keratinozyten wurden auf 35mm Zellkulturschalen ausplattiert. In Abhängigkeit von

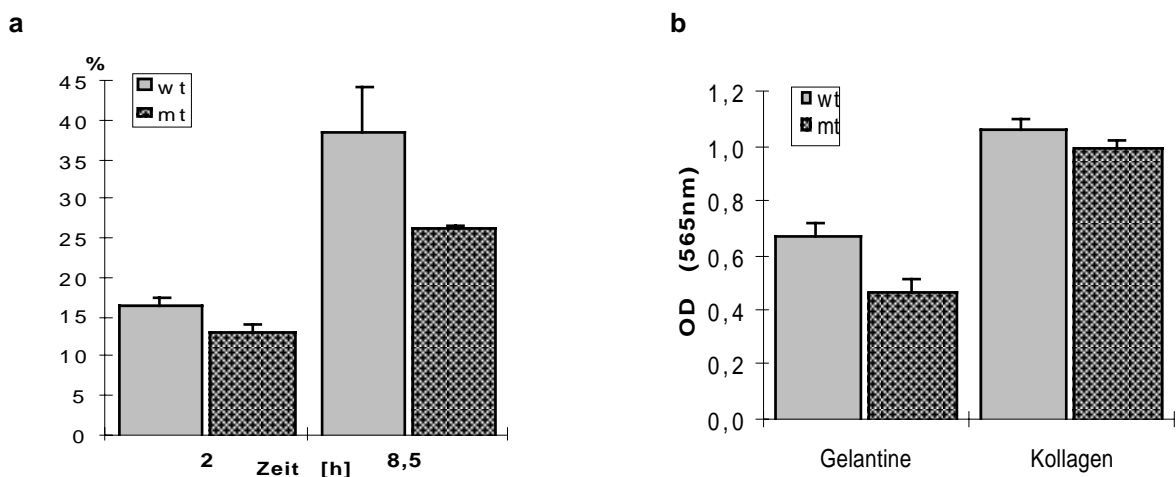


Abb. 32: Adhäsionsexperimente mit Wildtyp und PKC- δ mutanten Keratinozyten: **a:** Zeitabhängige Adhäsion auf Gelatine. 5×10^5 Zellen wurden auf 35mm Zellkulturschalen für 2 h und 8,5 h adhäreren lassen. Prozentzahlen ergaben sich als Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten, mit jeweils Dubletts und jeweils 4 maligem auszählen mit ihren Standardabweichungen. **b:** Substratabhängige Adhäsion. In 96 Loch Zellkulturplatten wurden je 1×10^5 Keratinozyten für 12 h auf Gelatine und Rattenkollagen ausplattiert. Adhärerte Zellen wurden mit 1% GDA fixiert, mit 0,1% Kristallviolett die Zellkerne gefärbt, anschließend mit 0,2% Triton X-100 lysiert und die OD bei 565 nm gemessen. OD-Werte ergaben sich als Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten und jeweils als Quartett gemessen mit der entsprechenden Standardabweichung. wt: Wildtyp; mt: PKC- δ Knock out.

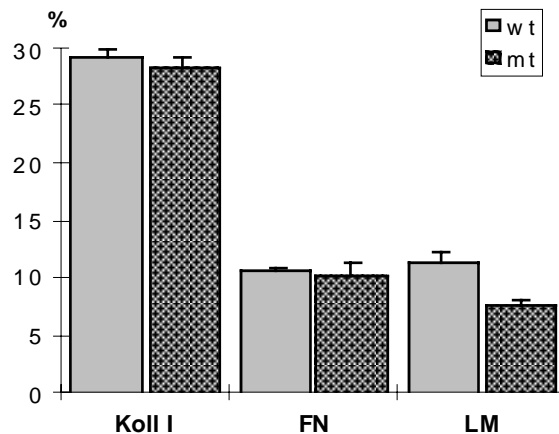


Abb. 33: Adhäsionsexperiment mit Wildtyp und PKC- δ defizienten Keratinozyten auf verschiedenen Substraten: In 35mm Zellkulturschalen mit den Substraten Kollagen I, Fibronectin und Laminin (Falcon) wurden 5×10^5 Keratinozyten für 8,5 h adhären lassen. Prozentzahlen ergaben sich als Mittelwert aus Dubletts und jeweils 4 maligem auszählen mit ihren Standardabweichungen. wt: Wildtyp; mt: PKC- δ Knock out.

der Zeit (hier nach 2 h und 8,5 h) wurde der Prozentsatz an adhären Zellen auf Gelatine durch Auszählen ermittelt (Abb. 32a). Als Kontrolle wurden die nicht adhären Keratinozyten kalkuliert. Nach 2 h zeigte sich eine Differenz in adhären Zellen zwischen Wildtyp und PKC- δ defizienten Zellen von 3%. In der Plateauphase der Keratinozytenadhäsion, nach 8,5 h, war dieser Unterschied auf 12% angestiegen (Abb. 32a). Aufgrund dieser Beobachtung und erster Untersuchungen wurden Adhäsionsexperimente in Abhängigkeit vom Substrat geplant und wie folgt durchgeführt (Abb. 32b und 33): Kristallviolett färbt ausschließlich den Zellkern an und ist somit in seiner Farbintensität proportional zur Zellzahl. Nach der Zelllyse wurde die Optische Dichte als Maß für die Anzahl an adhären Zellen nach 12 h verwendet (Abb. 32b). Die verminderte Adhäsion von PKC- δ mutanten Keratinozyten auf Gelatine wurde mit dieser Methode erneut bestätigt (Abb. 32b). Kollagen als Substrat zeigte im gleichen Experiment nur eine geringe Differenz in der Adhäsion von Wildtyp und PKC- δ defizienten Keratinozyten (Abb. 32b). In einem weiteren Experiment mit Kollagen I und Fibronectin als Substrate wurde kein Unterschied im Prozentsatz an adhären Wildtyp und PKC- δ defizienten Keratinozyten festgestellt (Abb. 33). Nur Laminin zeigte ebenfalls eine verminderte Adhäsion von 4% bei PKC- δ defizienten Zellen (Abb. 33).

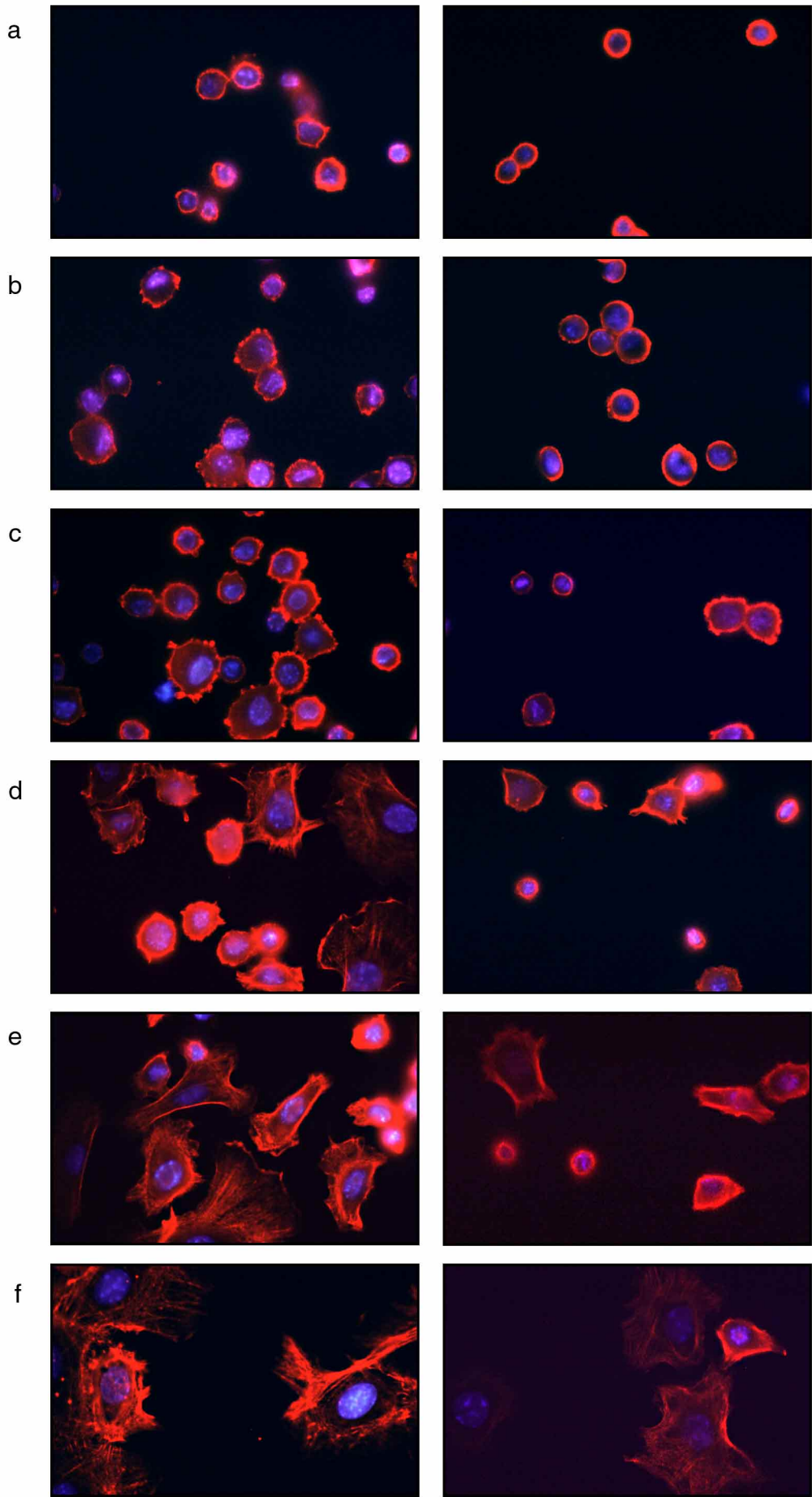
Die Adhäsion von Keratinozyten beinhaltet auch den Prozeß des 'spreading' (Ausbreiten) der Zellen, der sich an den 'attachment'-Prozeß anschließt und als PKC-abhängiger Prozeß in unterschiedlichen Zelltypen bekannt ist (Myat et al., 1997). Um das 'spreading'-Verhalten der PKC- δ mutanten Keratinozyten zu untersuchen, wurde diese in Abhängigkeit von der Zeit und im Hinblick auf ihr Aktinzytoskelett im Vergleich mit Wildtypzellen analysiert (Abb. 34).

Viele Adhäsionsmoleküle sind intrazellulär mit dem Aktinzytoskelett verknüpft. Nachdem die Keratinozyten über ihre Adhäsionsmoleküle sich an das Substrat angeheftet haben, beginnt der Neuaufbau des Aktinzytoskeletts und die Zellen nehmen ihre natürliche Morphologie an. Proliferierende Keratinozyten wurden trypsiniert und nach dem Ausplattieren für 2 h bei 4°C sich absetzen lassen, was zu einem Block des Adhäsionsvorgangs führt. Erst durch die Inkubation bei 37°C wurde das 'attachment' durch die Integrinrezeptoren an das Matrixsubstrat induziert und dadurch das 'spreading' der Keratinozyten mit der Reorganisation des Zytoskeletts initiiert. Die Reorganisation des Aktinzytoskeletts wurde durch Immunfluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit analysiert. Die basale Membran in Wildtypkeratinozyten bildete schon nach 10 min die ersten Ausläufer aus (Abb. 34a). Nach 30 min wurde dies bei ca. 90% der Zellen sichtbar (Abb. 34b-c). PKC- δ defiziente Keratinozyten hingegen waren nach 10 min noch vollkommen abgerundet und zeigten erst nach 30 min bei ca. 10-20% der Zellen die ersten Ausläufer (Abb. 34b-c).

Eine eindeutige Aktin-Organisation ließ sich nach 1,5 h bei ca. 30% Wildtypzellen bereits erkennen. Im Gegensatz dazu war diese Reorganisation des Aktinzytoskeletts bei PKC- δ defiziente Keratinozyten noch nicht zu erkennen (Abb. 34d). Zu späteren Zeitpunkten war die Organisation des Aktinzytoskeletts von PKC- δ mutanten Keratinozyten nach 8 h vergleichbar mit der nach 3 h der Wildtypzellen (Abb. 34e-f).

Zusammenfassend konnte eine verminderte Adhäsion von PKC- δ defizienten Keratinozyten in Abhängigkeit von der Zeit auf den Substraten Gelatine und Laminin gezeigt werden. Außerdem war die Reorganisation des Aktinzytoskeletts im dynamischen Prozeß der Adhäsion bei PKC- δ mutanten Keratinozyten deutlich langsamer als im Vergleich bei Wildtypzellen.

Abb. 34: Immunfluoreszenzfärbung von Aktin während der Adhäsion von Wildtyp und PKC- δ defizienten Keratinozyten: Zeitreihe von 10 min (**a**), 20 min (**b**), 30 min (**c**), 1,5 h (**d**), 3 h (**e**) und 8 h (**f**). Proliferierende Keratinozyten wurden bei 4°C ausplattiert und 2 h absetzen lassen. Zeitabhängige Inkubation wurde bei 37°C durchgeführt und anschließende Detektion mit anti-Aktin- und anti-Isotyp-Cy3 Antikörper. linke Spalte: Wildtyp Keratinozyten, rechte Spalte: PKC- δ mutante Zellen.



4.3.3.2.2 Proliferation von Keratinozyten

In diesem Abschnitt wurde die Proliferation von Keratinozyten als weiterer wichtiger Prozeß in der Reepithelialisierung untersucht. Die Proliferationsanalyse erfolgte nach der direkten Methode des Bromdesoxyuridin (BrdU)-Einbaus, die den Prozentsatz an Zellen in der S-Phase des Zellzyklus angibt (Dover and Patel, 1994). Wildtyp und PKC- δ defiziente Keratinozyten wurden bei einer Konfluenz von 50% bis 60% für 6 bis 12 h mit dem BrdU-Reagenz inkubiert.

Der unterschiedliche BrdU-Einbau in Wildtyp und PKC- δ defizienten Keratinozyten nach 10 h bei einer 60%igen Konfluenz der Zellen ist in Abbildung 35 deutlich zu erkennen. Die BrdU-positiven Zellkerne erscheinen in der Immunfluoreszenz grün als Overlay einer Phasenkontrastaufnahme von proliferierenden Keratinozyten (Abb. 35a). Die graphische Auswertung zeigte eine prozentuale Abnahme von 46% im Wildtyp auf ungefähr die Hälfte in der PKC- δ Mutanten (24%; Abb. 35b). Dieser prozentuale Unterschied in der Proliferationsrate von Wildtyp und PKC- δ Mutante ist das Ergebnis mehrerer unabhängiger

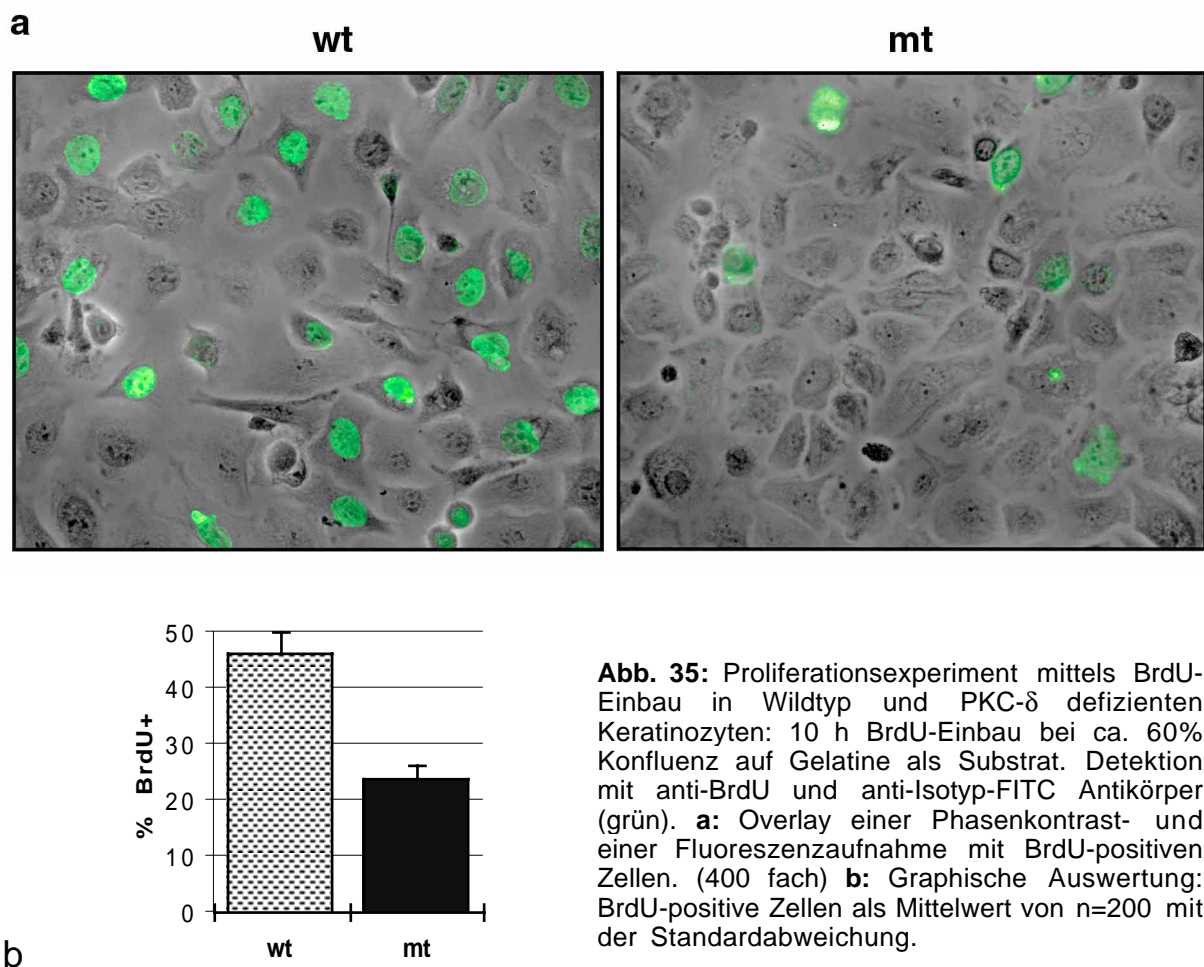
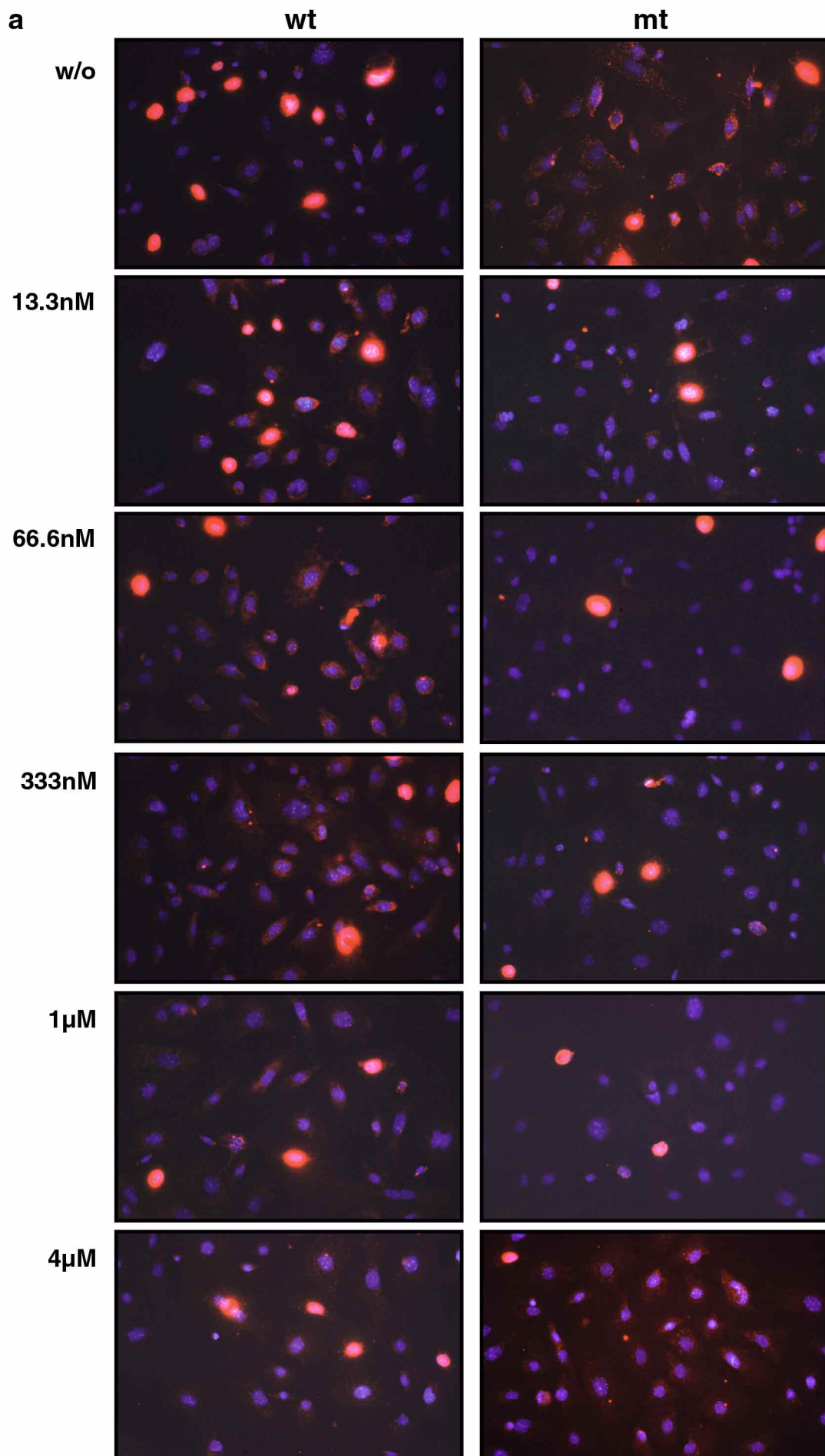


Abb. 35: Proliferationsexperiment mittels BrdU-Einbau in Wildtyp und PKC- δ defizienten Keratinozyten: 10 h BrdU-Einbau bei ca. 60% Konfluenz auf Gelatine als Substrat. Detektion mit anti-BrdU und anti-Isotyp-FITC Antikörper (grün). **a:** Overlay einer Phasenkontrast- und einer Fluoreszenzaufnahme mit BrdU-positiven Zellen. (400 fach) **b:** Graphische Auswertung: BrdU-positive Zellen als Mittelwert von n=200 mit der Standardabweichung.



b

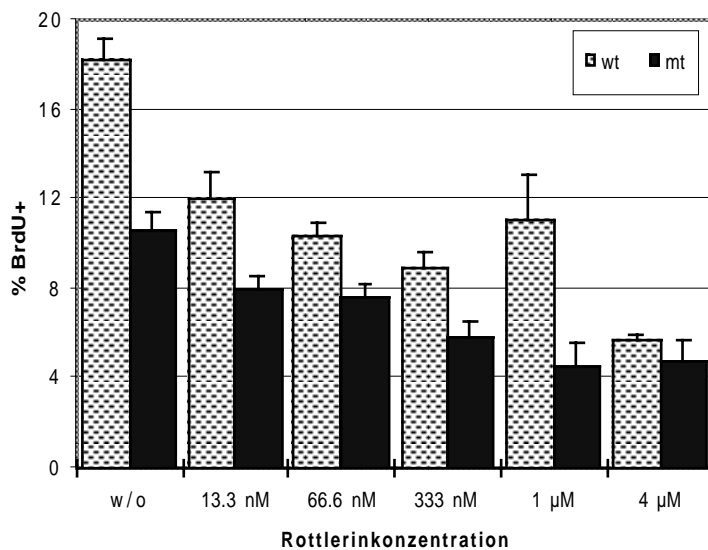
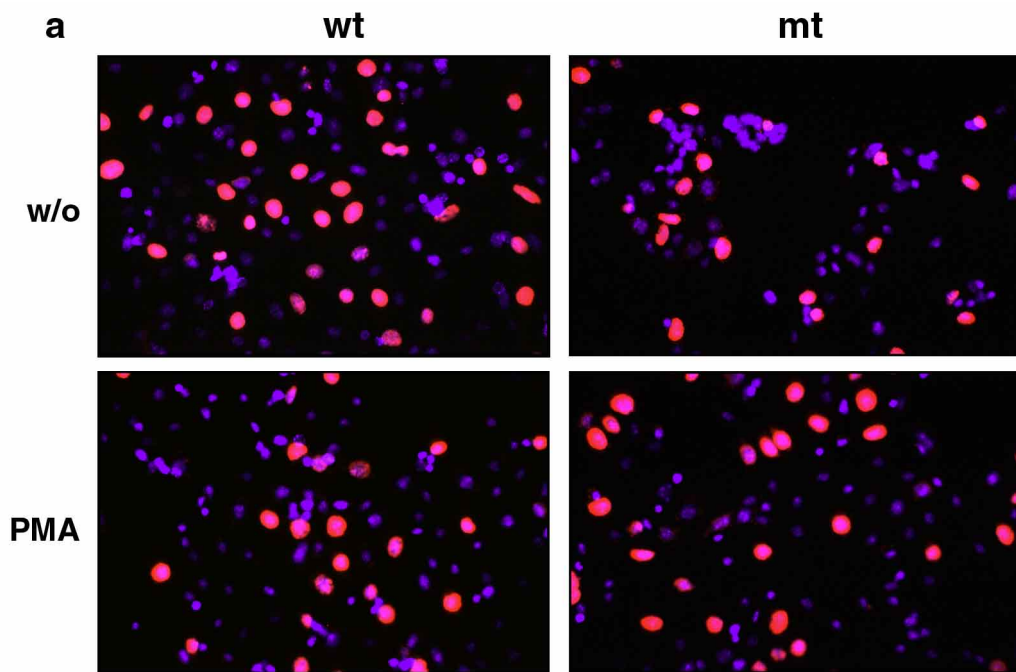


Abb. 36: Dosis-abhängige Inhibition des BrdU-Einbaus durch Rottlerin im Vergleich zwischen Wildtyp und PKC- δ defizienten Keratinozyten: 6 h BrdU-Einbau bei ca. 50% Konfluenz auf dem Substrat Kollagen. Detektion mit anti-BrdU und anti-Isotyp-Cy3 (rot). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). **a:** Overlay von Immunfluoreszenzen der BrdU-positiven Zellen (rot) und der Gegenfärbung (blau). (400 fach) **b:** Graphische Auswertung: BrdU-positiv-positive Zellen als Mittelwert von $n=250$ mit entsprechender Standardabweichung.

Experimente, während der Maximalwert in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit BrdU steht. Um diese Differenz in der Proliferation eindeutig auf die PKC- δ Defizienz zurückzuführen, wurden Wildtyp-Keratinozyten mit dem PKC- δ spezifischen Inhibitor Rottlerin inkubiert, mit dem Ziel eine vergleichbare Inhibition der Proliferation zu erreichen (Gschwendt et al., 1994).

In einem Dosis-abhängigen Inhibitionsexperiment durch Rottlerin von 13 nM bis 4 μ M wurde gezeigt, daß die Proliferation in Wildtyp-Keratinozyten dosisabhängig inhibiert wird (Abb. 36a+b). Die Proliferationsrate der PKC- δ Mutante wurde bei einer Rottlerinkonzentration von 67 nM im Wildtyp erreicht (Abb. 36b). Gleichzeitig zeigte Rottlerin eine Dosis-abhängige Inhibition der Proliferation von PKC- δ defizienten Keratinozyten, die schon bei einer geringen Konzentration von 13 nM zu erkennen war (Abb. 36a+b). Dieses Resultat belegt, daß Rottlerin nicht nur PKC- δ inhibiert.

In einem weiteren Experiment konnten PKC- δ -unabhängige Signalwege der Proliferationskontrolle analysiert werden, die entweder zusätzliche PKC-Isoformen betreffen oder PKC-unabhängig sind. Der Tumorpromotor der Phorbolsterklasse TPA ist in der Lage alle *klassischen* und *neuen* PKC-Isoformen zu aktivieren. Im Gegensatz zu vielen anderen Zelltypen bewirkt TPA in Keratinozyten der Maus eine Inhibition der Proliferation (Ishino et al., 1998). Eine TPA-Stimulation (20 min, 1 μ M) von Wildtyp-Keratinozyten verminderte die Proliferationsrate um mehr als die Hälfte von 46% auf 21% (Abb. 37). Dies ist vergleichbar mit dem Wert an BrdU-positiven Zellen in der PKC- δ Mutante ohne TPA (23%; Abb. 37b).



b

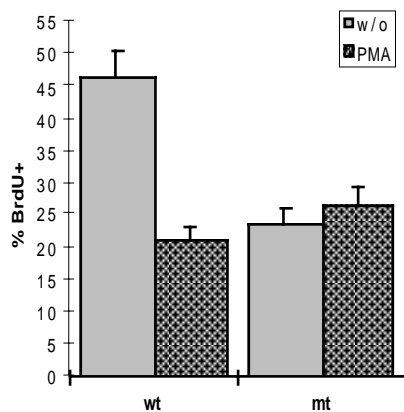


Abb. 37: Proliferationsexperiment nach TPA-Stimulation von Wildtyp und PKC- δ defizienten Keratinozyten: 12 h BrdU-Einbau bei ca. 50% Konfluenz auf dem Substrat Kollagen. Detektion mit anti-BrdU- und anti-Isotyp-Cy3-Antikörper (rot). Gegenfärbung mit DAPI (blau). **a:** Overlay von Immunfluoreszenzen der BrdU-positiven Zellen (rot) und der Gegenfärbung (blau). (400 fach) **b:** Graphische Auswertung: BrdU-positive Zellen als Mittelwert von $n=0$ 400 mit entsprechender Standardabweichung.

Zusätzlich stellte sich heraus, daß eine TPA-Stimulation der PKC- δ mutanten Keratinozyten mit 26% BrdU-positiven Zellen keinen signifikanten Einfluß auf die Proliferationsrate hat (Abb. 37b).

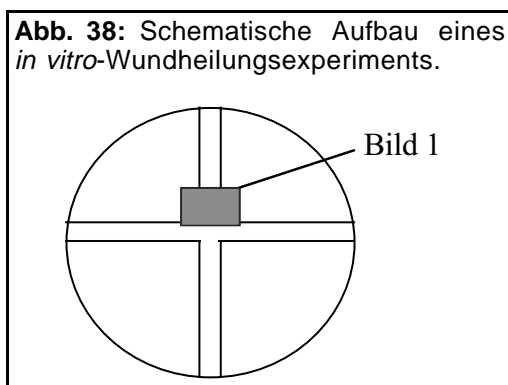
Es konnte gezeigt werden, daß PKC- δ defiziente Keratinozyten eine ca. um die Hälfte verminderte Proliferationsrate im Vergleich zu Wildtyp-Keratinozyten aufweisen. Durch die spezifische Inhibition von Wildtyp-Keratinozyten mit dem PKC- δ Inhibitor Rottlerin wurde ein vergleichbarer Effekt erreicht. Eine Stimulation von PKC durch TPA bewirkt eine reduzierte Proliferationsrate in Wildtyp Keratinozyten, die in etwa der Proliferationsrate der PKC- δ Mutante entspricht.

Weiterführende Untersuchungen, die in Frage kommenden Signalwege in der Zelle untersuchen, sind Gegenstand aktueller Forschung.

4.3.3.2.3 Migration der Keratinozyten

In diesem Abschnitt wird die Analyse zur Migration in Keratinozyten, ein wesentlicher Prozeß der Reepithelialisierung, beschrieben.

Der Prozeß der Migration ist ein vielschichtiger Vorgang. Er umfaßt einerseits den Abbau von Zell-Zell-Kontakten wie *Zonula adharens* als auch den Aufbau spezifischer Integrinrezeptoren wie $\alpha 5/\beta 1$ -Integrin an der basalen Membran (Guo et al., 1990; O'Toole et al., 1997). Dies sind Grundvoraussetzungen dafür, daß Keratinozyten migrieren können. Das Aktinzytoskelett, welches intrazellulär mit den *Zonula adharens* sowie den Integrinen verknüpft ist, beeinflußt nicht nur die Morphologie einer Zelle, sondern ist auch der Motor der Migration (Morley & Lane, 1994).



Frisch isolierte Mauskeratinozyten wurden für 4-5 Tage auf dem für die Migration vorgesehenen Substrat kultiviert. Dadurch werden für die Migration wichtige Integrine exprimiert (Guo et al., 1990). Im konfluenten Stadium wurde ein definierter kreuzförmiger Kratzer mit einer blauen Pipettenspitze in den Keratinozytenmonolayer

gesetzt (Abb. 38). Die abgelösten Zellen wurden durch 2maliges Waschen mit PBS entfernt. Dem Kulturmedium wurde 10 Volumen-% Substrat zugegeben, damit sich im Bereich des Kratzers die Matrix rekonstituieren kann. Die Quantifizierung der Migration wurde als Abnahme der Spaltbreite (Kratzer) in Prozent anhand von je vier verschiedenen

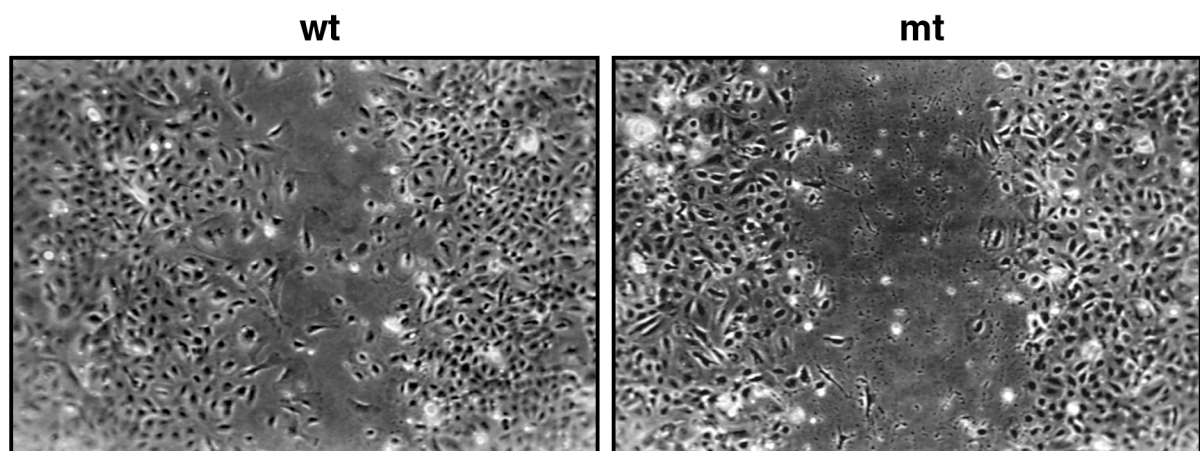


Abb. 39: *In vitro*-Wundheilungsexperiment nach 45 h auf Gelatine als Phasenkontrastaufnahme von Wildtyp (wt) und PKC- δ defizienten (mt) Keratinozyten. (100fach)

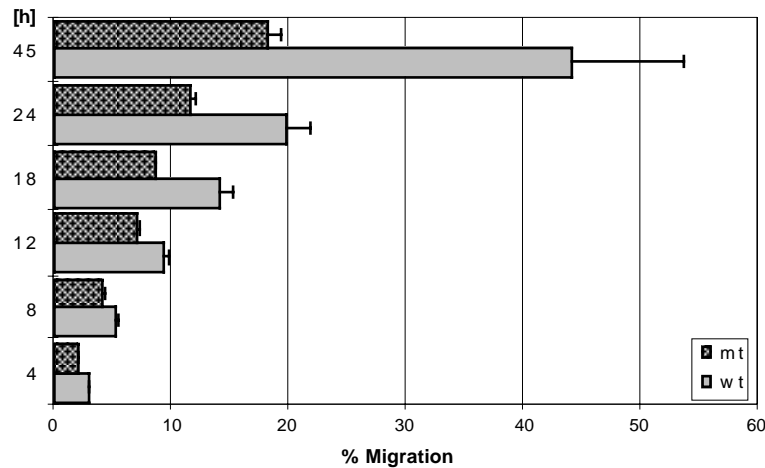


Abb. 40: Zeit-abhängige Migration von Wildtyp (wt) und PKC- δ mutanten (mt) Keratinozyten auf Gelatine in 2 unabhängigen Experimenten. Ergebnisse stammen aus 4 Phasenkontrastaufnahmen mit 10 Einzelmessungen und anschließender Kalkulation der prozentualen Migration mit entsprechender Standardabweichung. Die Durchführung erfolgte in 35mm Kulturschalen.

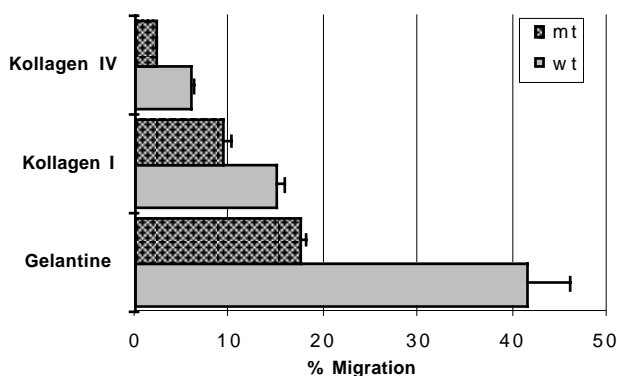
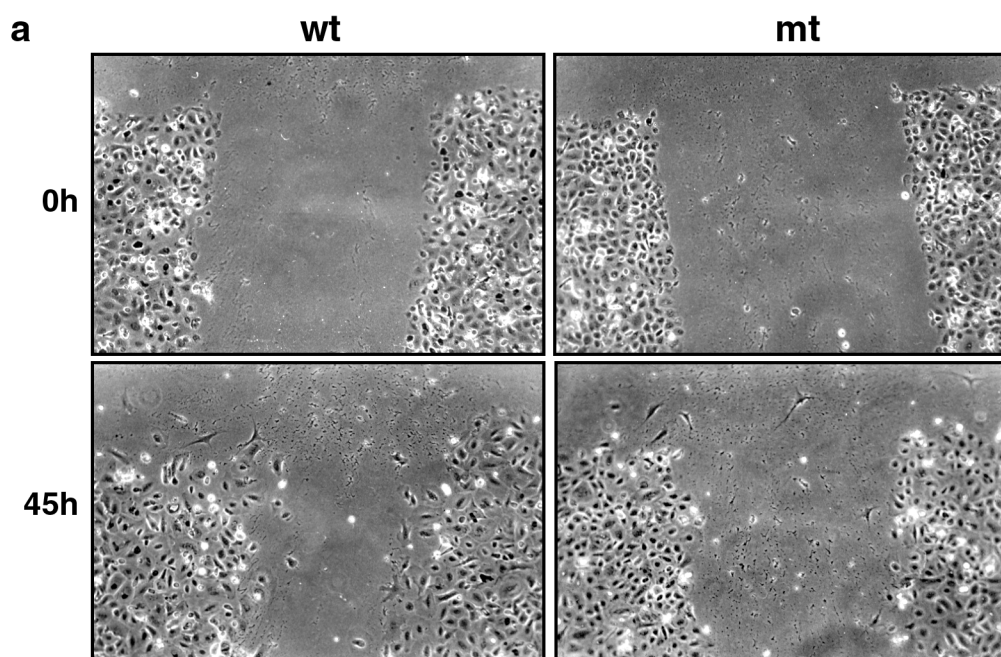
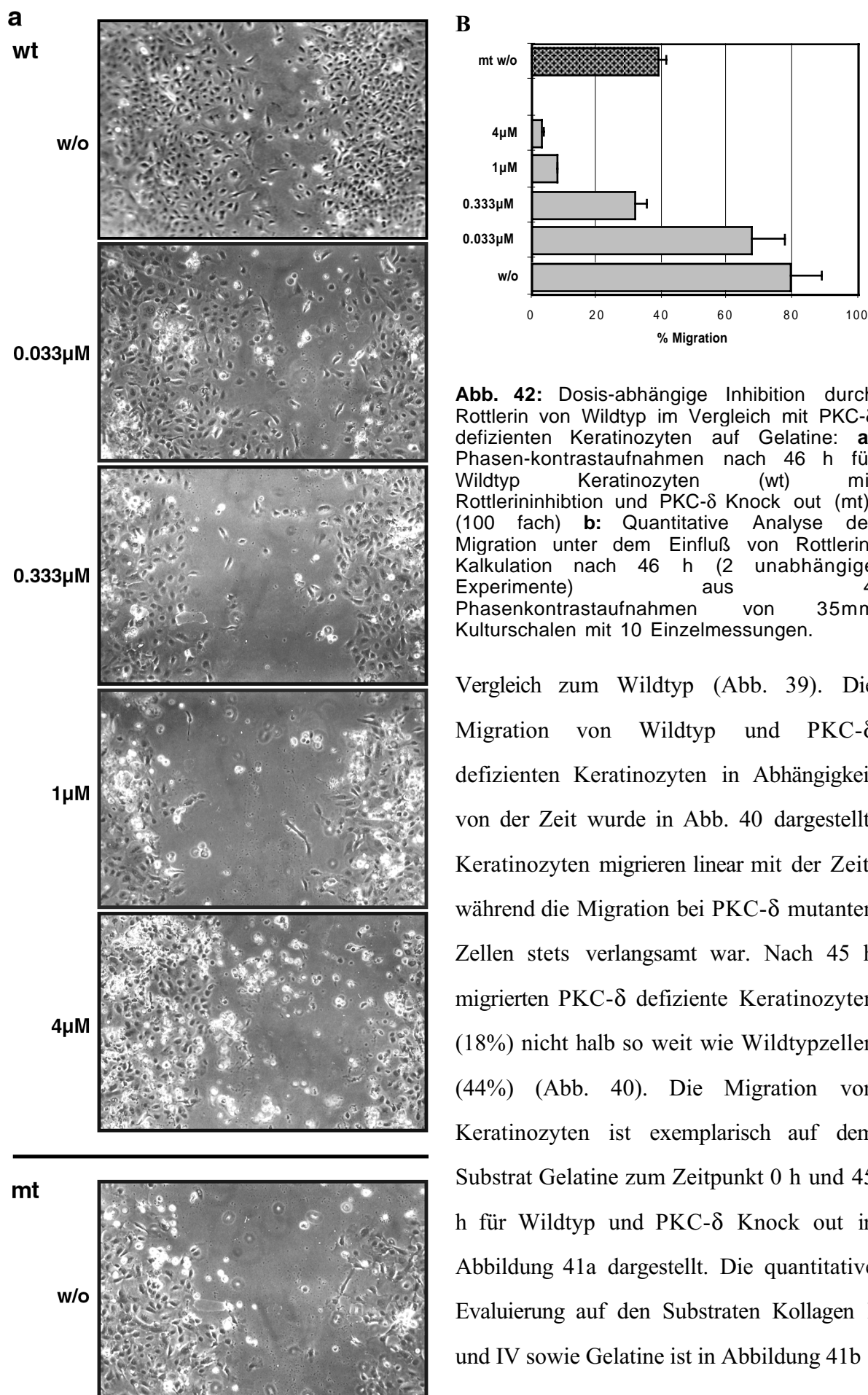


Abb. 41: Quantitative Evaluierung der Migration von wildtyp und PKC- δ defizienten Keratinozyten: **a:** Phasenkontrastaufnahmen nach 0 h und 45 h für Wildtyp (wt) und PKC- δ Knock out (mt). (100 fach) **b:** Migration als Vergleich auf den verschiedenen Substraten Kollagen I und IV sowie Gelatine. Kalkulation der Migration nach 42 h (2 unabhängige Experimente) aus 4 Phasenkontrastaufnahmen von 35mm Kulturschalen mit 10 Einzelmessungen.

Phasenkontrastaufnahmen kalkuliert (Abb. 38). Abbildung 40 zeigt das Resultat eines Migrationsexperiments nach 46 h auf Gelatine im Vergleich von Wildtyp und PKC- δ Mutante. PKC- δ defiziente Keratinozyten zeigten eine deutlich verringerte Migrationsrate im



gezeigt. Eine verzögerte Migration von PKC- δ defizienten Keratinozyten wurde für alle drei Substrate gezeigt. Die Migration von PKC- δ defizienten Keratinozyten ist auf Gelatine weniger als halb so schnell, auf Kollagen I beträgt sie ca. 2/3 und auf Kollagen IV ergibt die Analyse noch 1/3 im Vergleich zu Wildtypzellen (Abb. 41b). Weiterhin migrierten Keratinozyten, unabhängig vom Genotyp, auf Gelatine am schnellsten, während die Migrationsgeschwindigkeit von Kollagen IV zu I immer mehr abnahm (Abb. 41b).

Zum Nachweis, daß es sich hier um eine PKC- δ spezifische Beobachtung handelt, ist in Abbildung 42 die Inhibition der Migration durch den PKC- δ spezifischen Inhibitor Rottlerin in Wildtyp-Keratinozyten gezeigt. Die PKC- δ Spezifität konnte aufgrund der dosisabhängige Inhibition durch Rottlerin in einem Konzentrationsbereich von 33 nM - 4 μ M in Wildtyp-Keratinozyten gezeigt werden. Dies ist in Abbildung 42a als Phasenkontrastaufnahmen dargestellt und die entsprechend graphische Auswertung liefert Abbildung 42b. Wildtyp-Keratinozyten zeigen nach Inhibition mit etwa 0,1 μ M Rottlerin ein vergleichbares Migrationsverhalten wie PKC- δ mutante Keratinozyten ohne Inhibitor (Abb. 42b). Weiterhin bleibt zu bemerken, daß Rottlerin auch hier zur Inhibition der Migration in PKC- δ defizienten Keratinozyten führte (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist hier zum Vergleich nur die Migration von PKC- δ defizienten Keratinozyten ohne Einwirkung durch Rottlerin aufgeführt, die nach 46 h ungefähr die Hälfte der Wildtypzellen beträgt (Abb. 42).

Die Migration von Keratinozyten wird durch die Expression ihrer Adhäsionskomplexe als auch durch die Reorganisation des Aktinzytoskelettes beeinflusst. Im folgenden wurde mittels Immunfluoreszenz die Expression von Aktin-assoziierten Adhäsionskomplexen und des Aktinzytoskelettes analysiert. Die *Zonula adhaerens* ist in die Zell-Zell-Adhäsion involviert und für diesen Komplex wichtige Moleküle sind z.B. E-Cadherin und β -Catenin. Die zelluläre Verteilung von E-Cadherin und β -Catenin bei konfluenten Keratinozyten als Vergleich zwischen Wildtyp und PKC- δ Mutante ist in Abbildung 43 dargestellt. Wildtyp-Keratinozyten zeigten das erwartete Muster einer homogenen Verteilung von E-Cadherin und β -Catenin über die laterale Membran, wenn die Zellen untereinander in Kontakt stehen. Die E-Cadherin- und β -Catenin-Immunfluoreszenz in PKC- δ defizienten Zellen zeigte bei gleicher Konfluenz eine inhomogene und desorganisierte Verteilung (Abb. 43 a+b). Wie schon erwähnt bildet die β 1-Integrinkette während der Migration von Keratinozyten neue Integrinkomplexe, die den Migrationsprozeß entscheidend beeinflussen. Unter den Zell-Matrix-Komplexen

wurde die $\beta 1$ -Integrinkette als vorherrschendes Integrin in Keratinozyten und Vinkulin als intrazelluläre Komponente der Adhäsionspunkte analysiert (Abb. 44). Die Immunfluoreszenz zeigte die erwartete punktförmige Verteilung von $\beta 1$ -Integrin über die gesamte basale Membran, die sich mit dem Aktivitätszustand des Zelle ändert (Abb. 44a). Es wurde kein

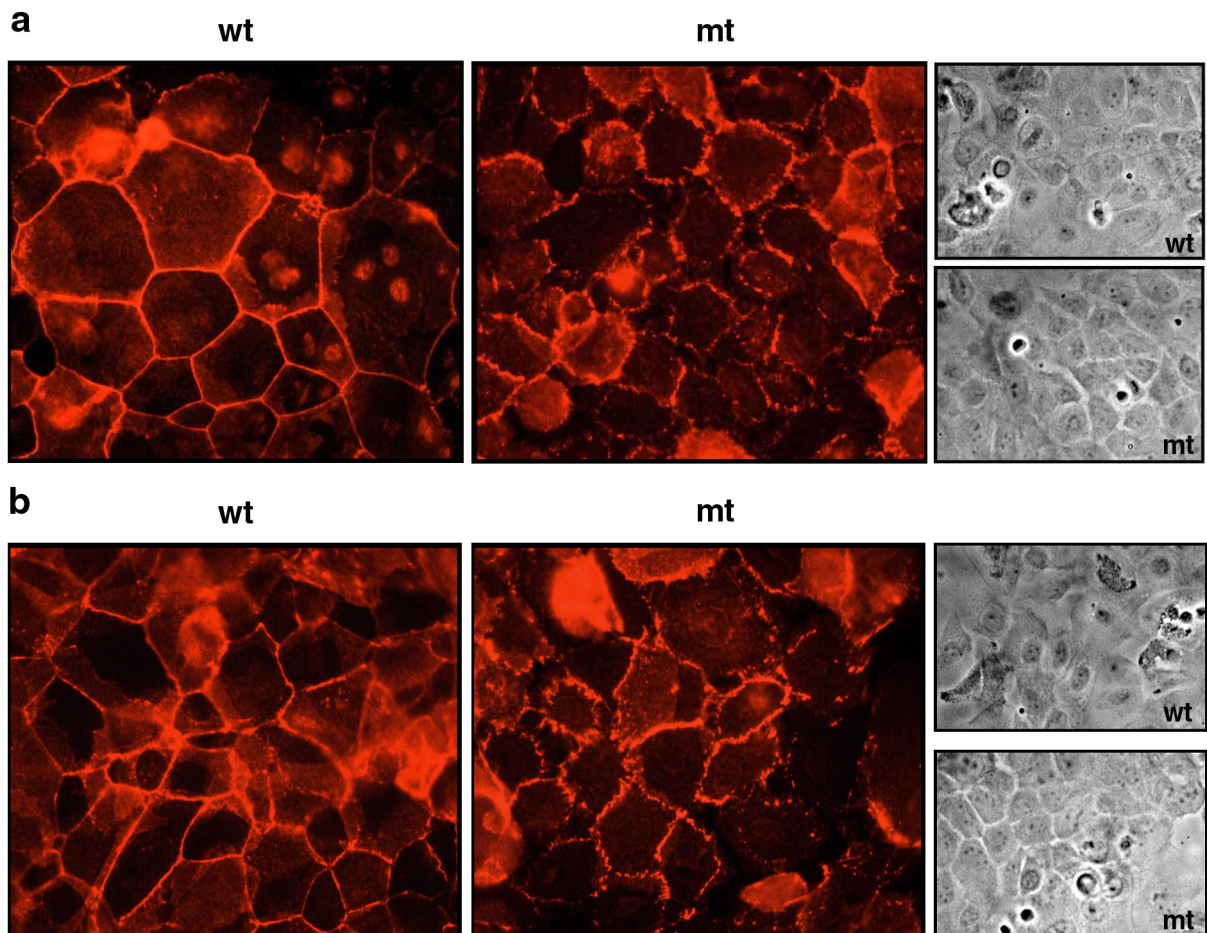


Abb. 43: Immunfluoreszenzfärbung von konfluenten Wildtyp und PKC- δ defizienten Keratinozyten mit jeweiliger Phasenkontrastaufnahme als Kontrolle: **a:** E-Cadherin; **b:** β -Catenin. Detektion mit anti-Isotyp-Cy3-Antikörper (rot); (630 fach); wt: Wildtyp; mt: PKC- δ Knock out.

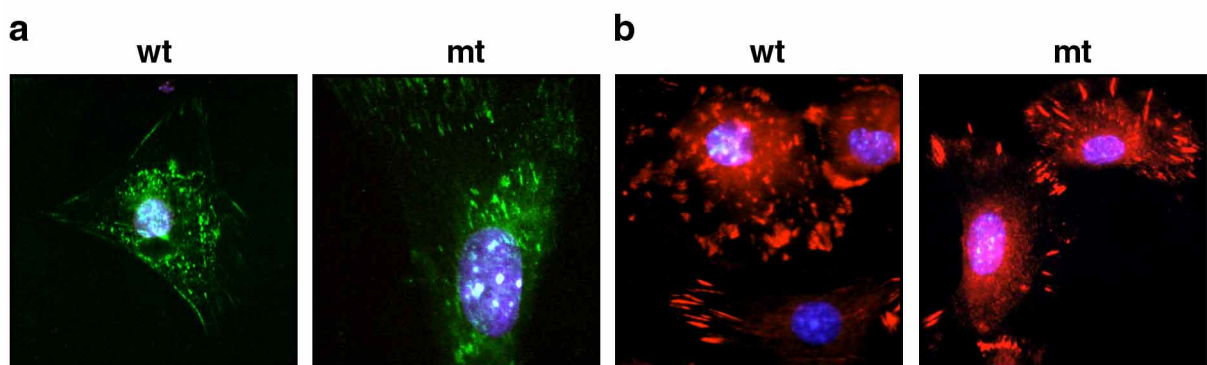


Abb. 44: Immunfluoreszenzfärbung von Wildtyp und PKC δ defizienten Keratinozyten: **a:** $\beta 1$ -Integrin und anti-Isotyp-FITC (grün); **b:** Vinkulin und anti-Isotyp-Cy3 (rot); Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. (1000 fach); wt: Wildtyp; mt: PKC- δ Knock out.

Unterschied zwischen Wildtyp und PKC- δ defizienten Keratinozyten festgestellt (Abb. 44a). Abbildung 44b zeigt die Verteilung der Adhäsionspunkte durch Vinkulinfärbung sichtbar gemacht. Auch hier konnte kein Unterschied in der Expression und Verteilung zwischen Wildtyp und PKC- δ mutanten Keratinozyten nachgewiesen werden (Abb. 44b).

Um die Reorganisation des Aktinzytoskelettes während der Migration beurteilen zu können, wurde die Verteilung der Aktinstruktur in PKC- δ mutanten Keratinozyten im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Das Aktinzytoskelett unterscheidet einerseits ein Netzwerk von Aktinfasern. Andererseits sind ein charakteristisches Merkmal für statische oder langsam migrierende Zellen die sogenannten Stressfasern, die als parallele Aktinbündel die Keratinozyten durchziehen. Wildtyp-Keratinozyten besaßen zu ca. 10-15% sogenannte

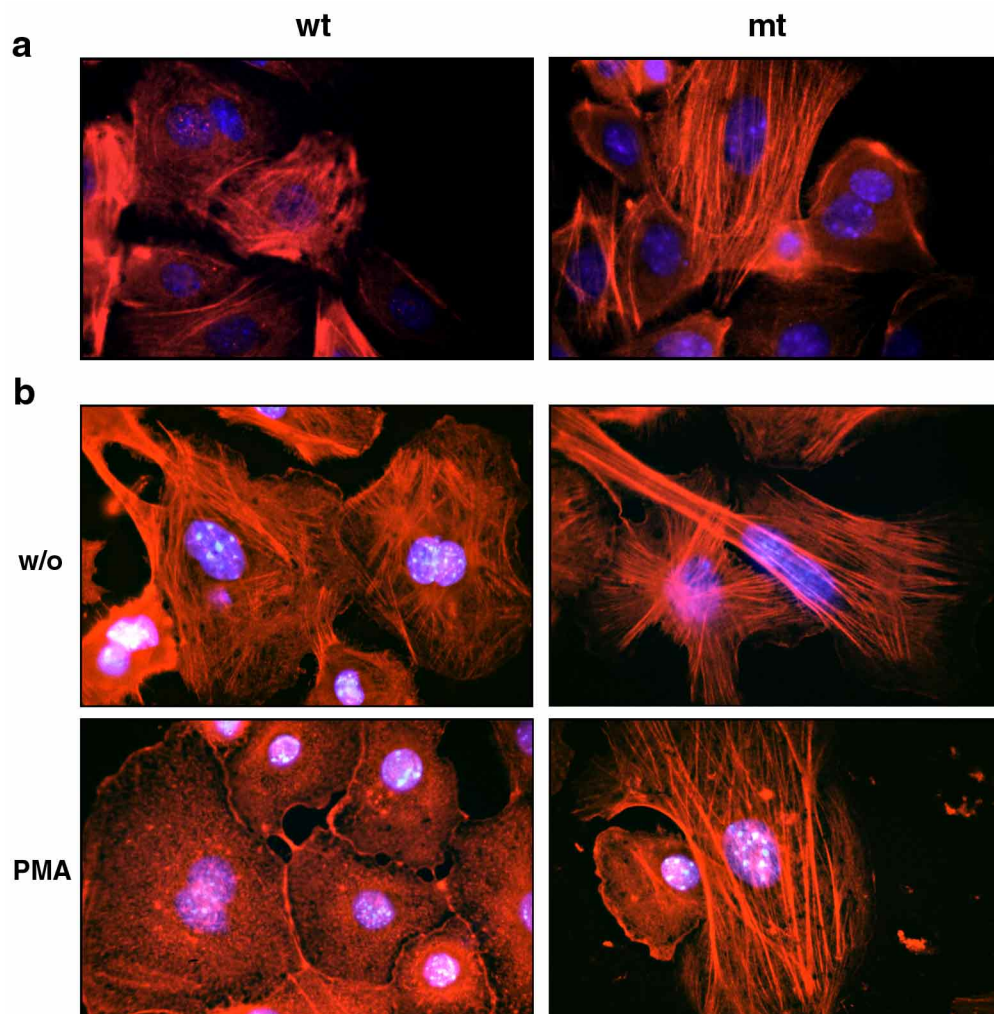


Abb. 45: Immunfluoreszenzfärbung des Aktinzytoskeletts von Wildtyp und PKC- δ defizienten Keratinozyten: **a:** Aktin-Expression in migrierenden Keratinozyten; **b:** Aktin-Expression nach 16 h Wachstumsfaktorentzug jeweils mit und ohne TPA-Stimulation (1 μ M 30 min). Detektion mit anti-Isotyp-Cy3 (rot). Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. (1000 fach); wt: Wildtyp; mt: PKC- δ Knock out; w/o: ohne TPA-Stimulation.

Stressfasern, die allerdings nie an der Migrationsfront gefunden wurden (Abb. 45a, wt). In PKC- δ defizienten Keratinozyten wurden ungefähr 20-30% Zellen mit Stressfasern detektiert, die auch am Wundrand zu finden waren (Abb. 45a, mt). Um zu zeigen, daß es sich tatsächlich um Stressfasern handelt, kann deren Bildung durch Stimulation mit TPA stimuliert werden, während gleichzeitig das übrige Aktinnetzwerk komplett degradiert (Masson-Gadais et al., 1997).

Nach dem Entzug von Wachstumsfaktoren für 16 h, um die Keratinozyten in ihrem Zellzyklus zu arretieren und damit einen störenden Einfluß durch Proliferation auszuschließen, wurden sowohl Wildtyp als auch PKC- δ mutante Keratinozyten mit TPA stimuliert. Abbildung 45b zeigt, daß nach TPA-Stimulation in allen Zellen das Aktinnetzwerk vollständig degradiert ist. Wildtyp Keratinozyten zeigten mit oder ohne TPA-Stimulation eine konstante Verteilung an Stressfasern (5-10%) (Abb. 45b). Der Anteil von PKC- δ mutanten Keratinozyten mit Stressfasern zeigte nach der TPA-Stimulation einen Anstieg von ca. 20% auf ca. 50% (Abb. 45b).

In den Migrationsexperimenten mit Keratinozyten wurde gezeigt, daß PKC- δ mutante Zellen unabhängig von der Zeit und dem Matrixsubstrat langsamer migrieren als Wildtypzellen. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigt eine inhomogene Verteilung der *Zonula adherens* in der PKC- δ Mutante als im Vergleich zum Wildtyp. Gleichzeitig ergab die Immunfluoreszenzfärbung des Aktinzytoskeletts, daß PKC- δ mutante Keratinozyten im Gegensatz zum Wildtyp einen erhöhten Anteil an Stressfasern besitzen, was zu einem Verlust an Mobilität führen kann.

5 Diskussion

Die Isoenzyme der PKC-Familie sind in vielfältige essentielle Prozesse des Lebens involviert, allerdings ist die physiologische Relevanz aus *in vitro*-Untersuchungen aufgrund fehlender Isoform-spezifischer Inhibitoren und Aktivatoren nur begrenzt bekannt. Der hier vorgestellte *gene targeting*-Ansatz bietet die Möglichkeit, die Isoform-spezifische Expression anhand des Reportergens *in vivo* zu analysieren und gleichzeitig in der mutanten Maus den Phänotyp der PKC- δ Defizienz zu studieren.

5.1 Generierung einer PKC- δ mutanten ES-Zelllinie durch homologe Rekombination

Zuerst wurde ein *gene targeting*-Vektor für die Mutation des PKC- δ Gens konstruiert und im folgenden in ES-Zellen transfiziert und mittels des Neo^r-Gens selektioniert. Weiterhin wurden homologe Rekombinationsereignisse in ES-Zellen identifiziert und anhand von zwei Beispielen weiter charakterisiert. Die korrekte Integration des PKC- δ *gene targeting*-Vektors inserierte ein lacZ-Reportergen unter der Kontrolle des endogenen Promotors und führte gleichzeitig zu einer Nullmutation des PKC- δ Gens (Abb. 8).

Der PKC- δ Vektor wurde mit einer Gesamthomologie von 13 Kb und einem kurzen Arm von 1,5 Kb konstruiert. Diese Homologiebereiche entsprechen den Angaben aus veröffentlichten Arbeiten für ein homologes Rekombinationsereignis, denn bei einem zu geringen Homologiebereich wird die homologe Rekombinationshäufigkeit eines *gene targeting*-Vektors negativ beeinflusst (Capecchi, 1989; Hasty et al., 1991; Hasty et al., 1992; Hasty et al., 1991).

Die Analyse von G418-resistenten Zellen ergab ein Verhältnis zwischen homologer und nicht homologer Rekombination von 1/20 (5%). Die weitere Charakterisierung von zwei unabhängigen ES-Zellklonen nach homologer Rekombination des PKC- δ /lacZ *targeting*-Vektors bestätigte die erwartete Einzelintegration des *gene targeting*-Vektors in das ES-Zell Genom sowie die kalkulierten RFLP-Signale laut der Restriktionskarte des PKC- δ Locus (Abb. 8-11). Als Negativkontrollen wurden einmal Wildtyp ES-Zellen und ein nicht homolog rekombinierter ES-Zellklon verwendet, um die erwarteten RFLP-Signale zu bestätigen.

Die erfolgreiche Generierung von PKC- δ mutanten ES-Zelllinien wurde hier anhand der beiden unabhängigen Klone H4 und H11 gezeigt.

5.2 Etablierung einer PKC- δ defizienten Mauslinie

Die beiden mutierten ES-Zellklone H4 und H11 wurden zur Blastozysteninjektion verwendet, um chimäre Mäuse zu generieren (Michael Leitges). Die Keimbahntransmission des mutierten Allels wurde in der F1-Generation untersucht. In der F2-Generation konnten homozygote, PKC- δ defiziente Tiere nachgewiesen werden.

Die Keimbahntransmission für das PKC- δ mutante Allel wurde für beide ES-Zellklone H4 und H11 gezeigt und ist mit der wichtigste Schritt in der Etablierung einer PKC- δ defizienten Maus. Gleichzeitig ist es auch ein Beleg für die Kultivierung der ES-Zellen im pluripotenten Zustand (Abb. 12). Die homozygote Mutation im PKC- δ Gen ist nicht embryonal lethal und es wurde eine normale mendelsche Segregation des mutierten Allels detektiert (Abb. 12, 13). Eine Einschränkung dieser mendelschen Verteilung ergab sich aus der Rückkreuzung auf die jeweiligen Inzuchtstämme 129/SV und C57BL/6. Eine isogene Rückkreuzung auf den Inzuchtstamm 129/SV wurde innerhalb einer Generation durch die Verpaarung der Chimären mit 129/SV-Wildtyp erreicht, da bei einer Keimbahntransmission die heterozygoten Spermien schon von 129/SV-ES-Zellen abstammen. Die Analyse der mendelschen Segregation des mutierten PKC- δ Allels ergab eine signifikante Abweichung von 25% auf 17% homozygoter Tiere (n=190). Die isogene Rückkreuzung auf C57BL/6-Mäuse befindet sich zur Zeit in der 4. Generationen. Eine Untersuchung der mendelschen Verteilung des mutierten PKC- δ Allels ergab nur noch 4% homozygote Tiere (n=100). Dieses verminderte Auftreten von homozygoten Nachkommen bei isogenem Mausstamm deutet auf eine erhöhte embryonale Lethalität hin. Im Fall des genetisch nicht definierten Mausstammes bestehend aus 129/SV- und C57BL/6-Anteilen kann ein mutierter Geneffekt durch ein anderes, nicht alleles Gen suprimiert oder maskiert werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Auswirkung von sog. Modulatoren, die zur Supression oder Maskierung eines Geneffekts zwischen den Mausstämmen führen kann. Dies könnte hier eine nicht detektierbare oder abgeschwächte embryonale Lethalität zur Folge haben.

Insgesamt zeigt die unterschiedliche Verteilung an homozygoten Nachkommen unter den Mausstämmen wie entscheidend der isogene Maushintergrund sein kann. Für die Mutationen der Mausgene A-Raf und EGF-R ist gezeigt, daß der Inzuchtstamm die Ausprägung eines Phänotyps entscheidend beeinflusst. So sind beispielsweise A-Raf defiziente Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund (7-21 Tage post partum) lethal, während die Mutation auf 129/SV-Hintergrund überlebt und einen neurologischen Phänotyp zeigt (Pritchard et al., 1996; Threadgill et al., 1995). Die Rückkreuzung auf C57BL/6-Mäuse wird noch bis zum isogenen Maushintergrund in der 10. Generation fortgesetzt, um diesen drastischeren Phänotyp der

veränderten mendelschen Verteilung analysieren zu können. Trotzdem kann der PKC- δ defiziente Mausstamm auf gemischtem Hintergrund für eine Phänotypanalyse wichtig sein, wie z.B. die Untersuchung der physiologischen Funktion im adulten Tier.

Durch eine Westernblot-Analyse in verschiedenen Geweben der Maus wurde gezeigt, daß das PKC- δ Protein in Proteinextrakt aus homozygotem Gewebe nicht mehr detektierbar ist (Abb. 14). Weiterhin wurde auch kein kleineres Protein (≥ 50 KDa) mit dem polyklonalen PKC- δ Antikörper in homozygotem Gewebe detektiert, daß auf eine dominant aktiven Kinasedomäne hindeuten könnte (Emoto et al., 1995). Dadurch wurde eindeutig die Nullmutation der PKC- δ Mutante nachgewiesen.

5.3 Expression des PKC- δ /lacZ Fusionsproteins in der Mausentwicklung

Es wurde eine zeitlich und räumlich begrenzte Regulation des PKC- δ Gens während der Embryonalentwicklung der Maus gezeigt. Durch die Mutation des PKC- δ Gens ist gleichzeitig ein lacZ-Reportergen in den Locus inseriert worden. Die Expression des lacZ-Gens steht unter der Kontrolle des endogenen PKC- δ Promotors und kann durch eine β -Galaktosidasefärbung nachgewiesen werden. Die β -Galaktosidasefärbung ermöglicht einen sensitiven Nachweis der Expression in der Einzelzelle bis hin zum gesamten Embryo bzw. adultem Gewebe (Bonnerot and Nicolas, 1993).

Die Übereinstimmung der lacZ-Expression und der endogenen PKC- δ Expression wurde anhand *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen (Abb. 18), während gleichzeitig eine unspezifische lacZ-Expression an Wildtypembryonen kontrolliert wurde (Daten nicht gezeigt).

Die lacZ-Expression in der Herz- und Vorderdarm-Anlage 7,5 dpc bis 11,5 dpc im Pericard könnte darauf hindeuten, daß PKC- δ in der Herzentwicklung bzw. in der Differenzierung zum Herzendothel involviert ist. Die PKC- δ exprimierenden Zellen zeigen aber letztendlich keinen phänotypische Beeinträchtigung für die Herzentwicklung, was aber durchaus bei isogenem Maushintergrund auftreten kann.

Die Expression des Reportergens in Zellgruppen, die im Entwicklungsstadium 9,5 dpc vom Hinterhirn in die ersten drei Kiemenbögen wandern, stimmt zeitlich und räumlich mit der Wanderung der Neuralleistenzellen überein (Gilbert, 1997). Neuralleistenzellen sind unter anderem maßgeblich an der Entwicklung von Kranielganglien beteiligt, das auch mit einer späteren PKC- δ Expression in bestimmten Ganglien in Einklang steht. Ein Nachweis

von Neuralleistenzellen könnte mit dem Antikörper gegen das HNK-1-Protein oder mit der Detektion von slug-mRNA geführt werden (Gilbert, 1997).

Ganglien entwickeln sich in der späten Embryogenese, der Organogenese. Die PKC- δ Expression in den Spinalganglien und in den meisten Kranialganglien (V; VII; VIII; IX) bleibt über die gesamte Organogenese erhalten (Abb. 15, 17, 18, 19). Für diese Ganglien kann die PKC- δ Mutante sogar als neuroanatomischer Marker angesehen werden, wie dies für die transgene Mauslinie L17, deren lacZ-Gen unter der Kontrolle von Hoxa-7 Promotorelementen steht, der Fall ist (Tremblay et al., 1995). PKC- δ mutante Embryonen zeigten nach morphologischen Kriterien keine Beeinträchtigung in der Entwicklung der lacZ-exprimierenden Ganglien. Eine mögliche Erklärung ist die Redundanz der PKC- δ Funktion durch anderen PKC-Isoformen in diesen Zellen (Bradl, 1999). Diesbezüglich ist eine Koexpression von PKC- θ in den hier aufgeführten Ganglien durch *in situ*-Hybridisierung gezeigt (Wilda et al., 1999). Eventuell würde ein Doppel-Knock out mit PKC- θ einen Phänotyp in den Kranialganglien zeigen, wie z.B. Temperatur- und Schmerzunempfindlichkeit durch eine fehlende Innervation des Trigeminalganglions.

Während der Entwicklung der Haut wurde das lacZ-Reporter gen in allen Schichten der Epidermis detektiert (Abb. 17, 19). Mit dem Beginn der epidermalen Entwicklung (13 - 14 dpc) ergab sich ein unterschiedliches Expressionsmuster zwischen heterozygotem und homozygotem Embryo. In 13,5 dpc homozygoten Embryonen wurde mit dem Beginn der Stratifizierung eine intensive β -Galaktosidasefärbung in der gesamten embryonalen Epidermis detektiert, während in Heterozygoten noch keine epitheliale lacZ-Expression detektierbar war (Abb. 16). Dieses genotypisch unterschiedliche Expressionsmuster zeigte sich ausschließlich in dem begrenzten Zeitraum zwischen 13 dpc und 14 dpc. Im homozygoten Embryo kann PKC- δ die eigenen Expression nicht mehr suprimieren. Dies deutet auf einen negativ regulatorischen Einfluß von PKC- δ auf die eigene Expression zu Beginn der epidermalen Stratifizierung hin. Eine autoregulatorische Funktion von PKC- δ und - ϵ auf ihre eigene Transkription ist nach Stimulation mit 'Gonadotropin-releasing Hormon' im Zellkultursystem gezeigt (Harris et al., 1997).

Die PKC- δ Expression während der Stratifizierung der embryonalen Epidermis ist bisher nicht in der Literatur beschrieben, aber eine starke Expression der PKC- δ Isoform gegenüber den übrigen PKC Enzymen in der adulten Epidermis ist bekannt (Gschwendt et al., 1986; Wang et al., 1993). Aufgrund des Expressionsmusters wurde eine funktionelle Phänotypanalyse während der Embryonalentwicklung in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. P. Martin (London) durchgeführt. Ein embryonales Wundheilungsexperiment (Nodder and Martin, 1997) ergab allerdings kein Unterschied zwischen Wildtyp und PKC- δ Mutante

(Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß PKC- δ nicht an relevanten Entwicklungsprozessen der Epidermis teilhat oder daß weitere Signalwege oder PKC-Isoformen die PKC- δ Funktion ausgleichen. Weitere embryonale Phänotyp-Analysen wurden nicht durchgeführt.

5.4 Besteht ein funktionaler Zusammenhang zwischen neuronaler PKC- δ Expression und dem Verhalten?

PKC- δ defiziente Männchen zeigten ein verändertes Paarungsverhalten, während bei Homozygoten Weibchen die Fürsorge um die Brut beeinträchtigt war (Abb. 21, 24, 25).

Der veränderte Verpaarungserfolg der PKC- δ mutanten Männchen konnte nicht auf einen Defekt in der Spermatogenese zurückgeführt werden. Nach rein morphologisch, histologischen Kriterien konnte keine Veränderung in der Spermienreifung und deren Anzahl festgestellt werden. Weiterhin besteht kein direkter Zusammenhang zwischen Spermatogenese und lacZ-Expression, so daß sich ein funktioneller Test mit den Spermien erübrigt (Abb. 21).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist eine funktionelle Beeinträchtigung der Riechrezeptoren bzw. der Pheromonrezeptoren. In der Maus besitzt das Erkennen von Düften und Pheromonen einen hohen Stellenwert, das auch das Verhaltensmuster der Tiere beeinflusst und reguliert. Insbesondere für die Pheromonrezeptoren ist gezeigt, daß diese intrazellulär mit G-Proteinen gekoppelt sind und über eine PKA- sowie PKC-Kaskade ihre Signale weiterleiten (Krieger and Breer, 1999). Der PKC-abhängige Signalweg führt beispielsweise nach Aktivierung des Rezeptors zur Erhöhung des IP₃-Gehalt der Zelle. Dies wiederum ist ein Hauptsignalweg für die Produktion des sekundären Signalmoleküls DAG, dem natürlichen Aktivator von PKC. Die Pheromonrezeptoren sind neuronal mit verschiedenen Gehirnbereichen wie dem Bulbus olfactorius und dem Hypothalamus verknüpft. Aufgrund dieser neuronalen Verschaltungen kann Instinktverhalten wie die Reproduktion, Aggressivität und Nahrungsaufnahme gesteuert werden. (Bargmann, 1997; Herrada and Dulac, 1997; Keverne, 1999; Matsunami and Buck, 1997). Diese mögliche funktionelle Beeinträchtigung der Pheromonrezeptoren steht in Einklang mit der Expression von PKC- δ im olfaktorischen Epithel (Daten nicht gezeigt) und wird als eigenständiges Projekt analysiert.

Das beeinträchtigte Fürsorgeverhalten der Weibchen könnte ursächlich mit der PKC- δ Expression im Thalamus in Zusammenhang gebracht werden. Die lacZ-Expression im Thalamus steht in Übereinstimmung mit Expressionsdaten anderer Arbeitsgruppen (Jiang et al., 1994; Kim et al., 1993; Kim et al., 1992). Weiterhin umfaßt die Funktion des Thalamus

verschiedene vegetative sowie motorische Bereiche, beeinflusst aber auch instinktive Verhaltensweisen wie den Mutterinstinkt (Lonstein et al., 1998) (Schmidt & Thews, 1985). Die beobachtete Abschwächung des maternalen Verhaltensphänotyps mit zunehmender Generationszahl kann durch einen genetisch nicht definierten Hintergrund zustandekommen. Wie schon bei der mendelschen Verteilung des mutierten PKC- δ Allels diskutiert, kann der Phänotyp einer Mutation vom Inzuchtstamm geprägt werden (A-Raf und EGF-R Knock out). Nur die Phänotypanalyse in einem reinem Inzuchtstamm erlaubt einen präzisen Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante. Der Nachteil ist, daß die Rückkreuzung auf einen isogenen Mausstamm wie C57BL/6 erst nach 10 Generationen erreicht ist (Papaioannou & Johnson, 1994). Der Vorteil des nicht isogenen Mausstammes von 129/SV und C57BL/6 ist, daß schon in der 2. Generation homozygote Tiere generiert werden, allerdings findet dann eine Phänotypanalyse gegen einen genetisch variablen Maushintergrund statt. Bei einem genetisch nicht definierten Mausstamm, wie bei der PKC- δ Mutante, kommt es bei der Verpaarung zu einer zufälligen Segregation aller polymorphen Allele. Eine Suppression oder Maskierung des mutierten Geneffekts durch ein anderes Gen und durch sog. Modulatoren kann die Folge sein. Dies könnte die Ursache für die Abschwächung des maternalen Phänotyps mit zunehmender Generationenzahl in der PKC- δ Mutante darstellen. Dieses Phänomen ist insbesondere in der Analyse neuronaler Phänotypen gezeigt (mice, 1997). Die Analyse instinktiver Verhaltensweisen sollte mit isogenen Tieren wiederholt werden, denn z.B. auch der fosB-Knock out zeigt die Bedeutung der Signalkaskaden in der Verhaltensanalyse. Der Knock out des 'immediate early genes' fosB zeigt einen maternalen Verhaltensphänotyp. FosB defiziente Weibchen säugen ihre Brut nicht mehr, was letztendlich zum Tod der Nachkommen führt (Brown et al., 1996).

Weiterhin zeigte die β -Galaktosidasfärbung eine PKC- δ Expression in der CA3/4-Region des Hippokampus sowie in den Purkinje-Zellen des Zerebellum (Abb. 23). Diese PKC- δ Expression im Hippokampus ist in Übereinstimmung mit veröffentlichten Arbeiten (Jiang et al., 1994; Kim et al., 1993; Kim et al., 1992). Z.B. überlappt die PKC- γ Expression im Hippokampus teilweise mit PKC- δ und PKC- γ defiziente Mäuse stellen in der funktionalen Analyse einen Zusammenhang mit spezifischem Lernen und dem Erinnerungsvermögen her (Abeliovich et al., 1993; Abeliovich et al., 1993).

Das Expressionsmuster in den Purkinje-Zellen des Zerebellum stellt sich teilweise als kontrovers dar. Einerseits konnte mittels Northern-Blot-Analyse PKC- δ im Zerebellum nachgewiesen werden (Kim et al., 1993) sowie mittels einem Antikörpernachweis sogar in den Purkinje-Zellen (Chen and Hillman, 1993; Chen and Hillman, 1994). Andererseits zeigte sich nach einer *in situ*-Hybridisierung eine schwache Expression von PKC- δ in der

molekularen Schicht, nicht aber in den Purkinje-Zellen des Zerebellum und über eine mögliche Funktion von PKC- δ kann bis jetzt nur spekuliert werden (Kim et al., 1992).

Beim Menschen führen traumatische Beschädigungen des Zerebellum zu motorischen Koordinationsstörungen wie eine Ataxie des Ganges, Tremor oder Hypotonie. Weiterhin führt bei PKC- γ defizienten Mäusen eine veränderte Reizweiterleitung im Zerebellum zu einer Beeinträchtigung der motorischen Koordination (Chen et al., 1995).

Dies läßt vermuten, daß PKC- δ mutante Mäuse aufgrund ihres lacZ-Expressionsmusters im Zerebellum eine motorische Beeinträchtigung besitzen und aufgrund der PKC- δ Expression im Hippokampus ein gestörtes Lernverhalten oder Erinnerungsvermögen zeigen.

Detaillierte Untersuchungen des Verhaltens und der Motorik werden in Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. D. Sweatt (Dept. of Neuroscience, Baylor college of medicine, Houston, USA) durchgeführt.

5.5 Beeinflußt der immunologische Phänotyp die Lebenserwartung der PKC- δ defizienten Maus?

Die Phänotypanalyse von PKC- δ defizienten Mäusen zeigt, daß diese im Alter von 3-4 Monaten eine Splenomegalie entwickeln, die *post mortem* dem 2-3 fachen Gewicht einer Wildtypmilz entspricht (Abb. 26). Gleichzeitig kommt es zur verstärkten Degradation des Thymus in PKC- δ mutanten Mäusen und es wird eine verminderte Lebenserwartung von ca. 0,5-1,0 Jahren beobachtet.

Weiterhin zeigen ältere Tiere (ca. 4 Monate) eine Vergrößerung der Lymphknoten und einer erhöhten Anzahl an reifen B-Zellen um den Faktor 2-3 in der Milz und den Lymphknoten (Lab. A. Tarakhovsky).

Eine medizinische Diagnose des PKC- δ mutanten Phänotyps würde diesen als ein B-Zell-Lymphom oder eine B-Zell-Leukemie beschreiben, deren Symptome eine Vergrößerung der Lymphknoten und der Milz darstellen (Zucker-Franklin et al, 1988). Allerdings fehlen weitere Merkmale einer Autoimmunerkrankung oder einer Neoplasie von reifen B-Zellen, wie eine erhöhte CD5-Expression auf B-Zellen oder ein Anstieg der Immunglobuline im Serum (Lab. A. Tarakhovsky). Weiterhin ist der Reifungsprozeß der B-Lymphozyten sowie die *in vitro*-Proliferation von B-Zellen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Lab. A. Tarakhovsky). Dies könnte darauf hindeuten, daß die Lebensspanne von reifen B-Zellen in der PKC- δ Mutante verlängert ist bzw. die Induktion der Apoptose verändert abläuft.

Verschiedene publizierte Arbeiten unterstützen eine spezifische Funktion von PKC- δ in einem der Apoptosesignalwege. Es ist mit verschiedenen Apoptose-induzierenden Agenzien

wie TNF α , anti-Fas-Antikörper, das aus der Leukemiebehandlung stammende 1- β -Arabinofuranosylzytosin (ara C) sowie ionisierende Bestrahlung gezeigt, daß innerhalb einer Signalkaskade die Protease Kaspase 3 aktiviert wird. Kaspase 3 spaltet PKC- δ in eine proteolytisch aktive Form und diese leitet letztlich die DNA-Fragmentierung ein (Bras et al., 1997; Datta et al., 1996; Emoto et al., 1995; Ghayur et al., 1996). Dieser Apoptosesignalweg ist auch in verschiedenen Zelllinien wie Fibroblasten, Neutrophilen, weißen Blutkörperchen, Keratinozyten, T- und auch B-Zellen gezeigt worden (Bras et al., 1997; Denning et al., 1998; Ghayur et al., 1996; Khwaja and Tatton, 1999; Scheel-Toellner et al., 1999; Wolf et al., 1999). Allerdings konnte in der PKC- δ Mutante bisher noch kein Apoptosesignalweg als nachweislich verändert identifiziert werden (Lab. A. Tarakhovsky). Hierfür ist eine mögliche Erklärung, daß der entsprechende Rezeptor für den Apoptoseweg über PKC- δ noch nicht bekannt ist. Eine weitere Erklärung wäre eine funktionelle Redundanz durch andere PKC-Isoformen, denn PKC- α , - β , - η , - ζ und - ϵ werden auch in B-Zellen exprimiert (Mischak et al., 1991; Mischak et al., 1991) und die PKC-Isoformen ϵ und ζ sind *in vitro*-Substrate des Kaspasesignalwegs (Bras et al., 1997). Eine teilweise Redundanz der PKC- δ Funktion würde auch den schleichenden Verlauf der B-Zell-Akkumulation *in vivo* erklären. Die weiteren Analysen des oben beschriebenen Phänotyps erfolgt in Kollaboration mit dem Labor von A. Tarakhovsky.

5.6 Der Einfluß von PKC- δ während der Wundheilung

Anhand des lacZ-Reportergens ist eine PKC- δ Expression in allen epidermalen Schichten detektiert werden (Abb. 26). Die *in vivo*-Wundheilung ergab, daß die Reepithelialisierung in der PKC- δ Mutante verzögert ist (Abb. 27) und daß PKC- δ in Keratinozyten während der Reepithelialisierung exprimiert wurde (Abb. 28). Weiterhin wurde eine immunhistochemische Analyse der Stratifizierung der Epidermis ohne Anzeichen einer Veränderung gezeigt.

Wie schon aus veröffentlichten Arbeiten hervorgeht ist eine PKC- δ Expression in der Epidermis im Vergleich zu anderen Geweben sehr hoch und PKC- δ ist innerhalb der Epidermis der Maus die vorherrschende PKC-Isoform (Gschwendt et al., 1986; Leibersperger et al., 1991; Wang et al., 1993). Zusammen mit Abbildung 26 bekräftigt dies die Annahme einer essentiellen PKC- δ Funktion in der murinen Epidermis.

Eine verzögerte Reepithelialisierung in der PKC- δ Mutante während der *in vivo* Wundheilung steht in Einklang mit verschiedenen veröffentlichten Arbeiten. In diesen ist ein PKC- δ Einfluß in den Prozessen der Adhäsion, Proliferation und Migration in Keratinozyten gezeigt, die wiederum essentiell für die Reepithelialisierung sind (Blum et al., 1994); Ishino, 1998 #289;

Sudbeck, 1994 #449]. Ein möglicher Erklärungsansatz für die verzögerte Wundheilung, die trotzdem zum Wundverschluß führt, ist wiederum die Redundanz durch andere PKC-Isoformen. In primären Keratinozyten sind außer PKC- δ noch PKC- α , - ϵ , - η , - ζ und - ι vertreten (eigene RT-PCR Daten)(Dlugosz et al., 1992). Außerdem werden solche essentiellen Wundheilungsprozesse wie Proliferation und Migration nicht nur über einen Signalweg gesteuert, die auch PKC-unabhängig sein können (Sudbeck et al., 1994).

Ein Vergleich der Stratifizierungsmarker des Stratum germinativum mit Keratin 5 und 14, des Stratum spinosum mit Keratin 1 und 10 sowie des Stratum granulosum mit Lorikrin ließen keinen Unterschied hinsichtlich der epidermalen Regeneration zwischen Wildtyp und PKC- δ Mutante erkennen (Abb. 29). Obwohl gezeigt ist, daß PKC- α , - ϵ und - δ beispielsweise die Expression der frühen bis späten Differenzierungsmarker SPR-1, Lorikrin und Filaggrin regulieren (Lee et al., 1997; Stanwell et al., 1996).

Weitere Immunfluoreszenzen gegen die Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle sowie gegen das Aktinzytoskelett zeigten auch keine Differenzen im Expressionmuster zwischen Wildtyp und PKC- δ Mutante (Abb. 30 und 31). Andererseits ist allgemein bekannt, daß diese Proteinkomplexe entscheidend in Wundheilungsprozesse wie Migration involviert sind. Durch *in vitro*-Experimente in humanen Keratinozyten ist gezeigt, daß es nach PKC Stimulation zu einer Reduktion der Zonula adhaerens und des Aktinzytoskeletts kommt (Blum et al., 1994; Masson-Gadais et al., 1997). Zumindest in Fibroblasten transloziert PKC- δ nach Stimulation in den Bereich der Adhäsionspunkte und der Aktin-Stressfasern (Barry and Critchley, 1994; Woods and Couchman, 1992). Allerdings ist die Wundheilung ein hoch dynamischer Prozeß, wohingegen die normale Hautregeneration eher statisch bzw. sehr viel langsamer verläuft. Dies könnte erklären, warum der Wundheilungseffekt der PKC- δ Mutante in der Hautregeneration nicht mit der hier durchgeführten molekularen Analysen detektiert werden kann.

5.6.1 Die Adhäsion als ein Prozeß der Wundheilung

In der Adhäsionsanalyse wurde erstens gezeigt, daß PKC- δ mutante Keratinozyten deutlich schlechter an Gelatine adhäreren als im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 32). Diese Adhäsionsdifferenz stieg über die Zeit an und zeigte in der Substrat-Abhängigkeit, daß nur auf Gelatine und Laminin ein Unterschied von Wildtyp und PKC- δ mutanten Zellen zu detektieren ist (Abb. 32, 33). Drittens wurde gezeigt, daß die verminderte Adhäsion der PKC- δ mutanten Keratinozyten mit einer verlangsamten dynamischen Reorganisation des Aktinzytoskeletts korreliert (Abb. 34).

Die Adhäsion zwischen Keratinozyten und ECM-Proteinen erfolgt primär durch verschiedene Integrinrezeptoren, die ihrerseits fast ausschließlich mit dem Aktinzytoskelett assoziiert sind. Der Einfluß von PKC auf Integrin-vermittelte Adhäsion in Keratinozyten ist z.B. in der Modulation von der Zonula adhaerens und in den Adhäsionspunkten sowie in der Aktin-abhängigen Zelladhäsion vermittelt durch MARCKS-Proteine gezeigt (Blum et al., 1994; Myat et al., 1997; Woods and Couchman, 1992). Die Organisation des Aktinzytoskelettes in Keratinozyten insbesondere in der Modulation von Stressfasern zeigt eine Beeinflussung durch PKC. Weiterhin kann die Migration auf Fibronectin durch PKC-Stimuli und Inhibitoren moduliert werden (Huang et al., 1998; Masson-Gadais et al., 1997). Eine PKC- δ spezifische Funktion in der Adhäsion resultiert aus der Analyse von Fibroblasten. Hier transloziert PKC- δ nach Stimulation der Zellen in die Adhäsionspunkte. Zusätzlich hat die Stimulation mit dem Phosphorylierungsagens Bistatene A eine PKC- δ Translokation zur Folge, das zum Abbau von Vinkulin in den Adhäsionspunkten und den Aktin-Stressfasern führt (Barry and Critchley, 1994; Watters et al., 1996).

Das hier verwendete Substrat Gelatine entspricht denaturiertem Kollagen und erfüllt alle Voraussetzungen eines ECM-Proteins bezüglich der Wundheilungsprozesse wie Adhäsion, Proliferation und Migration (Dunsmore et al., 1996; Kim et al., 1997). Ein Adhäsionsvergleich zwischen den verschiedenen ECM-Proteinen ist eine funktionelle Analyse der Expression von verschiedenen Integrinen der Keratinozyten. Entsprechend der verminderten Adhäsion auf Gelatine von PKC- δ mutanten Keratinozyten wurde dies auch für das Substrat Fibronectin erwartet. Denn $\alpha 5/\beta 1$ -Integrin, das während der Wundheilung exprimiert wird und die Migration von Keratinozyten positiv beeinflusst, bindet primär an Gelatine und Fibronectin. Jedoch war die Adhäsion zu Fibronectin in PKC- δ mutanten Keratinozyten unverändert. Im Gegensatz dazu ergab sich eine Differenz zwischen Wildtyp und Mutante bei dem Substrat Laminin (Abb. 33). Das Ergebnis der Adhäsion auf Laminin steht im Gegensatz zu einer verlangsamten Wundheilung der PKC- δ Mutante. Erstens inhibiert Laminin die Migration von Keratinozyten (O'Toole et al., 1997). Zweitens wurde die Expression des korrespondierenden $\alpha 6/\beta 4$ -Integrinrezeptor in der PKC- δ mutanten Haut gezeigt (Abb. 30a+b) und drittens ist $\alpha 6/\beta 4$ -Integrin intrazellulär mit dem Keratinzytoskelett verbunden, so daß keine direkte Signalweiterleitung zum Aktinzytoskelett vorhanden ist (Watt & Hertle, 1994).

Diese Resultate deuten darauf hin, daß alle Adhäsionsmoleküle exprimiert sind und die Ursache der verminderten Adhäsion wahrscheinlich in der Signalweiterleitung liegt, und somit die Reorganisation des Aktinzytoskelettes in PKC- δ defizienten Keratinozyten beeinträchtigt ist. Abbildung 34 zeigt deutlich, daß das 'spreading'-Verhalten der PKC- δ

mutanten Zellen wesentlich verlangsamt ist in Abhängigkeit von der Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Dieses Resultat steht in Einklang mit einer Publikation, die Regulation des 'spreading'-Verhaltens durch MARCKS-Proteine in Fibroblasten beschreibt (Myat et al., 1997). MARCKS-Proteine sind in der Lage an z.B. Aktin zu binden sowie für PKC Enzyme als Substrat zu fungieren. MARCKS-Mutanten haben in Fibroblasten den gleichen 'spreading'-Phänotyp wie PKC- δ defiziente Keratinozyten. Weiterhin ist gezeigt, daß Keratinozyten durch intrazelluläre PKC-abhängige Signalwege beeinflußt werden und daß z.B. die Organisation des Aktinzytoskeletts (s.o.) u.a. durch PKC-Enzyme reguliert wird (Blum et al., 1994; Chun et al., 1997; Masson-Gadais et al., 1997).

Demnach ist es naheliegend, daß die verminderte Adhäsion in PKC- δ defizienten Keratinozyten auf einen dynamischen Effekt des Aktinzytoskeletts zurückzuführen ist, dessen Ursache in einer veränderten Signalweiterleitung der Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen oder aber in einer verminderten Phosphorylierung von Aktin-assoziierten Proteinen liegt.

5.6.2 Wie kontrolliert PKC- δ den Zellzyklus?

Ersten wurde durch die Analyse des BrdU-Einbaus gezeigt, daß PKC- δ defiziente Keratinozyten eine um die Hälfte verringerte Proliferationsrate im Vergleich zu Wildtyp Zellen besitzen (Abb. 35). Zweitens wurde eine Dosis-abhängige Inhibition in Wildtyp-Keratinozyten durch den PKC-Inhibitor Rottlerin erreicht (Abb. 36). Dritten wurde gezeigt, daß eine Stimulation der klassischen und neuen PKC-Isoformen durch den Tumorpromotor TPA eine Inhibition der Proliferation um ca. 50% in Keratinozyten zur Folge hat (Abb. 37).

Der verminderte BrdU-Einbau in der PKC- δ Mutante läßt vermuten, daß PKC- δ bei unbekanntem Stimulus die Proliferation von Keratinozyten positiv beeinflußt. Dies sollte durch den PKC- δ spezifischen Inhibitor Rottlerin in einer Dosis-abhängigen Abnahme der Proliferationsrate in Wildtyp Keratinozyten bestätigt werden (Abb. 36).

Außerdem wurde durch die gleichzeitige Inhibition der PKC- δ mutanten Zellen durch Rottlerin jedoch klar, daß dieser Inhibitor nicht ausschließlich PKC- δ spezifisch ist. Laut publizierter Daten besitzt Rottlerin eine IC_{50} -Wert für PKC- δ von 3-6 μ M und liegt für die übrigen PKC-Isoformen um mindestens einer Zehnerpotenz höher (Gschwendt et al., 1994). Allerdings wird die Proliferation in PKC- δ mutanten Keratinozyten schon in den sehr geringen Konzentrationen ab 13 nM inhibiert (Faktor 230-460 weniger; Abb. 36). Erhöhte Rottlerinkonzentrationen zwischen 10 - 100 mM, die laut Literatur den IC_{50} -Werten der übrigen PKC-Isoformen entsprechen, führt zum vollständigen Ablösen der Keratinozyten von der Zellkulturschale (Daten nicht gezeigt)

Das die verminderte Proliferationsrate in PKC- δ defizienten Keratinozyten nicht auf eine frühzeitigere Initiierung der Differenzierung zurückzuführen ist, wurde anhand der Expression der frühen Differenzierungsmarker Keratin 1 und 10 in der Immunfluoreszenz überprüft (Daten nicht gezeigt).

Eine verbleibende Proliferationsrate in der PKC- δ Mutante (24%) bedeutet, daß PKC- δ nicht ausschließlich den Zellzyklus in Mauskeratinozyten kontrolliert oder daß die PKC- δ Defizienz von anderen PKC-Isoformen teilweise kompensiert wird. Für eine Redundanz durch andere PKC-Isoformen spricht teilweise, daß in proliferierenden Keratinozyten des Stratum germinativum außer PKC- δ noch PKC- α , - ϵ , - η , - ζ und - ι vertreten sind (eigene RT-PCR Daten)(Dlugosz et al., 1992). Andererseits sind in Fibroblasten und auch in Keratinozyten PKC-unabhängige parallel zu PKC-abhängigen Signalwegen nachgewiesen worden, die den Zellzyklus regulieren (Hegemann et al., 1992; Olson et al., 1995). Der verbleibende BrdU-Einbau nach TPA-Stimulation in Wildtyp- und mutanten Keratinozyten bestätigt die Präsenz eines weiteren, nicht durch TPA stimulierbaren Signalwegs (Abb. 37). Dieser Signalweg beeinflusst die Proliferation positiv und bedeutet, daß entweder atypischen

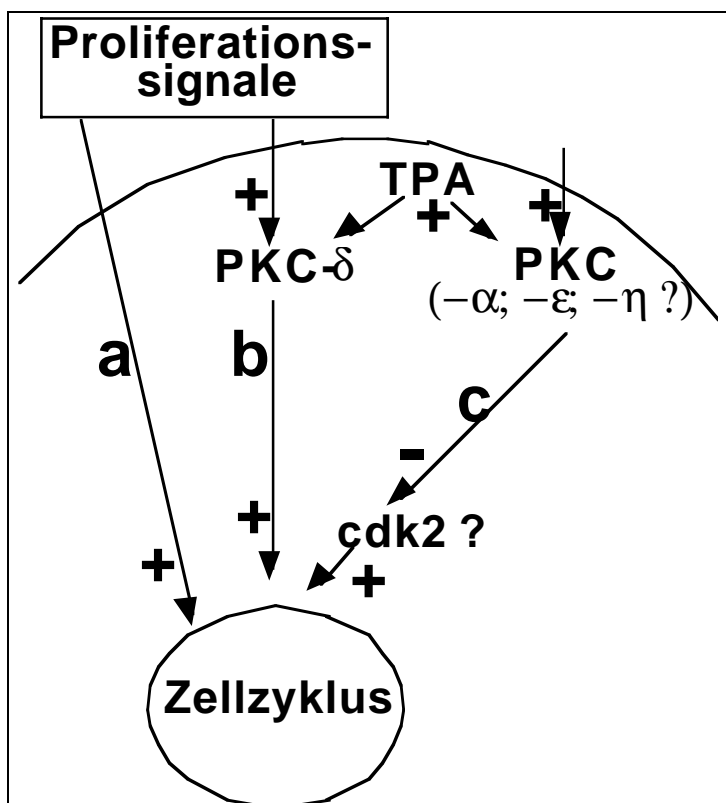


Abb. 46: Hypothese der Proliferationskontrolle in Keratinozyten. Abkürzungen: CDK2: Zyklus-abhängige Kinase 2; TPA: Tumorpromotor der Phorbolsterklasse; ⊕: Stimulation; ⊖: Inhibition.

PKC-Isoformen involviert sind, die nicht durch TPA stimuliert werden können oder daß dieser Proliferationsstimulus PKC-unabhängig ist.

Entgegengesetzt der allgemeingültigen Annahme, daß TPA als Proliferationsstimulus fungiert, kommt es in Keratinozyten zur deutlichen Inhibition des Zellzyklus um 50% (Abb. 37). In veröffentlichten Arbeiten wird diese verminderte Proliferationsaktivität auf die Zyklus-abhängige Kinase 2 (CDK2) zurückgeführt (Ishino et al., 1998; Ohba et al., 1998). Allerdings muß die TPA-induzierte Inhibition des

Zellzyklus dominant über den PKC- δ stimulierenden Signalweg sein, denn auch PKC- δ wird primär durch TPA aktiviert. Eine TPA-Stimulation von PKC- δ mutanten Keratinozyten hat keinen Einfluß auf den BrdU-Einbau (Abb. 37). Dies könnte bedeuten, daß der positive PKC- δ Signalweg und das negativ mitogene Signal in gleicher Weise den Zellzyklus beeinflussen und der verbleibende BrdU-Einbau auf PKC-unabhängige (nicht TPA stimulierbare) Signalwege zurückzuführen ist. Einen weiteren Anhaltspunkt für das negative mitogene Signal kommt aus veröffentlichten Arbeiten mit Mauskeratinozyten (Ishino et al., 1998; Ohba et al., 1998). Durch Überexpression von PKC- η kommt es zur Inhibition von CDK2 und damit zur verminderten Proliferation, d.h. bei der TPA-stimulierten Isoform, die folglich zur Inhibition des Zellzyklus führt, könnte es sich um PKC- η handeln. Kontrovers ist allerdings der gleiche inhibitorische Effekt der Proliferationsmaschinerie auch durch die Überexpression von PKC- δ (Ishino et al., 1998; Ohba et al., 1998), das den Resultaten aus der PKC- δ Mutante widerspricht (Abb. 35, 36).

Abb. 46 faßt eine Arbeitshypothese schematisch wie folgt zusammen: Die Proliferation in Keratinozyten wird über mindestens 3 Signalwege kontrolliert: eine stimulierende, TPA-unabhängige Signalkaskade (a), einen stimulierenden Signalweg über PKC- δ (b) sowie eine inhibitorische PKC-abhängige Regulation des Zellzyklus (c).

Weitere Untersuchungen im Hinblick auf nachfolgende Proteine in der Signalkaskade von PKC- δ wie z.B. eine verminderte Aktivität von CDK2 in Keratinozyten der PKC- δ Mutante oder die Beeinflussung anderer Signalwege wie z.B. über die MAPK, JNK oder STAT-Faktoren sind noch in der Analyse. Weiterhin sollen auch Hinweise über potentielle Rezeptoren für eine PKC- δ abhängige Proliferationskontrolle erforscht werden, das allerdings eine Adaptierung der primären Zellkultur an ein Nährmedium mit definierten Wachstumsfaktoren voraussetzt.

5.6.3 Wie reguliert PKC- δ die Migration?

Die erste Aussage ist eine verzögerte Migration in PKC- δ mutanten Keratinozyten im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 39). Diese Differenz in der Migrationsrate zwischen Wildtyp und PKC- δ Mutante blieb konstant über die Zeit und unabhängig vom jeweiligen Substrat (Abb. 40, 41). Zweitens wurde durch den PKC-Inhibitor Rottlerin die Migration im Wildtyp Dosis-abhängig inhibiert (Abb. 42). Drittens wurde eine inhomogene Verteilung von Proteinen der Zonula adhaerens festgestellt (Abb. 43). Zuletzt ergab die Analyse des Aktinzytoskeletts ein vermehrtes Auftreten von Stressfasern in PKC- δ mutanten Keratinozyten als im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 45).

Die *in vitro* Wundheilung in einer Primärkultur von Keratinozyten zeigte deutlich eine um die Hälfte verminderte Migration auf Gelatine nach 45h (Abb. 39). Die verminderte Migration zwischen Wildtyp und PKC- δ Mutante zeigte sich über die Zeit konstant, das für ein dynamisches Prozeß als Ursache spricht (Abb. 40). Außerdem entspricht die verminderte Migration *in vitro* den Ergebnissen der *in vivo*-Wundheilung. Der Prozeß der Migration umfaßt hauptsächlich die dynamischen Polymerisation und Depolymerisation des Aktinzytoskelettes und wird entscheidend durch die Funktion der Adhäsionsmoleküle beeinflusst. Dies wiederum steht in Einklang mit dem verzögerten 'spreading'-Verhalten nach der Adhäsion von PKC- δ mutanten Keratinozyten (Abb. 34).

In Abbildung 41 ist gezeigt, daß die verzögerte Migration der PKC- δ mutanten Keratinozyten unabhängig vom jeweiligen Substrat ist. Dies deutet wie bei der Adhäsion darauf hin, daß keine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen vorliegt.

Wie schon bei der Proliferation konnte auch die Migration der Wildtyp Keratinozyten Dosisabhängig durch den PKC- δ Inhibitor Rottlerin gehemmt werden (Abb. 42). Jedoch trat derselbe Effekt auch in PKC- δ defiziente Keratinozyten auf (Daten nicht gezeigt), und gibt damit erneut einen Nachweis, daß durch geringe Rottlerinkonzentrationen auch andere Enzyme inhibiert werden.

Bezüglich der Frage nach der molekularen Grundlage der verminderten Migration in der PKC- δ Mutante wurde sowohl das Aktinzytoskelett, wie schon bei der Adhäsion, als auch Aktin-assoziierte Adhäsionskomplexe analysiert.

Die Zonula adhaerens bestehen transmembran aus E-Cadherin und intrazelluläre Bestandteile, wie z.B. β -Catenin, stellen eine Verbindung zum Aktinzytoskelett dar. Wildtyp Keratinozyten zeigten eine homogene Expression im Bereich des Zell-Zell-Kontakts, während in PKC- δ defizienten Zellen die membranständige Expression inhomogen und delokalisiert war (Abb. 43). Ein vergleichbarer Effekt ist in humanen Keratinozyten für E-Cadherin nach einer TPA-Stimulation beschrieben. Das belegt zwar einen PKC Einfluß, aber andererseits wird die inhomogene Verteilung in diesem Fall durch eine PKC-Stimulation hervorgerufen, was dem Resultat aus PKC- δ defizienten Keratinozyten konträr gegenübersteht (Blum et al., 1994).

Eine Analyse der β 1-Integrin-Kontaktpunkte und der Adhäsionspunkte an der basalen Keratinozytenmembran, hier repräsentiert durch das intrazelluläre Protein Vinkulin, zeigte dieselben Resultate der Expression für Wildtyp und PKC- δ mutanten Keratinozyten (Abb. 44). Publierte Daten belegen allerdings den Einfluß von PKC auf die Expression von β 1-Integrinen in HeLa-Zellen, während in humanen Keratinozyten nach PKC-Stimulation die Expression der Adhäsionspunkte (Vinkulin) nicht beeinflusst wird (Blum et al., 1994; Chun et al., 1997).

Das Keratinzytoskelett und seine assoziierten Adhäsionskomplexe besitzen ausschließlich eine statische Stützfunktion und sind hier erst einmal nicht weiter analysiert worden (Morley & Lane, 1994).

Die Analyse des Aktinzytoskeletts zeigte, daß in PKC- δ mutanten Zellen vermehrt Stressfasern zu finden sind und deren Aufbau auch weiterhin durch TPA-Stimulation induziert wird (Abb. 45). Diese parallelen Aktinbündel befinden sich häufig in statisch bis sehr langsam bewegendenden Zellen, durchziehen dabei den ganzen Zellkörper und enden an der Zellmembran in den Adhäsionspunkten (Nobes and Hall, 1995). In Keratinozyten kann die Polymerisation von Stressfasern durch Wachstumsfaktoren und nach TPA Stimulation induziert werden (Masson-Gadais et al., 1997). Diese Beobachtung ist auch in Fibroblasten bestätigt. Weiterhin führt eine Stimulation durch Wachstumsfaktoren über die GTPase rho zum Aufbau von Stressfasern (Woods and Couchman, 1992).

Das Aktinzytoskelett besteht zugleich aus einem Netzwerk an Aktinpolymeren, die im kortikalen Bereich kondensieren. Dieses Netzwerk scheint in der PKC- δ Mutante unverändert und degradiert wie erwartet im Wildtyp nach TPA-Stimulation (Abb. 45). Dieser Teil des Aktinzytoskelettes kann in seinem Aufbau durch Wachstumsfaktoren und Integrinsignale in Keratinozyten stimuliert werden (Masson-Gadais et al., 1997), deren Signalwege src- und ras-abhängig sind (Lin et al., 1996). Tyrosinkinase dagegen scheinen in den Aufbau des Aktinnetzwerks nicht involviert zu sein und PKC fördert nach TPA Stimulation den Abbau der Aktinpolymere (Masson-Gadais et al., 1997). Für den Prozeß der Migration bedeutet dies eine Inhibition um ca. 50% durch Entzug von Wachstumsfaktoren oder PKC-Stimulation durch TPA, während der allgemeine PKC Inhibitor Calpain die Migration fast vollständig blockiert (Masson-Gadais et al., 1997). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der PKC- δ Mutante wird jedoch klar, daß einzelne PKC-Isoformen gegenläufige Effekte besitzen können, wie z.B. die Regulation der Migration, so daß es nach PKC-Stimulation zur Inhibition der Migration kommt, aber erst eine Inhibition der PKC-Enzyme einen vollständigen Migrationsblock bewirkt. So könnte PKC- δ in Bezug auf Stressfasern den Aufbau negativ oder den Abbau positiv regulieren und somit in der Mutante für die verzögerte Migration verantwortlich sein. Allerdings ist die Stimulation der übrigen PKC-Isoformen α , ϵ oder η dominant über PKC- δ für den Stressfasern-Aufbau.

6 Zusammenfassung

PKC-Enzyme besitzen eine zentrale Rolle in wichtigen Prozessen der Signalübertragung von extrazellulären Signalmolekülen bis hin zu intrazellulären Kaskaden eukaryontischer Zellen wie z.B. der Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Die Familie der PKC-Enzyme besteht aus mindestens 9 verschiedenen Isoformen. Aufgrund fehlender Isoform-spezifischer Aktivatoren und Inhibitoren ist es bis heute nur teilweise gelungen, eine Isoform-spezifische Funktion im physiologischen Sinn zu finden. Von der neuen PKC- δ Isoform ist bisher nur bekannt, daß sie in verschiedenen Zelltypen lokalisiert und in unterschiedliche funktionalen Prozesse involviert ist. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode des *gene targeting* durch homologe Rekombination soll zur Aufklärung der *in vivo* Expression und Funktion der neuen PKC- δ Isoform dienen.

Das Expressionsmuster von PKC- δ ist auf verschiedene Zelltypen wie z.B. Keratinozyten, B- und T-Zellen und neuronale Kompartimente restringiert, so daß sich hieraus schon die ersten Anhaltspunkte für eine spezifische PKC- δ Funktion ergeben.

Während der Embryonalentwicklung ist jedoch keine dominante Funktion von PKC- δ erkennbar und somit der PKC- δ Knock out lebensfähig. In der adulten PKC- δ defizienten Maus deuten sich vielseitige Phänotypen an, die entsprechend des Expressionsmusters neuronale Prozesse wie das Instinktverhalten, das Lernen und die Motorik betreffen, oder aber lymphatische Symptome wie z.B. eine Splenomegalie zeigen, die auf eine spezifische Funktion in reifen B-Lymphozyten abzielen. In der Epidermis des PKC- δ Knock out ist ein Phänotyp erst während der Wundheilung klar erkennbar und manifestiert sich auf die Einzelprozesse Proliferation und Migration von Keratinozyten. Insbesondere während der Wundheilung scheint PKC- δ die Proliferation positiv zu regulieren, ist aber nicht ausschließlich für diesen Prozeß verantwortlich. Die Resultate der Adhäsion und der Migration zielen auf einen dynamischen Einfluß von PKC- δ in der Organisation des Aktinzytskelettes ab.

Das *gene targeting* als Analysemethode der physiologischen Funktion bestimmter Gene zeigt sich auch im Fall von PKC- δ als geeignet, bedarf aber bei der Phänotypanalyse als Mitglied einer Genfamilie einer besonderen Aufmerksamkeit im Hinblick auf kleinere Unterschiede.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

Abeliovich, A., Chen, C., Goda, Y., Silva, A. J., Stevens, C. F., and Tonegawa, S. (1993). Modified hippocampal long-term potentiation in PKC gamma-mutant mice. *Cell* 75, 1253-62.

Abeliovich, A., Paylor, R., Chen, C., Kim, J. J., Wehner, J. M., and Tonegawa, S. (1993). PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. *Cell* 75, 1263-71.

Aihara, H., Asaoka, Y., Yoshida, K., and Nishizuka, Y. (1991). Sustained activation of protein kinase C is essential to HL-60 cell differentiation to macrophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11062-6.

Bargmann, C. I. (1997). Olfactory receptors, vomeronasal receptors, and the organization of olfactory information. *Cell* 90, 585-7.

Barry, S. T., and Critchley, D. R. (1994). The RhoA-dependent assembly of focal adhesions in Swiss 3T3 cells is associated with increased tyrosine phosphorylation and the recruitment of both pp125FAK and protein kinase C-delta to focal adhesions. *J Cell Sci* 107, 2033-45.

Billah, M. M., and Anthes, J. C. (1990). The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem J* 269, 281-91.

Bjare, U. (1992). Serum-free cell culture. *Pharmacol Ther* 53, 355-74.

Blum, S., Ness, W., Petrow, W., and Achenbach, F. (1994). Localization of protein kinase C in primary cultures of human keratinocytes in relation to cell contact proteins. *Cell Signal* 6, 157-65.

Bonnerot, C., and Nicolas, J. F. (1993). Application of LacZ gene fusions to postimplantation development. *Methods Enzymol* 225, 451-69.

Bradl, M. (1999). Myelin dysfunction/degradation in the central nervous system: why are myelin sheaths susceptible to damage? *J Neural Transm Suppl* 55, 9-17.

Bras, A., Martinez-A, C., and Baixeras, E. (1997). B cell receptor cross-linking prevents Fas-induced cell death by inactivating the IL-1 beta-converting enzyme protease and regulating Bcl-2/Bcl-x expression. *J Immunol* 159, 3168-77.

Bredel, M., and Pollack, I. F. (1997). The role of protein kinase C (PKC) in the evolution and proliferation of malignant gliomas, and the application of PKC inhibition as a novel approach to anti-glioma therapy. *Acta Neurochir* 139, 1000-13.

Brown, J. R., Ye, H., Bronson, R. T., Dikkes, P., and Greenberg, M. E. (1996). A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fosB. *Cell* 86, 297-309.

- Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* *244*, 1288-92.
- Chen, C., Kano, M., Abeliovich, A., Chen, L., Bao, S., Kim, J. J., Hashimoto, K., Thompson, R. F., and Tonegawa, S. (1995). Impaired motor coordination correlates with persistent multiple climbing fiber innervation in PKC gamma mutant mice. *Cell* *83*, 1233-42.
- Chen, S., and Hillman, D. E. (1993). Compartmentation of the cerebellar cortex by protein kinase C delta. *Neuroscience* *56*, 177-88.
- Chen, S., and Hillman, D. E. (1994). Immunohistochemical localization of protein kinase C delta during postnatal development of the cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* *80*, 19-25.
- Chun, J., Auer, K. A., and Jacobson, B. S. (1997). Arachidonate initiated protein kinase C activation regulates HeLa cell spreading on a gelatin substrate by inducing F-actin formation and exocytotic upregulation of beta 1 integrin. *J Cell Physiol* *173*, 361-70.
- Csukai, M., and Mochly-Rosen, D. (1999). Pharmacologic modulation of protein kinase C isozymes: the role of RACKs and subcellular localisation. *Pharmacol Res* *39*, 253-9.
- Cutler, R. E., Jr., Maizels, E. T., and Hunzicker-Dunn, M. (1994). Delta protein kinase-C in the rat ovary: estrogen regulation and localization. *Endocrinology* *135*, 1669-78.
- Datta, R., Banach, D., Kojima, H., Talanian, R. V., Alnemri, E. S., Wong, W. W., and Kufe, D. W. (1996). Activation of the CPP32 protease in apoptosis induced by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and other DNA-damaging agents. *Blood* *88*, 1936-43.
- Deacon, E. M., Pongracz, J., Griffiths, G., and Lord, J. M. (1997). Isoenzymes of protein kinase C: differential involvement in apoptosis and pathogenesis. *Mol Pathol* *50*, 124-31.
- Denning, M. F., Dlugosz, A. A., Howett, M. K., and Yuspa, S. H. (1993). Expression of an oncogenic rasHa gene in murine keratinocytes induces tyrosine phosphorylation and reduced activity of protein kinase C delta. *J Biol Chem* *268*, 26079-81.
- Denning, M. F., Dlugosz, A. A., Threadgill, D. W., Magnuson, T., and Yuspa, S. H. (1996). Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. *J Biol Chem* *271*, 5325-31.
- Denning, M. F., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., and Yuspa, S. H. (1995). Cholesterol sulfate activates multiple protein kinase C isoenzymes and induces granular cell differentiation in cultured murine keratinocytes. *Cell Growth Differ* *6*, 1619-26.
- Denning, M. F., Wang, Y., Nickoloff, B. J., and Wrone-Smith, T. (1998). Protein kinase Cdelta is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Biol Chem* *273*, 29995-30002.
- Dlugosz, A. A., Mischak, H., Mushinski, J. F., and Yuspa, S. H. (1992). Transcripts encoding protein kinase C-alpha, -delta, -epsilon, -zeta, and -eta are expressed in basal and differentiating mouse keratinocytes in vitro and exhibit quantitative changes in neoplastic cells. *Mol Carcinog* *5*, 286-92.

Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87, 27-45.

Dover, R., and Patel, K. (1994). Improved methodology for detecting bromodeoxyuridine in cultured cells and tissue sections by immunocytochemistry. *Histochemistry* 102, 383-7.

Dunsmore, S. E., Rubin, J. S., Kovacs, S. O., Chedid, M., Parks, W. C., and Welgus, H. G. (1996). Mechanisms of hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production. *J Biol Chem* 271, 24576-82.

Dwyer, L. D., Miller, A. C., Parks, A. L., Jaken, S., and Malkinson, A. M. (1994). Calpain-induced downregulation of activated protein kinase C-alpha affects lung epithelial cell morphology. *Am J Physiol* 266, L569-76.

Elledge, S. J., Mulligan, J. T., Ramer, S. W., Spottswood, M., and Davis, R. W. (1991). Lambda YES: a multifunctional cDNA expression vector for the isolation of genes by complementation of yeast and Escherichia coli mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1731-5.

Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W. W., Kamen, R., Weichselbaum, R., and et al. (1995). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *Embo J* 14, 6148-56.

Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-6.

Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.

Frohman, M. A., and Martin, G. R. (1989). Cut, paste, and save: new approaches to altering specific genes in mice. *Cell* 56, 145-7.

Fuchs, E. (1994). Epidermal differentiation and keratin gene expression. *Princess Takamatsu Symp* 24, 290-302.

Gangeswaran, R., and Jones, K. T. (1997). Unique protein kinase C profile in mouse oocytes: lack of calcium-dependent conventional isoforms suggested by rtPCR and Western blotting. *FEBS Lett* 412, 309-12.

Germano, P., Gomez, J., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., and Rivera, J. (1994). Phosphorylation of the gamma chain of the high affinity receptor for immunoglobulin E by receptor-associated protein kinase C-delta. *J Biol Chem* 269, 23102-7.

Gilbert S.F. (ed), developmental biology, 5.Ed., Sinauer Associates, Inc., 1997

Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R. V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W., and Kufe, D. (1996). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Exp Med* 184, 2399-404.

Glazer, R. I. (1998). The protein kinase ABC's of signal transduction as targets for drug development. *Curr Pharm Des* 4, 277-90.

Goodnight, J. A., Mischak, H., Kolch, W., and Mushinski, J. F. (1995). Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J Biol Chem* 270, 9991-10001.

Gschwendt, M. (1999). Protein kinase C delta. *Eur J Biochem* 259, 555-64.

Gschwendt, M., Furstenberger, G., Leibersperger, H., Kittstein, W., Lindner, D., Rudolph, C., Barth, H., Kleinschroth, J., Marme, D., Schachtele, C., and et al. (1995). Lack of an effect of novel inhibitors with high specificity for protein kinase C on the action of the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate on mouse skin in vivo. *Carcinogenesis* 16, 107-11.

Gschwendt, M., Kielbassa, K., Kittstein, W., and Marks, F. (1994). Tyrosine phosphorylation and stimulation of protein kinase C delta from porcine spleen by src in vitro. Dependence on the activated state of protein kinase C delta. *FEBS Lett* 347, 85-9.

Gschwendt, M., Kittstein, W., and Marks, F. (1986). A novel type of phorbol ester-dependent protein phosphorylation in the particulate fraction of mouse epidermis. *Biochem Biophys Res Commun* 137, 766-74.

Gschwendt, M., Muller, H. J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G., and Marks, F. (1994). Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 93-8.

Guo, M., Toda, K., and Grinnell, F. (1990). Activation of human keratinocyte migration on type I collagen and fibronectin. *J Cell Sci* 96, 197-205.

Harrington, E. O., Loffler, J., Nelson, P. R., Kent, K. C., Simons, M., and Ware, J. A. (1997). Enhancement of migration by protein kinase Calpha and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase Cdelta in capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 272, 7390-7.

Harris, D., Reiss, N., and Naor, Z. (1997). Differential activation of protein kinase C delta and epsilon gene expression by gonadotropin-releasing hormone in alphaT3-1 cells. Autoregulation by protein kinase C. *J Biol Chem* 272, 13534-40.

Hasty & Bradley, (Ed.: A.L. Jooyner) gene targeting a practical approach, p1, 1993

Hasty, P., Rivera-Perez, J., and Bradley, A. (1991). The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11, 5586-91.

Hasty, P., Rivera-Perez, J., and Bradley, A. (1992). The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 12, 2464-74.

Hasty, P., Rivera-Perez, J., Chang, C., and Bradley, A. (1991). Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11, 4509-17.

- Hegemann, L., Bonnekoh, B., van Rooijen, L. A., and Mahrle, G. (1992). Anti-proliferative effects of protein kinase C inhibitors in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 4, 18-25.
- Hemler, M. E., Crouse, C., and Sonnenberg, A. (1989). Association of the VLA alpha 6 subunit with a novel protein. A possible alternative to the common VLA beta 1 subunit on certain cell lines. *J Biol Chem* 264, 6529-35.
- Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., and Yuspa, S. H. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19, 245-54.
- Herrada, G., and Dulac, C. (1997). A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell* 90, 763-73.
- Hodgkin, M. N., Pettitt, T. R., Martin, A., Michell, R. H., Pemberton, A. J., and Wakelam, M. J. (1998). Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem Sci* 23, 200-4.
- Holbrook K.A., ultrastructure of the epidermis, ed. Leigh I.M., Lane E.B., Watt F.M., the keratinocyte handbook, Cambridge university press, p.3, 1994
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., and Monk, M. (1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326, 292-5.
- Huang, X., Wu, J., Spong, S., and Sheppard, D. (1998). The integrin alphavbeta6 is critical for keratinocyte migration on both its known ligand, fibronectin, and on vitronectin. *J Cell Sci* 111, 2189-95.
- Huppi, K., Siwarski, D., Goodnight, J., and Mischak, H. (1994). Assignment of the protein kinase C delta polypeptide gene (PRKCD) to human chromosome 3 and mouse chromosome 14. *Genomics* 19, 161-2.
- Ishino, K., Ohba, M., Kashiwagi, M., Kawabe, S., Chida, K., and Kuroki, T. (1998). Phorbol ester-induced G1 arrest in BALB/MK-2 mouse keratinocytes is mediated by delta and eta isoforms of protein kinase C. *Jpn J Cancer Res* 89, 1126-33.
- Jiang, X., Naik, M. U., Hrabe, J., and Sacktor, T. C. (1994). Developmental expression of the protein kinase C family in rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 78, 291-5.
- Jideama, N. M., Noland, T. A., Jr., Raynor, R. L., Blobe, G. C., Fabbro, D., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Hannun, Y. A., and Kuo, J. F. (1996). Phosphorylation specificities of protein kinase C isozymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sites within these proteins and regulation of myofilament properties. *J Biol Chem* 271, 23277-83.
- Judd D.A. & Battista P.J., culture of human keratinocytes in defined serum free medium, focus, Vol. 19, No.1, p.1, 1997
- Kanashiro, C. A., and Khalil, R. A. (1998). Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25, 974-85.

Kaufman M.H., the atlas of mouse development, academic press, 1992

Kazanietz, M. G., Barchi, J. J., Jr., Omichinski, J. G., and Blumberg, P. M. (1995). Low affinity binding of phorbol esters to protein kinase C and its recombinant cysteine-rich region in the absence of phospholipids. *J Biol Chem* 270, 14679-84.

Keenan, C., and Kelleher, D. (1998). Protein kinase C and the cytoskeleton. *Cell Signal* 10, 225-32.

Keenan, C., Long, A., and Kelleher, D. (1997). Protein kinase C and T cell function. *Biochim Biophys Acta* 1358, 113-26.

Keverne, E. B. (1999). The vomeronasal organ. *Science* 286, 716-20.

Khwaja, A., and Tatton, L. (1999). Caspase-mediated proteolysis and activation of protein kinase Cdelta plays a central role in neutrophil apoptosis. *Blood* 94, 291-301.

Kim, H. M., Hirota, S., Chung, H. T., Onoue, H., Ito, A., Morii, E., Hirata, T., Ohno, S., Osada, S., Kitamura, Y., and et al. (1993). PKC gamma gene expression is delayed in postnatal central nervous system of mi/mi mice. *J Mol Neurosci* 4, 245-53.

Kim, H. M., Hirota, S., Onoue, H., Hirata, T., Suzuki, K., Ohno, S., Kuroki, T., Kitamura, Y., and Nomura, S. (1992). Localization and developmental expression of a novel protein kinase C delta gene. *Brain Res Dev Brain Res* 70, 239-44.

Kim, J. Y., Lee, Y. S., Park, J., and Chun, J. S. (1997). Integrin-mediated activation of mitogen-activated protein kinase is independent of the activation of protein kinase C epsilon during the spreading of HeLa cells on a gelatin substratum. *Mol Cells* 7, 594-8.

Kiss, Z. (1996). Regulation of phospholipase D by protein kinase C. *Chem Phys Lipids* 80, 81-102.

Krieger, J., and Breer, H. (1999). Olfactory reception in invertebrates. *Science* 286, 720-3.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.

Le, G. J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P., and Parker, P. J. (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281, 2042-5.

Lee, Y. S., Dlugosz, A. A., McKay, R., Dean, N. M., and Yuspa, S. H. (1997). Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C alpha in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes. *Mol Carcinog* 18, 44-53.

Leibersperger, H., Gschwendt, M., Gernold, M., and Marks, F. (1991). Immunological demonstration of a calcium-unresponsive protein kinase C of the delta-type in different species and murine tissues. Predominance in epidermis. *J Biol Chem* 266, 14778-84.

- Leitges, M., Schmedt, C., Guinamard, R., Davoust, J., Schaal, S., Stabel, S., and Tarakhovsky, A. (1996). Immunodeficiency in protein kinase cbeta-deficient mice. *Science* 273, 788-91.
- Lescher, B., Haenig, B., and Kispert, A. (1998). sFRP-2 is a target of the Wnt-4 signaling pathway in the developing metanephric kidney. *Dev Dyn* 213, 440-51.
- Li, W., Chen, X. H., Kelley, C. A., Alimandi, M., Zhang, J., Chen, Q., Bottaro, D. P., and Pierce, J. H. (1996). Identification of tyrosine 187 as a protein kinase C-delta phosphorylation site. *J Biol Chem* 271, 26404-9.
- Li, W., Jiang, Y. X., Zhang, J., Soon, L., Flechner, L., Kapoor, V., Pierce, J. H., and Wang, L. H. (1998). Protein kinase C-delta is an important signaling molecule in insulin-like growth factor I receptor-mediated cell transformation. *Mol Cell Biol* 18, 5888-98.
- Li, W., Zhang, J., Bottaro, D. P., and Pierce, J. H. (1997). Identification of serine 643 of protein kinase C-delta as an important autophosphorylation site for its enzymatic activity. *J Biol Chem* 272, 24550-5.
- Lin, X., Tombler, E., Nelson, P. J., Ross, M., and Gelman, I. H. (1996). A novel src- and ras-suppressed protein kinase C substrate associated with cytoskeletal architecture. *J Biol Chem* 271, 28430-8.
- Liyanage, M., Frith, D., Livneh, E., and Stabel, S. (1992). Protein kinase C group B members PKC-delta, -epsilon, -zeta and PKC-L(eta). Comparison of properties of recombinant proteins in vitro and in vivo. *Biochem J* 283, 781-7.
- Lonstein, J. S., Simmons, D. A., Swann, J. M., and Stern, J. M. (1998). Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. *Neuroscience* 82, 267-81.
- Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.
- Masson-Gadais, B., Salers, P., Bongrand, P., and Lissitzky, J. C. (1997). PKC regulation of microfilament network organization in keratinocytes defined by a pharmacological study with PKC activators and inhibitors. *Exp Cell Res* 236, 238-47.
- Matsunami, H., and Buck, L. B. (1997). A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 90, 775-84.
- Mellor, H., and Parker, P. J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 332, 281-92.
- mice, B. c. o. g. b. i. (1997). Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. Banbury Conference on genetic background in mice. *Neuron* 19, 755-9.
- Miettinen, S., Roivainen, R., Keinanen, R., Hokfelt, T., and Koistinaho, J. (1996). Specific induction of protein kinase C delta subspecies after transient middle cerebral artery occlusion in the rat brain: inhibition by MK-801. *J Neurosci* 16, 6236-45.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16, 1215.

- Mischak, H., Bodenteich, A., Kolch, W., Goodnight, J., Hofer, F., and Mushinski, J. F. (1991). Mouse protein kinase C-delta, the major isoform expressed in mouse hemopoietic cells: sequence of the cDNA, expression patterns, and characterization of the protein. *Biochemistry* 30, 7925-31.
- Mischak, H., Kolch, W., Goodnight, J., Davidson, W. F., Rapp, U., Rose-John, S., and Mushinski, J. F. (1991). Expression of protein kinase C genes in hemopoietic cells is cell-type- and B cell-differentiation stage specific. *J Immunol* 147, 3981-7.
- Morley S.M. & Lane E.B., the keratinocyte cytoskeleton, ed. Leigh I.M., Lane E.B., Watt F.M., the keratinocyte handbook, Cambridge university press, p.3, 1994
- Myat, M. M., Anderson, S., Allen, L. A., and Aderem, A. (1997). MARCKS regulates membrane ruffling and cell spreading. *Curr Biol* 7, 611-4.
- Newton, A. C., and Johnson, J. E. (1998). Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim Biophys Acta* 1376, 155-72.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-14.
- Nishizuka, Y. (1984). Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* 225, 1365-70.
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Nodder, S., and Martin, P. (1997). Wound healing in embryos: a review. *Anat Embryol* 195, 215-28.
- O'Toole, E. A., Marinkovich, M. P., Hoeffler, W. K., Furthmayr, H., and Woodley, D. T. (1997). Laminin-5 inhibits human keratinocyte migration. *Exp Cell Res* 233, 330-9.
- Ohba, M., Ishino, K., Kashiwagi, M., Kawabe, S., Chida, K., Huh, N. H., and Kuroki, T. (1998). Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the eta and delta isoforms of protein kinase C. *Mol Cell Biol* 18, 5199-207.
- Olson, M. F., Ashworth, A., and Hall, A. (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 269, 1270-2.
- Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kikkawa, U., Ogita, K., and Nishizuka, Y. (1988). Nucleotide sequences of cDNAs for alpha and gamma subspecies of rat brain protein kinase C. *Nucleic Acids Res* 16, 5199-200.
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., and Nishizuka, Y. (1987). Identification of three additional members of rat protein kinase C family: delta-, epsilon- and zeta-subspecies. *FEBS Lett* 226, 125-8.

- Osada, S., Hashimoto, Y., Nomura, S., Kohno, Y., Chida, K., Tajima, O., Kubo, K., Akimoto, K., Koizumi, H., Kitamura, Y., and et al. (1993). Predominant expression of nPKC ϵ , a Ca²⁺-independent isoform of protein kinase C in epithelial tissues, in association with epithelial differentiation. *Cell Growth Differ* 4, 167-75.
- Papaioannou V. & Johnson R., maintaining a targeted mutation, ed: Joyner A.L., gene targeting, oxford university press, 1994
- Parker, P. J., Stabel, S., and Waterfield, M. D. (1984). Purification to homogeneity of protein kinase C from bovine brain--identity with the phorbol ester receptor. *Embo J* 3, 953-9.
- Pritchard, C. A., Bolin, L., Slattery, R., Murray, R., and McMahon, M. (1996). Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol* 6, 614-7.
- Ramirez-Solis, R., Rivera-Perez, J., Wallace, J. D., Wims, M., Zheng, H., and Bradley, A. (1992). Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples. *Anal Biochem* 201, 331-5.
- Rhee, S. G. (1991). Inositol phospholipids-specific phospholipase C: interaction of the gamma 1 isoform with tyrosine kinase. *Trends Biochem Sci* 16, 297-301.
- Robb, L. (1997). Hematopoiesis: origin pinned down at last? *Curr Biol* 7, R10-2.
- Roberts R. (ed), the mouse: its reproduction and development, oxford university press, 1993
- Rozengurt, E. (1998). Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists. *J Cell Physiol* 177, 507-17.
- Rutberg, S. E., Saez, E., Glick, A., Dlugosz, A. A., Spiegelman, B. M., and Yuspa, S. H. (1996). Differentiation of mouse keratinocytes is accompanied by PKC-dependent changes in AP-1 proteins. *Oncogene* 13, 167-76.
- Saharinen, P., Ekman, N., Sarvas, K., Parker, P., Alitalo, K., and Silvennoinen, O. (1997). The Bmx tyrosine kinase induces activation of the Stat signaling pathway, which is specifically inhibited by protein kinase Cdelta. *Blood* 90, 4341-53.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (ed): molecular cloning – a laboratory manual; cold spring harbor laboratory press (1989)
- Sawai, H., Okazaki, T., Takeda, Y., Tashima, M., Sawada, H., Okuma, M., Kishi, S., Umehara, H., and Domae, N. (1997). Ceramide-induced translocation of protein kinase C-delta and -epsilon to the cytosol. Implications in apoptosis. *J Biol Chem* 272, 2452-8.
- Scheel-Toellner, D., Pilling, D., Akbar, A. N., Hardie, D., Lombardi, G., Salmon, M., and Lord, J. M. (1999). Inhibition of T cell apoptosis by IFN-beta rapidly reverses nuclear translocation of protein kinase C-delta. *Eur J Immunol* 29, 2603-12.
- Schmidt R.F. & Thews G. (ed.), Physiologie des Menschen, Springer Verlag, 1985

Schonwasser, D. C., Marais, R. M., Marshall, C. J., and Parker, P. J. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol* 18, 790-8.

Stabel, S., Schaap, D., and Parker, P. J. (1991). Expression of protein kinase C isoforms using baculovirus vectors. *Methods Enzymol* 200, 670-3.

Stabel, S. (1994). Protein kinase C--an enzyme and its relatives. *Semin Cancer Biol* 5, 277-84.

Stanwell, C., Denning, M. F., Rutberg, S. E., Cheng, C., Yuspa, S. H., and Dlugosz, A. A. (1996). Staurosporine induces a sequential program of mouse keratinocyte terminal differentiation through activation of PKC isoforms. *J Invest Dermatol* 106, 482-9.

Stanwell, C., Dlugosz, A. A., and Yuspa, S. H. (1996). Staurosporine induces a complete program of terminal differentiation in neoplastic mouse keratinocytes via activation of protein kinase C. *Carcinogenesis* 17, 1259-65.

Stempka, L., Schnolzer, M., Radke, S., Rincke, G., Marks, F., and Gschwendt, M. (1999). Requirements of protein kinase C δ for catalytic function. Role of glutamic acid 500 and autophosphorylation on serine 643. *J Biol Chem* 274, 8886-92.

Sudbeck, B. D., Parks, W. C., Welgus, H. G., and Pentland, A. P. (1994). Collagen-stimulated induction of keratinocyte collagenase is mediated via tyrosine kinase and protein kinase C activities. *J Biol Chem* 269, 30022-9.

Szallasi, Z., Denning, M. F., Chang, E. Y., Rivera, J., Yuspa, S. H., Lehel, C., Olah, Z., Anderson, W. B., and Blumberg, P. M. (1995). Development of a rapid approach to identification of tyrosine phosphorylation sites: application to PKC δ phosphorylated upon activation of the high affinity receptor for IgE in rat basophilic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 214, 888-94.

Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., and Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem* 252, 7603-9.

Thomas, K. R., and Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-12.

Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R. C., and et al. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269, 230-4.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.

Tremblay, P., Kessel, M., and Gruss, P. (1995). A transgenic neuroanatomical marker identifies cranial neural crest deficiencies associated with the Pax3 mutant *Spotch*. *Dev Biol* 171, 317-29.

- Tsika, R. W. (1994). Transgenic animal models. *Exerc Sport Sci Rev* 22, 361-88.
- Um, J. Y., Choi, B. M., Kim, J. S., Rim, J. S., Kim, H. M., and Chung, H. T. (1995). Expression of protein kinase C delta gene in germ cells. *J Urol* 154, 1237-40.
- Vaughan, P. F., Walker, J. H., and Peers, C. (1998). The regulation of neurotransmitter secretion by protein kinase C. *Mol Neurobiol* 18, 125-55.
- Volkov, Y., Long, A., and Kelleher, D. (1998). Inside the crawling T cell: leukocyte function-associated antigen-1 cross-linking is associated with microtubule-directed translocation of protein kinase C isoenzymes beta(I) and delta. *J Immunol* 161, 6487-95.
- Wang, F., Naik, U. P., Ehrlich, Y. H., Freyberg, Z., Osada, S., Ohno, S., Kuroki, T., Suzuki, K., and Kornecki, E. (1993). A new protein kinase C, nPKC eta', and nPKC theta are expressed in human platelets: involvement of nPKC eta' and nPKC theta in signal transduction stimulated by PAF. *Biochem Biophys Res Commun* 191, 240-6.
- Wang, X. J., Warren, B. S., Beltran, L. M., Fosmire, S. P., and DiGiovanni, J. (1993). Further identification of protein kinase C isozymes in mouse epidermis. *J Cancer Res Clin Oncol* 119, 279-87.
- Wasarman P.M. & Deamphilis M.L. (ed): METHODS IN ENZYMOLOGY, academic press, 1993
- Watanabe, T., Ono, Y., Taniyama, Y., Hazama, K., Igarashi, K., Ogita, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1992). Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10159-63.
- Watt F. & Hertle M.D., Keratinocyte adhesion, ed.: Leigh I.M., Lane E.B., Watt F.M., the keratinocyte handbook, cambridge universits press, p.153, 1994
- Watters, D., Garrone, B., Gobert, G., Williams, S., Gardiner, R., and Lavin, M. (1996). Bistratene A causes phosphorylation of talin and redistribution of actin microfilaments in fibroblasts: possible role for PKC-delta. *Exp Cell Res* 229, 327-35.
- Wetsel, W. C., Khan, W. A., Merchenthaler, I., Rivera, H., Halpern, A. E., Phung, H. M., Negro-Vilar, A., and Hannun, Y. A. (1992). Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol* 117, 121-33.
- Wilda M., Ghaffari-Tabrizi N., Baier G., Uterman G., Hameister H.; unique expression pattern of protein kinase C- θ in the nervous system; 13. Wissenschaftliche Tagung, Gesellschaft für Entwicklungsbiologie, p. 155, 1999
- Wilkinson, S. E., and Nixon, J. S. (1998). T-cell signal transduction and the role of protein kinase C. *Cell Mol Life Sci* 54, 1122-44.
- Wolf, B. B., Goldstein, J. C., Stennicke, H. R., Beere, H., Amarante-Mendes, G. P., Salvesen, G. S., and Green, D. R. (1999). Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood* 94, 1683-92.

Woods, A., and Couchman, J. R. (1992). Protein kinase C involvement in focal adhesion formation. *J Cell Sci* *101*, 277-90.

Wurst W. & Joyner A.L., production of targeted embryonic stem cell clones, ed. A.L. Joyner: gene targeting, IRL PRESS, p.33, 1994

Yuspa, S. H. (1998). The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis. *J Dermatol Sci* *17*, 1-7.

Zhang, G., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., and Hurley, J. H. (1995). Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell* *81*, 917-24.

Anmerkungen:

Die vorliegende Dissertation wurde in dem Zeitraum von August 1995 bis Juni 1996 im Max-Dellbrück-Laboratorium im Max-Planck-Institut in Köln unter der Anleitung von PD Dr. Silvia Stabel und von Juli 1996 bis Dezember 1999 im Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg unter der wissenschaftlichen Anleitung von Dr. Michael Leitges angefertigt.

Prof. Dr. Alexander Tarakovsky und Prof. Dr. Andreas Radbruch danke ich für die Bereitschaft die Betreuung bzw. das Koreferat meiner Promotion zu übernehmen.

Dr. Michael Leitges danke ich für die Generierung der chimären PKC- δ Mäuse durch Blastozysteninjektion aus den mutierten ES-Zellklonen und Prof. Dr. Alexander Tarakovsky für die Bereitstellung der Resultate aus der B-Lymphozyten-Analyse. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Beate Eckes und Dr. Hans Smola (Hautklinik der Universitätsklinik zu Köln, Abt. Prof. Krieg) bedanken für die hilfreiche Anleitung in den Wundheilungsexperimenten und fachlich kompetenten Auswertung des Präparats.

Mein Dank gilt den Kollegen der Arbeitsgruppe Susanne Etteldorf und Biggi Hammerschmidt für die nur kurze, aber gute Zusammenarbeit. Weiterhin möchte ich mich bei meinen Laborkollegen Dr. Andreas Kispert, Bénédicte Haenig und Birgit Lescher für das freundschaftliche Arbeitsklima sowie die immerwährende Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Michael Leitges ohne dessen unermüdliche Unterstützung und stets kritische Anmerkungen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meine Eltern und meinen Freunden für die Unterstützung und Geduld bedanken, wenn ich wieder mal keine Zeit hatte.

Erklärung:

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt habe, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen - , die anderen Werken in Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahren nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. A. Radbruch betreut worden.

