

Durchgeführt am

Heinrich-Pette-Institut (HPI)

für experimentelle Virologie und Immunologie, der Universität Hamburg
Abteilung für Tumorvirologie (Leiter Prof. Dr. W. Deppert)

Universitätsklinikum Ulm

Abteilung für Viszeral- und Transplantationschirurgie, der Universität Ulm
(Ärztliche Direktorin Fr. Prof. Dr. D. Henne-Bruns)

Betreuer: PD Dr. U. Knippschild

**Expression und Lokalisation
der Casein Kinase I delta (CKI δ)
in Organen der Maus**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Nadine Huber

aus Erbach i. Odw.

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am:

14. Juni 2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: PD Dr. U. Knippschild

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Fr. Dr. habil. A.-M. Bamberger / PD Dr. M. Jücker

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	7
1.1 Signaltransduktion	7
1.2 Proteinkinasegruppen	8
1.3 Die CKI Familie	8
1.4 Konsensussequenz und Substratspezifität	11
1.5 Regulation der CKI Expression und Aktivität	14
1.6 Funktionen von CKI	17
1.7 Beteiligung von CKI in der Entstehung von Krankheiten	22
2 PROBLEMSTELLUNG	26
3 MATERIAL UND METHODEN	28
3.1 Mausstamm	28
3.2 Bakterienstämme	28
3.3 Bakterieller Expressionsvektor	28
3.4 Antikörper/ Antiseren	28
3.4.1 CKI δ -spezifische Primärantikörper	29
3.4.2 Sonstige Seren	29
3.4.3 Enzymgekoppelte Sekundärantikörper	30
3.5 Enzymgekoppelte Konjugate	30
3.6 Chromogen-Substrate	31
3.7 Chemikalien	31
3.8 Arzneimittel	32
3.9 Radiochemikalien	32
3.10 Sonstige Materialien und Kits	32
3.11 Geräte	33

3.12	Arbeiten mit Bakterien	35
3.12.1	Bakterielle Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	35
3.13	Proteinbiochemische Methoden	36
3.13.1	Proteinbestimmung	36
3.13.2	Angleichen der Proteinkonzentration in den Zellysaten	36
3.13.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.13.4	Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue	37
3.13.5	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	37
3.13.6	Immundetektion (Western Blot-Analyse)	37
3.13.7	ECL-Reaktion	38
3.13.8	Proteinfractionierung durch FPLC	39
3.13.9	<i>In vitro</i> Kinasierung von Proteinen aus Zellextrakten	39
3.14	Immunhistochemische Methoden	40
3.14.1	Vorbereitung der Objektträger	40
3.14.2	Fixierung der Organe und Herstellung von Schnittpräparaten	40
3.14.3	Einbettung des Gewebes	42
3.14.4	Entparaffinieren der Schnittpräparate für HE-Färbungen und Immun-histochemie	43
3.14.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	43
3.14.6	Immunhistochemische Färbungen	44
3.14.6.1	Immunhistochemische Detektionsmethoden und Verdünnungsreihen	44
3.14.6.2	Immunhistochemie an Gefrierschnitten	45
3.14.6.3	Immunhistochemie an Paraffinschnitten	47
3.14.6.4	Spezifitätskontrollen	49
3.14.6.5	Beurteilung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte	50
4	ERGEBNISSE	51
4.1	Expressions- und Aktivitätsnachweis von CKIδ mittels Western Blot-Analysen und Kinaseassays	51
4.2	Expressionsnachweis von CKIδ in Gewebeschnitten der Maus	54
4.2.1	Nachweis der CKI δ Expression in Gefrierschnitten	54
4.2.2	Nachweis der CKI δ Expression in Paraffinschnitten	57
4.2.2.1	Optimierung der Antigenerkennung in Paraffin eingebettetem Gewebe	57
4.2.2.2	Kontrolle der Spezifität der angewandten Methode	61
4.2.2.3	Kontrolle der Spezifität der verwendeten Antikörper	63
4.2.3	Lokalisation von CKI δ in den verschiedenen Organen der Maus	65
4.2.3.1	CKI δ Expression in Geweben des Herz-Kreislauf-Systems sowie in den unteren Atemwegen	65
4.2.3.2	CKI δ Expression in den Organen des lymphatischen Systems	67
4.2.3.3	CKI δ Expression in den Anhangsdrüsen des Verdauungskanals	72
4.2.3.4	CKI δ Expression des Verdauungsapparates	76
4.2.3.5	CKI δ Expression in den Organen des Urogenital-Traktes	81
4.2.3.6	CKI δ Expression in den Endokrinen Drüsen	92
4.2.3.7	CKI δ Expression in den Zellen des Nervensystems	101
5	DISKUSSION	107
5.1	Expression und Aktivität von CKIδ in unterschiedlichen Organen	107
5.2	Immunhistologie	109
5.2.1	Einfluss der Fixierungsart und des Fixierungsmittels auf den Antigenerhalt von CKI δ	109

5.2.2	Spezifität der CKI δ Antikörper	111
5.3	Mögliche Rolle von CKI δ in der Immunabwehr	114
5.4	Mögliche Rolle von CKI δ in sekretorischen Prozessen	116
5.5	Mögliche Rolle von CKI δ in hormonellen Prozessen	117
5.6	Mögliche Rolle von CKI δ im neuronalen Informationsaustausch	118
5.7	Mögliche Rolle von CKI δ in Proliferations- und Differenzierungsprozessen	120
5.8	Zusammenfassende Schlussfolgerung	122
6	ZUSAMMENFASSUNG	123
7	LITERATURVERZEICHNIS	125
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	137
9	TABELLENVERZEICHNIS	139
10	ANHANG	140

Abkürzungsverzeichnis

- ABC-Methode Avidin-Biotin-Complex-Methode
- Abs_{xy} Absorption bei xy nm
- ACC Adenoid cystic carcinoma
- AEC 3-Amino-9-ethylcarbazol
- β-APP β-amyloid precursor protein
- APC Adenomatous polyposis coli
- APS Ammoniumpersulfat
- APUD amine precursor uptake and decarboxylation
- AS Aminosäure
- ATP Adenosintriphosphat
- Bcl2 B-cell lymphoma 2
- Bid BH3 Domäne – only death agonist protein
- BSA bovines Serumalbumin
- cAMP cyklisches Adenosinmonophosphat
- Caspase Cystein Protease mit Aspartat Spezifität
- cdk 5 cyclin abhängige Kinase 5
- CG-NAP/AKAP 450 Centrosomal and Golgi N-Kinase Anchoring Protein
- CK Casein Kinase
- c-myc zelluläres Homolog vom Avian myelocytomatosis Virus Onkogen
- CREM cAMP responsive element modulator
- CRY Cryptochrome 1
- C-Terminus Carboxyterminus
- DAB 3,3'-Diaminobenzidin
- DARPP-32 Dopamin und cAMP regulierendes Phosphoprotein, 32kDa
- DCIS duktales carcinoma in situ
- DHPG Dihydroxyphenylglycin
- DISC death inducible signaling complex
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- Dsh Dishevelled
- DSP-Syndrom delayed sleep phase Syndrom

• ECL	enhanced Chemoluminescence
• EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
• EGTA	Ethylen-Glycol bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
• EPSC	excitatory postsynaptic potential
• FADD	fas-associated protein with death domain
• FASPS	familiar advanced sleep phase Syndrom
• GS	Gefrierschnitt
• GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
• GST	Glutathione-S-transferase
• GTP	Guanintriphosphat
• HRP	horseredish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
• IgG	Immunglobulin G
• IHC-G	Immunhistochemie an Gefrierschnitten
• IHC-P	Immunhistochemie an Paraffinschnitten
• IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
• LB-Medium	Lauria-Bertani Medium
• LRP6	LDL related receptor protein 6
• LSAB-Methode	labeled Streptavidin-Biotin-Methode
• MDM2	murine double minute 2
• mGluR	metabotropische Glutamatrezeptor
• mGlu-Agonist	metabotropischer Glutamat-Agonist
• MTA1	metastasis-associated protein 1
• NCAM	neural cell adhesion molecule
• NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
• NFAT	nuclear factor of activated T-Cells
• NFT	neurofibrillary tangles
• NLS	nuclear localisation signal (Kernlokalisationsignal)
• N-Terminus	Aminoterminus
• PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
• PER	period circadian protein
• PDGF	platelet-derived growth factor
• PKC	Proteinkinase C
• PP	Phospho-Protein Phosphatase

-
- PS Paraffinschnitt
 - RNA Ribonukleinsäure
 - RT Raumtemperatur
 - SBF SCB-Bindungsfaktor
 - SCB Swi4/6-dependent cell-cycle box
 - SDS Natriumdodecylsulfat
 - Smad contraction of Sma and Mad
 - SNARE soluble N-ethylmaleimid attachment protein receptor
 - SV 40 Simian Virus 40
 - TGN Trans-Golgi Netzwerk
 - TBS Tris Base
 - TEMED N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin
 - TNF tumor necrosis factor (Tumornekrose Faktor)
 - Tris Trishydroxymethyl-aminomethan
 - TV Transkriptionsvarianten
 - upm Umdrehung pro Minute
 - v/v Volumenprozent
 - Wnt 1 wingless-type MMTV integration site family, 1
 - w/v Gewichtsprozent

1 Einleitung

1.1 **Signaltransduktion**

Die Fähigkeit eines vielzelligen Organismus auf extrazelluläre Signale zu reagieren, ist sowohl während der Embryonalentwicklung als auch für das Überleben im adulten Organismus, notwendig. Die Reaktionen des Organismus auf diese Reize werden durch Signaltransduktionswege reguliert, die eine Weiterleitung und einen Austausch von Informationen zwischen einzelnen Zellen oder innerhalb einer Zelle zwischen einzelnen Zellkompartimenten erlaubt. Außer von direkten Zell-Zell-Kontakten, erfolgt der Kontakt zu den Nachbarzellen und weiter entfernten Zellen über sogenannte Botenstoffe. Unabhängig der Natur dieser Signale, reagiert die Zielzelle über ein spezifisches Protein, einen sogenannten Rezeptor. Dieser bindet spezifisch das Signalmolekül und initiiert dann eine Antwort in der Zielzelle. In den meisten Fällen handelt es sich um sogenannte transmembranöse Rezeptoren, die ankommende Signale in das Innere der Zelle weiterleiten, eine Kaskade intrazellulärer Signale generieren und folglich das Verhalten der Zelle beeinflussen (Snyder et al., 1985). Somit ist es Zellen möglich auf einzelne oder spezielle Kombinationen von Signalmolekülen zu reagieren, um unter anderem Wachstums-, Differenzierungs- oder apoptotische Prozesse auszulösen.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden intensiv einzelne Signaltransduktionswege charakterisiert. Dies führte zur Identifikation beteiligter Signalkomponenten, die die Wahrnehmung und Verarbeitung von Signalen gewährleisten. Zu diesen Signalkomponenten wird ein System von Proteinen gezählt, zu denen Zelloberflächen-Rezeptoren und intrazelluläre Rezeptorproteine gehören, wie auch Proteinkinasen und -phosphatasen, GTP-bindende Proteine sowie eine Vielzahl mit diesen Signalüberträgern wechselwirkende intrazelluläre Proteine. Zudem führte die Charakterisierung einzelner Signaltransduktionswege zu der Erkenntnis, dass diese nicht als isoliert betrachtet werden können, sondern auf verschiedenen Ebenen untereinander verknüpft sind, so dass letztlich ein sehr komplexes Signalnetzwerk entsteht.

Proteinkinasen und Proteinphosphatasen ermöglichen über die reversible Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen eine schnelle intrazelluläre Signaltransduktion durch

die kurzfristige Modulation der Aktivität, Stabilität und subzellulären Lokalisation von Proteinen, sowie deren Fähigkeit mit anderen Proteinen zu interagieren.

1.2 Proteinkinasegruppen

Eine Schlüsselposition bei der Regulation zellulärer Vorgänge wird der reversiblen Phosphorylierung von Proteinen zugesprochen (Cohen, 2002), welche durch sogenannte Proteinkinasen gewährleistet wird. Ungefähr 30% aller humanen intrazellulären Proteine sind phosphoryliert, und von 30.000 bis 40.000 Genen des menschlichen Genoms entfallen 518 auf Proteinkinasen oder Gene putativer Kinasen. Von diesen 518 Kinasen gehören jedoch nur ca. 90 Kinasen zu der Gruppe der Tyrosinkinase. Die Mehrheit der zellulären Proteinkinasen wird zur Gruppe der Serin/Threonin Kinasen gezählt (Lander et al., 2001; Manning et al., 2002).

Die Casein Kinase I (CKI) und Casein kinase II (CKII) sind 2 Familien von heterologen Serin/Threonin Kinasen, die das Phosphoprotein Casein *in vitro* als Substrat bevorzugen. Casein zählt nicht zu den physiologischen Substraten dieser Kinasen, sondern spiegelt die Eigenschaft dieser Kinasen wieder, dass sie Serine und Threonine erkennen, die eher durch benachbarte saure und/oder phosphorylierte Aminosäuren gekennzeichnet sind, als durch die Nachbarschaft von basischen Resten oder Prolyl-Seitenketten (Brunati et al., 2000). Während die Casein Kinase II aufgrund großer Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne der Gruppe der CMGC (Cdk, MAPK, GSK3, CKII) Proteinkinasen zugeordnet werden, stellen die Casein Kinasen I eine eigenständige phylogenetische Familie von hochkonservierten, monomeren, Second-Messenger-unabhängigen Proteinkinasen dar, die ATP, nicht aber GTP, als Kofaktor für den Phosphattransfer verwenden (siehe **Abbildung 1**).

1.3 Die CKI Familie

CKI kommt in allen eukaryontischen Zellen vor und ist von den Hefen bis zu den Säugetieren hoch konserviert (Gross und Anderson, 1998).

Bei den Säugetieren sind bisher sieben genetisch unabhängig voneinander kodierte CKI Isoformen (α , β , γ_1 , γ_2 , γ_3 , δ und ϵ) (Fish et al., 1995; Graves et al., 1993; Rowles et al., 1991; Wang et al., 1996; Zhai et al., 1995) charakterisiert worden. Zudem konnten Spleißvarianten für die Isoformen CKI α , CKI γ_3 und CKI ϵ charakterisiert werden (Green und Bennett, 1998; Rowles et al., 1991; Takano et al., 2004; Tapia et al., 1994; Wang et al., 1996; Zhang et al., 1996).

Sequenzanalysen führten sowohl in der Sproßhefe *Saccharomyces cerevisiae* als auch in *Schizosaccharomyces pombe* zur Identifikation CKI homologer Proteinkinasen. Zu diesen zählen sowohl Hrr25, Yck1, Yck2 und Yck3 (*S.cerevisiae*), als auch Cki1, Cki2, Cki3, Hhp1 und Hhp2 (*S.pombe*) (DeMaggio et al., 1992; Dhillon und Hoekstra, 1994; Hoekstra et al., 1991; Kearney et al., 1994; Robinson et al., 1992; Wang et al., 1992). Die Phylogenie der verschiedenen Isoformen ist in **Abbildung 1** dargestellt.

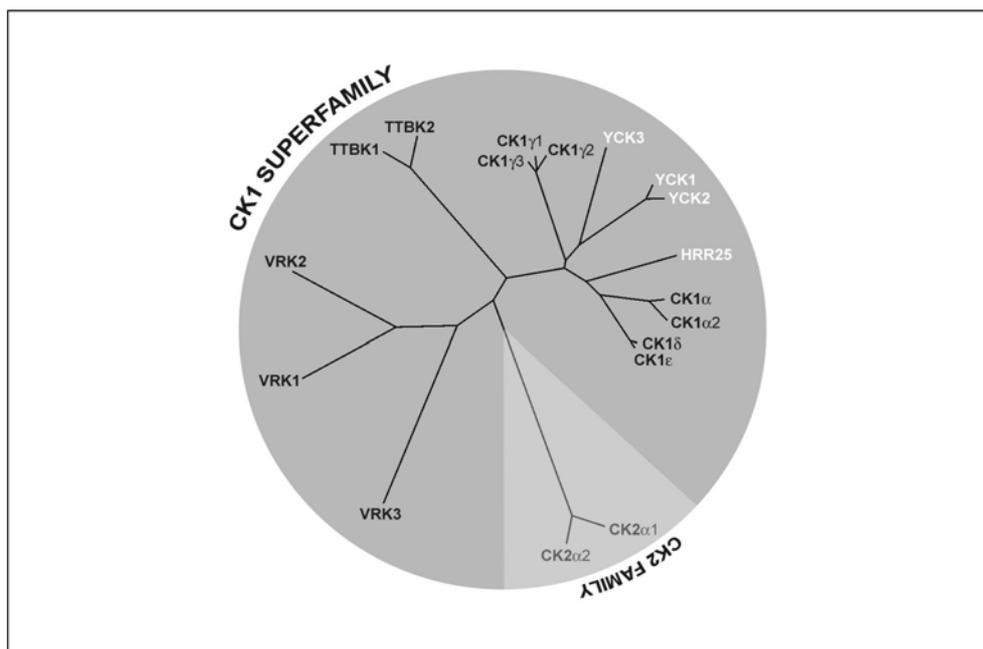


Abbildung 1: Phylogenetische Beziehung der CKI Isoformen aus *Saccharomyces cerevisiae* und Mammalia und deren Beziehung zu anderen humanen Casein Kinasen. Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehung der CKI Familie als phylogenetischer Baum, in dem die Länge der Äste ein Maß für den Verwandtschaftsgrad der Kinasedomänen der einzelnen Isoformen ist. Der phylogenetische Stammbaum wurde durch Sequenzanalysen der Kinasen unter Verwendung des Programms CLUSTAL x 1.83 und Tree View 1.6.6 erstellt. Dargestellt sind die homologen Proteine von *S. cerevisiae* (YCK1-3 und Hrr25; in Weiß) von *Homo sapiens* (CKI α , γ 1-3 und CKI δ) sowie von anderen Mitgliedern der humanen CKI Familie (TTBK1-2, VRK1-3). Mitabgebildet die beiden Isoformen der CKII-Familie (CK2 α 1-2). (zur Übersicht siehe: (Manning et al., 2002)).

Die Aminosäuresequenzen innerhalb der katalytischen Domänen der einzelnen CKI Isoformen sind zwischen 53% und 97% homolog, die Sequenzidentität anderer

Serin/Threonin Kinasen liegt hingegen bei weniger als 25%. Zwischen den beiden Isoformen CKI δ und CKI ϵ besteht die engste Verwandtschaft, da sie zu 97% homolog in der Kinasedomäne und zu 53% im C-Terminus sind. Mit CKI α ist CKI δ zu 76% identisch, und auch zu Hrr25 und Hhp1 aus der Hefe weist CKI δ noch 66% bzw. 78% Homologie in der Kinasedomäne auf (Graves et al., 1993; Zhai et al., 1995).

Alle CKI Isoformen besitzen eine zentral gelegene, in ihrer Aminosäuresequenz konservierte Kinasedomäne, die von einem kurzen variablen N-Terminus und einem längeren variablen C-Terminus flankiert wird (siehe **Abbildung 2**).

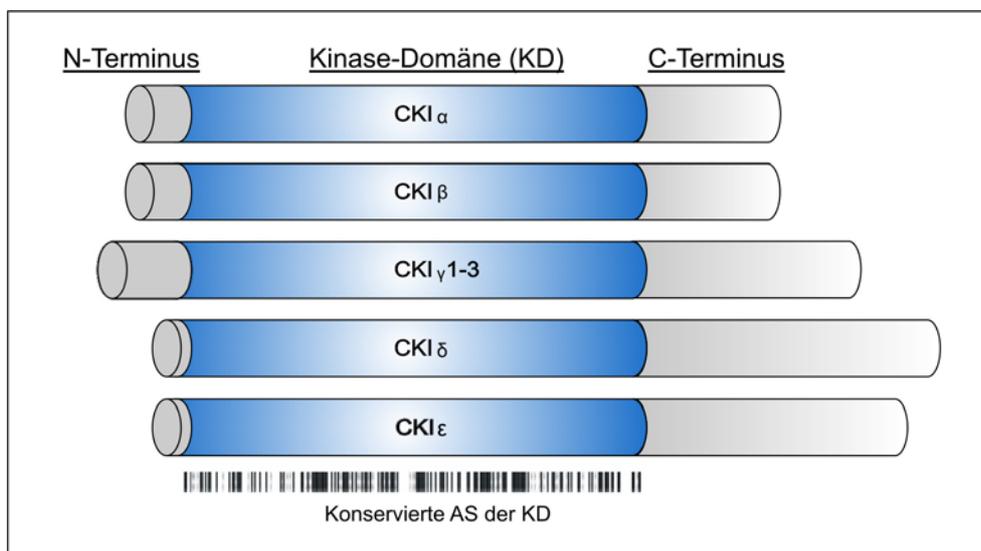


Abbildung 2: Schematische Darstellung der CK1 Isoformen der Säuger. Die grauen Boxen kennzeichnen die variablen N- bzw. C-Termini. Die Kinasedomäne ist blau dargestellt (nach: (Gross und Anderson, 1998)).

Der N-Terminus umfasst 9-76 Aminosäuren, die unterschiedliche Länge des C-Terminus variiert von 24 Aminosäuren bis hin zu über 200 Aminosäuren (Cegielska et al., 1998). Aufgrund der Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz resultiert auch, dass das Molekulargewicht der verschiedenen Isoformen bei Mammalia zwischen 37 kDa (CKI α) und 51 kDa (CKI γ 3) divergiert. Die CKI Isoformen der Hefen sind insgesamt etwas größer als ihre Homologe in Mammalia, mit Molekulargewichten zwischen 42 kDa (Hhp1 und Hhp2) und 62 kDa (Hrr25).

Die funktionellen Domänen der tierischen CKI Isoformen sind am Beispiel von CKI δ aus *Rattus norvegicus* in **Abbildung 3** dargestellt. Diese Isoform umfasst 428 Aminosäuren und weist eine molekulare Masse von 49 kDa auf (Graves et al., 1993). Mit 293 Aminosäuren

nimmt die Kinasedomäne den größten Teil des Proteins ein. Die Kinasedomäne enthält neben Glycin-reichen Sequenzen, die an der ATP-Bindung beteiligt sind (Xu et al., 1995), eine Kinesin-homologe Domäne (KHD) (Roof et al., 1992; Xu et al., 1995), die bei den Motorproteinen der Kinesin-Familie wichtig für die Interaktion mit dem Mikrotubulinnetzwerk der Zelle ist. Die Kinesin-homologe Domäne könnte es demnach auch CKI δ ermöglichen, an Mikrotubuli zu binden und so in Wechselwirkung mit dem Zytoskelett zu treten, was durch die Tatsache untermauert wird, dass CKI δ als Mikrotubuli-assoziierte Kinase beschrieben wurde (Behrend et al., 2000). Weiterhin befindet sich innerhalb der Kinasedomäne eine putative Kernlokalisationssequenz (NLS), die homolog zu der des großen T-Antigens des Simian Virus 40 (SV40) ist (Rowles et al., 1991; Tuazon und Traugh, 1991; Zhai et al., 1995). Diese NLS scheint allerdings nicht ausreichend für den Kerntransport zu sein, da bei CKI α nur Spleißvarianten mit einem L-Fragment, das ein putatives NLS Peptid aufweist, im Kern lokalisieren (Fu et al., 2001).

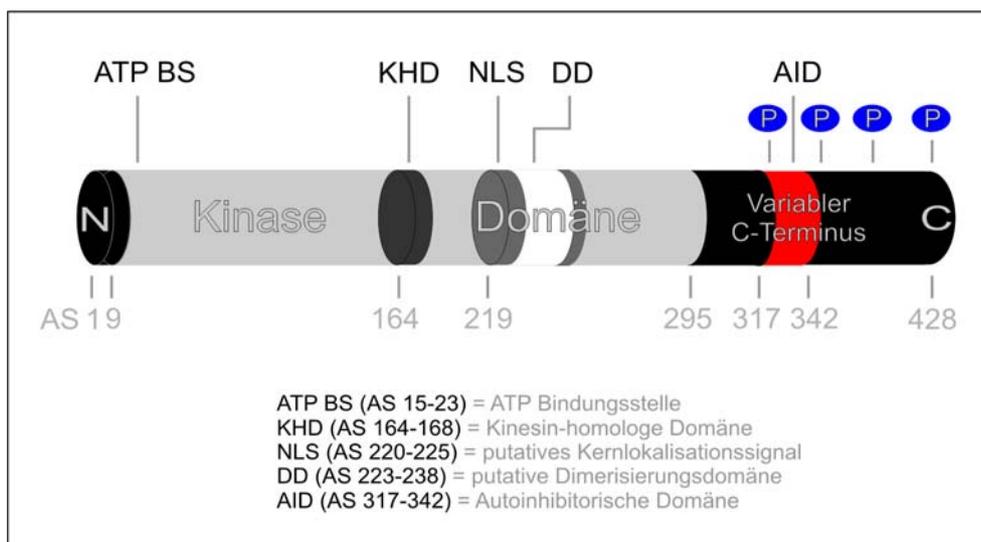


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von CKI δ (*Rattus Norvegicus*). Kinasedomäne (grau), variable N- und C-Termini (schwarz), P: potentielle Autophosphorylierungsstellen (blau).

1.4 Konsensussequenz und Substratspezifität

Die Konzentration positiver Ladungen um die Substratbindungsstelle der Kinasedomäne liefert eine Erklärung für die Selektivität für saure Substrate in der azidotropen Proteinkinase-Familie CKI (Longenecker et al., 1996). Das Motiv S/T(P)-X₁₋₂-S/T stellt die kanonische Konsensussequenz für CKI dar, in dem S/T(P) für einen phosphorylierten Serin- oder Threoninrest und X für eine beliebige Aminosäure steht. Jedoch konnte gezeigt werden,

dass diese Konsensussequenz mit prephosphorylierten Resten nicht immer benötigt wird um eine effiziente und affinitätsbezogene Phosphorylierung durch CKI zu bewirken. Eine Ansammlung negativ geladener Aminosäurereste an Position n-3 oder n-4 in Bezug auf den zu phosphorylierenden Aminosäurerest, kann das Phosphoserin oder Phosphothreonin in diesem Motiv ersetzen (Agostinis et al., 1989; Flotow und Roach, 1991; Graves et al., 1993). Für die Phosphorylierung von DARPP-32 (dopamine-and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa) (Desdouits et al., 1995) und des Protein-Phosphatase 1 Inhibitors-2 (Marin et al., 1994) durch CKI konnte gezeigt werden, dass Ansammlungen von Aspartat- und/oder Glutamat-Resten in der Lage sind als spezifische Determinanten zu agieren. Die aus Studien mit Peptidsubstraten abgeleitete optimale Konsensussequenz EFDTGSIIFF von CKI δ weist ebenfalls eine solche Ansammlung von negativer Ladung in Kombination mit einem Isoleucin an der +1 Position auf (Songyang et al., 1996). Die *in vivo* phosphorylierten CKI Substrate β -Catenin und NFAT besitzen mit dem SLS-Motiv ein nicht-kanonisches Konsensus-Motiv, das in Kombination mit einer Anhäufung saurer Aminosäurereste C-terminal von der Phosphoakzeptor-Stelle durch CKI erkannt wird (Marin et al., 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung eines Substrates durch CKI nicht streng der Konsensussequenz unterliegt, sondern dass die Phosphorylierung auch von der Tertiärstruktur des Substrates abhängig ist (Cegielska et al., 1998).

Inzwischen ist eine große Anzahl von Proteinen als Substrate von CKI identifiziert worden. Die Vielfalt von CKI Substraten schließt verschiedene funktionelle Gruppen von intrazellulären Proteinen, wie Enzyme, Transkriptionsfaktoren, virale Onkogene, Proteine des Zytoskeletts, Membran-assoziierte Proteine und Rezeptoren ein, wie aus **Tabelle 1** ersichtlich ist (aus: (Knippschild et al., 2005)). Dies lässt darauf schließen, dass Mitglieder der CKI Familie an diversen zellulären Prozessen beteiligt sind. Allerdings steht die Klärung der physiologischen Relevanz der beobachteten Phosphorylierungen durch CKI bei vielen Substraten noch aus.

In vitro Studien mit Peptidsubstraten und verschiedenen CKI Isoformen haben hinsichtlich der bevorzugten Konsensussequenz, zwischen den einzelnen Isoformen keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt (Pulgar et al., 1999). Dennoch zeigen einzelne Mitglieder dieser ubiquitären Kinase-Familie eine breite Variabilität in ihrer Funktion und Substratspezifität. Neueste Studien konnten einen Aufschluss über die strukturellen Merkmale geben, die die besondere Substratspezifität von CKI α bedingen. So wird für die humanen CKI α Aminosäuren Arg¹⁸⁶ und Lys²³² eine Rolle in der Erkennung kanonischer Substrate postuliert

(Bustos et al., 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass während die Erkennung kanonischer Motive durch identische strukturelle Elemente bedingt ist, die Zielgruppe der nicht-kanonischen Motive, deren diese Merkmale fehlen, nicht an den selben Mechanismus gebunden sind.

Funktionelle Gruppen	CKI Substrate
Proteine des Zytoskeletts und Interaktions-Proteine	Myosin, Troponin, Ankyrin, Spektrin 3, Filamin, Vinculin, neurofilamentäre Proteine, Dynein, α -/ β - Tubulin, MAP4, Stathmin, Tau, Keratin 17, Desmolein, Annexin II, Centaurin-alpha (p42IP4)
Adhäsionsfaktoren	NCAM
Rezeptoren	β -Untereinheit des Insulin-Rezeptors, TNF α -Rezeptor, Muscarin M3-Rezeptor, Ste2p (α -Faktor-Rezeptor), Step3p (α -Faktor-Rezeptor), PDGF Rezeptor, Retinoid X Rezeptor LRP6 (Davidson et al., 2005; Zeng et al., 2005)
Membrantransporter	Erythrozyten-Anionen-Transporter Uracil-Permease (<i>S.cervisiae</i>)
DNA-assoziierte Faktoren	Non-Histon Chromatin-Proteine
Ribosomale Proteine	15kDa, 20 kDa, 35 kDa, L4, L8, L13
Transkriptions- und Splice Faktoren	RNA-Polymersae I und II, p53, CREM, Swi6, NFAT, SR-Proteine, Tcf3, BMAL1, CRY, β -Catenin, Armadillo
Translationsfaktoren	IF 4B, 4E, 5
Virale Proteine	SV40 T-Ag
Kinasen und Phosphatasen	cdk5, PKC
Inhibitoren und Modulatoren	Inhibitor 2 von PPA 1, DARPP-32, I κ B α ; Dishevelled, 14-3-3 Proteine, mPER, APC, bid, CPI-17
Metabolische Enzyme	Acetyl-CoA Carboxylase, Glycogen-Synthase
Vesikel-assoziierte Proteine	SV2, β 3A-, β 3B Untereinheit des AP-3 Komplexes
Rezeptor-assoziierte Proteine	FADD(Alappat et al., 2005)
Regulator Proteine	Mdm2 (Winter et al., 2004), Mdmx (Chen et al., 2005)
Faktoren der Alzheimer Erkrankung	Presinilin-2, β -Sekretase, Tau
Metastatische Tumor-Antigene	MTA1s (Metastatic Tumor Antigen 1, short form)
Signaltransduktions Moleküle	Smad 1-3 und 5

Tabelle 1: In der Literatur beschriebene *in vitro* und *in vivo* Substrate der CKI-Familie (aus:(Knippschild et al., 2005))

1.5 Regulation der CKI Expression und Aktivität

Mitglieder der CKI Familie wurden als konstitutiv aktive Enzyme beschrieben, die aus verschiedenen Organismen, Geweben und Zelllinien immer im aktiven Zustand isoliert werden können (Tuazon und Traugh, 1991). Ungeachtet dieser Tatsache konnte eine Anzahl von Regulationsmechanismen identifiziert werden, die *in vitro*, aber auch *in vivo* die Aktivität von CKI beeinflussen. Eine Steigerung der Aktivität von CKI wird zum Beispiel nach direkter Stimulation von Zellen durch Hormone wie Insulin (Cobb und Rosen, 1983) oder nach viraler Transformation (Elias et al., 1981) beobachtet. Die Behandlung von Zellen mit Topoisomerase-Inhibitoren löst ebenfalls eine Erhöhung des Gehaltes an CKI δ -mRNA und CKI δ -Protein aus (Knippschild et al., 1997).

Die Regulation der CKI Aktivität durch posttranslationale Modifikation wird in erster Linie durch Phosphorylierung vermittelt. Sowohl die intramolekulare Autophosphorylierung, die für eine Reihe von CKI Isoformen nachgewiesen wurde, als auch die Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen, scheinen *in vivo* Mechanismen zu sein, um die Aktivität von CKI zu regulieren. Es konnte gezeigt werden, dass bei den Isoformen CKI δ und ϵ im C-Terminus nach Autophosphorylierung Sequenzen der Art T(P)/S(P)-XXJ entstehen, in der J jede Aminosäure außer Serin und Threonin darstellt. Derartig phosphorylierte Bereiche wirken möglicherweise als Pseudosubstrate und blockieren so das katalytische Zentrum, was sich inhibitorisch auf die Kinaseaktivität auswirkt (Gietzen und Virshup, 1999; Rivers et al., 1998). Es sind jedoch Mechanismen beschrieben worden, die den inhibitorischen Effekt der Autophosphorylierung überwinden können. So konnte durch proteolytische Abspaltung des C-Terminus eine 2 bis 3-fache Aktivitätssteigerung der Kinasen *in vitro* festgestellt werden, was darauf zurückzuführen ist, dass die Abspaltung des C-Terminus die Entfernung der autoinhibitorischen Domäne bewirkt (Carmel et al., 1994; Cegielska et al., 1998). Zudem wirkt sich die proteolytische Abspaltung des C-Terminus auf die Wirkung von Phosphatasen und somit auf die Aktivität von CKI aus. Phosphatasen können eine derart rekombinante, C-terminal verkürzte Mutante nicht weiter in ihrer Aktivität beeinflussen. Eine Behandlung von CKI ϵ mit Phosphatasen führt zu einer 5 bis 20-fachen Aktivitätssteigerung dieser Kinase, wohingegen die Behandlung von CKI ϵ mit dem trunkierten C-Terminus lediglich eine 2-fache Aktivitätssteigerung bewirkt (Cegielska et al., 1998). Dementsprechend stellt die Dephosphorylierung durch Phosphatasen ein weiteres Regulationselement für die Aktivität von CKI δ und CKI ϵ dar (Rivers et al., 1998). So konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von CKI ϵ *in vitro* mit verschiedenen Serin/Threonin-spezifischen Phosphatasen

wie PP1, PP2A und PP2B (Calcineurin) einen beachtlichen Anstieg in ihrer Kinaseaktivität bewirkt (Cegielska et al., 1998; Gietzen und Virshup, 1999; Lowrey et al., 2000). Die Dephosphorylierung der Isoformen CKI δ und CKI γ durch die katalytische Untereinheit von PP1 *in vitro* resultiert ebenfalls in einer Enzymaktivierung dieser Isoformen (Graves und Roach, 1995).

Über die Cdk5 und CKI Aktionen im Zentralnervensystem gibt es einige Veröffentlichungen, jedoch konnte erst in jüngster Zeit eine Regulation dieser beiden Kinasen über First-Messenger nachgewiesen werden. So wurde von Liu et al. (Liu et al., 2001) eine Regulation dieser Kinasen über den metabotropischen Glutamat Agonist 3,5-Dihydroxyphenylglycin (DHPG) beschrieben. Diese Ergebnisse indizieren, dass sowohl die Cdk5 (Cyclin-dependent kinase 5) als auch die CKI Aktivität über metabotropische Glutamatrezeptoren (mGluRs) in neostriatalen Neuronen reguliert werden und dass die Aktivierung von Cdk5 durch DHPG, die Aktivität von CKI benötigt. Weiterhin wurde nach DHPG-Behandlung von akut dissoziierten Neuronen eine Verstärkung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanälen festgestellt, was auf eine Beteiligung der CKI-Cdk5-DARPP-32 Kaskade in der Regulation von mGlu-Agonisten auf Calciumkanäle schließen lässt. Zudem konnte gezeigt werden, dass DHPG CKI ϵ über eine Calcium-abhängige Stimulation von Calcineurin aktiviert und somit zu einer subsequenten Dephosphorylierung der inhibitorischen C-terminalen Autophosphorylierungsregion führt (Liu et al., 2002b).

Einen weiteren Aspekt für mögliche Regulationsmechanismen lieferte die dreidimensionale Struktur von CKI δ . Mit Hilfe der Röntgenkristallographie wurde die Struktur der C-terminal verkürzten CKI Mitglieder Cki Δ 298 aus *S.pombe* (Xu et al., 1995) und CKI δ Δ 317 bzw. CKI δ Δ 346 aus Säugern aufgeklärt (Longenecker et al., 1996; Longenecker et al., 1998). Aus diesen kristallographischen Daten wurde abgeleitet, dass CKI δ als Dimer kristallisiert (Longenecker et al., 1998). Dabei scheinen die spezifischen intramolekularen Kontakte im Bereich der Dimerisierungsdomäne (DD) zu einem Verschluss der Adenin-Bindungstasche und damit zum Ausschluss von ATP aus dem aktiven Zentrum zu führen. Demnach könnte die Homodimerbindung *in vivo* möglicherweise inhibitorisch auf die Aktivität von CKI δ wirken (Longenecker et al., 1998). Jedoch existieren bisher keine biochemischen Studien, die dieses Model bestätigen.

Die Sequestrierung von CKI an intrazelluläre Strukturen oder Proteinkomplexe stellt ein Mittel dar, um die Kinasen mit einem lokalen Pool von Substraten oder Modulatoren

zusammenzubringen. CKI δ und CKI ϵ werden über das Matrix-Protein CG-NAP/AKAP450 (Centrosomal and Golgi N-Kinase Anchoring Protein) an das Zentrosom rekrutiert (Sillibourne et al., 2002). Zudem konnte eine tageszeitlich regulierte nukleäre Lokalisation von CKI δ und CKI ϵ durch Untersuchungen zum zirkadianen Rhythmus in Mäusen nachgewiesen werden. Diese nukleäre Lokalisation ist bedingt durch die Assoziation mit den unter zirkadianer Kontrolle exprimierten und nukleär akkumulierenden „clock“-Proteinen mPER1, mPER2, mCRY1 und mCRY2 (Lee et al., 2001). Der Kernimport von mPER1, mPER2, mCRY1 und mCRY2 führt zur Einleitung eines negativen Rückkopplungsmechanismus, der die Expression dieser Proteine über die Inaktivierung des konstitutiv DNA-gebundenen Transkriptionsfaktor-Komplexes BMAL1-CLOCK inhibiert (Kume et al., 1999). CKI ϵ kann infolge der nukleären Akkumulation BMAL1 phosphorylieren, ein Vorgang der sich stimulatorisch auf die Aktivität von BMAL1 auswirkt (Eide et al., 2002). Ein weiteres Beispiel für die Positionierung von Substraten und CKI Isoformen in Multiprotein-Komplexen ist für CKI ϵ im Wnt-Pathway beschrieben worden. Die Bindung von CKI ϵ über das Matrix-Protein Axin an den Axin-APC- β -Catenin-Komplex, führt zur Axin-abhängigen Phosphorylierung von APC und β -Catenin durch CKI ϵ (Rubinfeld et al., 2001; Sakanaka, 2002).

Das Vorhandensein bzw. die Erreichbarkeit von Substraten kann auch auf der Ebene der subzellulären Kompartimentierung reguliert werden. Die Funktion von CKI ist eng mit ihrer intrazellulären Lokalisation verknüpft, dieser Aspekt ist vor allem bei den CKI-Homologen der Hefe sehr gut untersucht. Dort sind einige Isoformen (Yck1, Yck2, Yck3, Cki1, Cki2) über einen Isoprenylrest in der inneren Zytoplasmamembran verankert (Wang et al., 1992), während sich die Isoform Hrr25 im Zellkern befindet, in den sie wahrscheinlich über ihr Kerntransportsignal gebracht wird. Mutationen in der Isoprenylierungsstelle bzw. im Kerntransportsignal bewirken sowohl eine Veränderung der Lokalisation als auch einen Funktionsverlust dieser Kinasen (Ho et al., 1997; Vancura et al., 1994; Wang et al., 1996). Zudem konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Hrr25, in dessen Sequenz eine C-terminale Isoprenylierungsstelle eingefügt wurde, Nullmutanten von Yck1 und Yck2 komplementieren kann (Wang et al., 1996), was bedeuten würde, dass die subzelluläre Lokalisation in diesem Fall sowohl notwendig als auch ausreichend für die Definition von Yck1 und Yck2 ist. Die subzelluläre Lokalisation, welche sich Zellzyklus-abhängig verändert, ist bei den höheren Eukaryonten vor allem bei der Isoform CKI α gut untersucht. In der Interphase lässt sich CKI α in Teilen des Endoplasmatischen Retikulums (ER), des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) und in Vesikeln nachweisen (Gross et al., 1995),

wohingegen sie in der Mitose am Spindelapparat und an den Zentrosomen lokalisiert (Brockman et al., 1992). Durch eine derartige zeitliche und räumliche Regulation kann eine Kinase spezifisch mit bestimmten Substraten in Kontakt gebracht werden. Zumindest für CKI δ konnte gezeigt werden, dass nicht nur das Vorhandensein der Kinasedomäne selbst, sondern auch die katalytische Aktivität essentiell für die normale subzelluläre Lokalisation der Kinase ist (Milne et al., 2001).

1.6 Funktionen von CKI

Am besten charakterisiert sind die Funktionen der CKI-Homologen der Hefen. So wird ihnen eine Beteiligung bei der Regulation von Membran-Transportprozessen (Murakami et al., 1999; Panek et al., 1997), des vegetativen Wachstums und der Zytokinese (Robinson et al., 1993) als auch im Vesikeltransport (Vancura et al., 1994; Wang et al., 1996) zugesprochen. Obwohl die Funktionen von CKI in Membran-Transportprozessen in höheren Eukaryonten noch nicht im Detail geklärt sind, konnte dennoch für die Isoformen CKI α und CKI δ eine Interaktion mit Membranstrukturen des endoplasmatischen Retikulums (ER), des Golgi-Apparates (Gross et al., 1995; Milne et al., 2001) und/oder dem Trans-Golgi Netzwerks (TGN) (Behrend et al., 2000) sowie verschiedenen Transportvesikeln (Dubois et al., 2001; Faundez und Kelly, 2000; Yu und Roth, 2002) gezeigt werden. Weiterhin wurden die Mitglieder der CKI Familie mit dem SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor)-Komplex in Verbindung gebracht, da diese in der Lage sind, verschiedene Proteine dieses Komplexes in neuronalen Zellen zu phosphorylieren (Dubois et al., 2002). Diese Phosphorylierung von SNARE-assoziierten Proteinen spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Protein-Protein Interaktionen und der synaptischen Vesikel-Exozytose (Lin und Scheller, 2000; Pyle et al., 2000; Shuang et al., 1998; Turner et al., 1999).

Die physiologische Rolle, die CKI in striatalen Neuronen und in der Glutamat-vermittelten Aktivität wahrnimmt, ist bisher noch nicht bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Kaskade, die Glutamat/mGluR1/CK1/PP1 oder PP2_A involviert, eine Hauptrolle in der Regulation von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor-vermittelten synaptischen Übertragung im Gehirn spielt (Chergui et al., 2005). Die Inhibition von CKI führt zu einer Erhöhung der NMDA-Rezeptor-Aktivität sowie des Phosphorylierungslevels durch eine Hemmung von PP1 oder PP2_A. Zudem konnte gezeigt werden, dass mGluR1 die NMDA-

vermittelten EPSCs (excitatory postsynaptic potentials) durch eine Kalzium-abhängige Aktivierung von CKI und PP1 oder PP2_A herunterreguliert (Chergui et al., 2005). Somit könnte CKI als negativer Regulator in der Glutamat-induzierten neuronalen Erregung fungieren. Durch die zentrale Rolle der NMDA-Rezeptoren in einigen physiologischen und pathologischen Prozessen des Striatums und des ZNS könnte CKI ein wichtiges regulatorisches Enzym in normalen Zuständen, wie Bewegung und motivations-abhängiges Verhalten, darstellen (Chergui et al., 2005). Eine weitere wesentliche Funktion von CKI könnte darin liegen, dass CKI eine überschießende Aktion der NMDA-Rezeptoren verhindern könnte, denen eine exzessive glutamerge Aktivität zugeschrieben wird, von welcher wiederum bekannt ist, dass sie zu einem neuronalen Absterben führt (Hardingham und Bading, 2003). Des weiteren konnte im Neostriatum gezeigt werden, dass CKI in der Lage ist DARPP-32 *in vitro* als auch *in vivo* an Serin 137 zu phosphorylieren (Desdouits et al., 1995). DARPP-32 ist ein Signaltransduktions-Molekül das selektiv in mittelgroßen Neuronen des Neostriatums angereichert ist und eine obligatorische Rolle in dopaminergen Signalwegen einnimmt.

Eine Beteiligung von CKI δ und CKI ϵ an Signaltransduktionsvorgängen im Bereich der zirkadianen Rhythmik, die die 24-stündige Periodizität vieler physiologischer Vorgänge vorgibt, wurde postuliert. So wird CKI δ/ϵ eine Regulation der zirkadianen Periodenlänge zum einen durch die Kontrolle des Proteinumsatzes und zum anderen durch die Kontrolle der subzellulären Lokalisation von PER Proteinen zugesprochen (Akashi et al., 2002).

Für die Kinase Hrr25 aus *S.cervisiae* konnte nicht nur eine Beteiligung an der Abschnürung von Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums nachgewiesen werden (Murakami et al., 1999), sondern Hrr25 scheint auch in DNA-Reperaturprozesse involviert zu sein, da sowohl Deletionsmutanten von Hrr25, als auch Mutanten mit katalytisch inaktiver Hrr25 eine erhöhte Empfindlichkeit der Hefezellen gegenüber DNA-Schäden aufzeigen (Hoekstra et al., 1991). Diese Mutationen führen dazu, dass sich der Anteil der Zellen in der G₂-Phase erhöht und Defekte bei der Chromosomensegregation in der Mitose und Meiose auftreten. Dieses Phänomen ist dadurch erklärbar, dass Hrr25 normalerweise durch Phosphorylierung des Faktors Swi6 die Promotorbindung des Transkriptionsfaktors SBF (SCB-binding factor) reguliert (Hoekstra et al., 1991), der an der transkriptionellen Aktivierung von DNA-Reparaturgenen und G₁-spezifischen Cyklinen beteiligt ist (Ho et al., 1997). Die tierischen Isoformen CKI δ und CKI ϵ , nicht aber CKI α , sind in der Lage, den Defekt der Hrr25 Mutanten zu komplementieren (Fish et al., 1995). Es ist daher anzunehmen, dass CKI δ und

CKIε in höheren Eukaryonten ähnliche Funktionen wahrnehmen wie ihr Homolog Hrr25 in Hefen. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass CKIδ und CKIε das Tumorsuppressorprotein p53 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* N-terminal phosphorylieren können (Dumaz et al., 1999; Knippschild et al., 1997). p53 wird in der Regel nach DNA-Schädigung aktiviert und schaltet Signalwege ein, die letztendlich die genomische Integrität der Zelle sicherstellen. Abhängig von den eingehenden Signalen und dem jeweiligen Zelltypus kann die Aktivierung von p53 sowohl zu einem Zellzyklusarrest (Kuerbitz et al., 1992) als auch zur Apoptose (Oren, 1994; Schuler und Green, 2001) führen. Infolge seiner Funktion als Wächter des Genoms (Lane, 1992), spielt p53 eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. Zudem findet nach genotoxischem Stress eine transkriptionelle Aktivierung von CKIδ durch p53 statt, so dass man von einem autoregulatorischen Loop zwischen den beiden Proteinen sprechen kann (Knippschild et al., 1997). Diese Phosphorylierung von p53 durch CKIδ/ε erfolgt spezifisch am Übergang zwischen G₂/M-Phase. p53 (Ciciarello et al., 2001; Tarapore et al., 2001) und CKIδ (Behrend et al., 2000) assoziieren beide mit den Zentrosomen, wobei die Phosphorylierung von p53 am G₂/M-Übergang möglicherweise eine Rolle für die p53-vermittelte Erkennung von Spindelschäden spielt.

Die Deaktivierung von p53 erfolgt im Wesentlichen Mdm2-vermittelt durch proteasomalen Abbau des Tumorsuppressors (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Da Mdm2 zur Gruppe der p53-abhängigen Zielgene gehört (Barak et al., 1993) unterliegt das Verhältnis der p53 und Mdm2 Proteinmenge einem autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus, dessen Kontrolle wesentlich für die Steuerung der p53-vermittelten Signalwege ist (Wu et al., 1993). Dementsprechend beeinflussen Modifikationen, insbesondere die reversible Phosphorylierung die Interaktionen beider Proteine (Chene, 2003; Shiloh, 2003). Neben der CKIδ- und CKIε-vermittelten Phosphorylierung von p53, konnte für diese beiden Isoformen gezeigt werden, dass sie ebenfalls Mdm2, an Serin 240, 242 und 246 in der sauren Domäne, und Serin 383 in der C-terminalen Domäne, phosphorylieren (Winter et al., 2004). CKIδ phosphoryliert sowohl p53, als auch Mdm2 und könnte somit eine wichtige Rolle spielen, in der Modulation der Effekte dieser beiden Schlüssel-Regulationsproteine in bezug auf Zellwachstum als auch genomischer Integrität.

Zudem wird für die CKI Isoformen eine Beteiligung an apoptotischen Vorgängen, durch unterschiedliche Signalwege, beschrieben. So ist CKI in der Lage, inhibitorisch die p75-vermittelte Apoptose zu regulieren, durch Phosphorylierung des p75 Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Rezeptors (Beyaert et al., 1995). Weiterhin wurde eine Beteiligung der CKI

Isoformen, vor allem für CKI α bei der vermittelten Resistenz der Tumorzellen auf die TNF-abhängige, Liganden induzierte Apoptose postuliert. Man geht davon aus, dass die CKI-vermittelte Phosphorylierung auf der Ebene des DISC (Death inducible signaling complex) zu einer Resistenz gegenüber Caspasen führt.

Ferner wird den Isoformen CKI α , δ und ϵ eine Beteiligung in der Fas-vermittelten Apoptose zugesprochen, die zur Aktivierung der Caspase 8 führt. Je nach Zelltyp induziert Caspase 8 durch direkte Spaltung (Typ I Zellen) oder indirekt über verschiedene Zwischenschritte (Typ II Zellen) die Aktivierung der Effektor-Caspase 3 (Scaffidi et al., 1998). In Typ II Zellen bildet sich, im Vergleich zu Typ I Zellen, nach Fas-Bindung nur eine verhältnismäßig geringe Menge des DISC. Dies hat zur Folge, dass Caspase 8 nicht im ausreichenden Maß aktiviert wird, um wiederum, durch Aktivierung der Effektor-Caspasen, direkt Apoptose herbeizuführen (Scaffidi et al., 1998). Für die effektive Auslösung der Apoptose-Kaskade, ist in diesen Zellen die Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium nötig. Das Bindeglied zwischen der Zelloberfläche und den Mitochondrien stellt hierbei das apoptotische Protein Bid aus der Bcl-2 Familie dar. Dieses Protein transloziert nach Spaltung durch Caspase 8 zum Mitochondrium, wodurch pro-apoptotische Faktoren, wie z.B. Cytochrom C, freigesetzt werden (Li et al., 1998; Luo et al., 1998), die nun über die Aktivierung von Caspase 9 zur Aktivierung von Effektorcaspasen beitragen. Auf diese Weise bewirken der von Fas induzierte, direkte Signalweg zur Aktivierung von Effektorcaspasen, als auch der mitochondrial vermittelte Signalweg, synergistisch die Ausführung der Apoptose. Die proteolytische Prozessierung von Bid durch Caspase 8 kann allerdings nur erfolgen, wenn Bid in unphosphorylierter Form vorliegt. Dementsprechend kann eine nicht phosphorylierbare Bid-Mutante leichter Apoptose induzieren als das entsprechende Wildtyp-Protein (Desagher et al., 2001), da infolge der Deletion der Phosphorylierungsstellen keine Inhibierung der Caspase 8 vermittelten Proteolyse von Bid mehr stattfinden kann. Es wird angenommen, dass Serin 61 des murinen Bid-Proteins das Hauptziel für CKI ist, was wiederum die Phosphorylierung von Serin 64 und Serin 66 durch CKI und von Threonin 58 durch CKII triggert. Inhibierung von CKI und CKII führt zu einer beschleunigten Fas-getriggerten Apoptose, wohingegen eine Überexpression von CKI ϵ und CKII zu einer Verminderung apoptotischer Zellen führt. So könnte die Phosphorylierung von Bid durch CKI und CKII Typ II Zellen von einer Fas-vermittelten Apoptose bewahren (Desagher et al., 2001).

Für CKI α konnte in neueren Studien gezeigt werden, dass dieses Mitglied der Kinase Familie in der Lage ist, FADD an Serin 194 *in vitro* als auch *in vivo* zu phosphorylieren (Alappat et al., 2005). FADD, ein DD (death domain)-zugehöriges Adaptor Protein, ist essentiell für die DR (death receptor)-induzierte Apoptose. Jedoch spielt FADD ebenfalls eine wichtige Rolle in der Zellzyklus-Progression und -Proliferation, die wiederum durch die Phosphorylierung an Serin 194 reguliert wird (Alappat et al., 2003). Es konnte nachgewiesen werden, dass die CKI α Assoziation mit FADD die subzelluläre Lokalisation von FADD reguliert und zudem phosphoryliertes FADD in der Metaphase mit CKI α an den Spindelpolen kolokalisiert (Alappat et al., 2005). Somit könnte CKI α durch die Phosphorylierung von FADD an Serin 194 drei der nicht-apoptischen Aktivitäten von FADD regulieren. Dazu zählen Zellzyklus-Interaktionen, die nukleäre Lokalisation von FADD sowie eine Erhöhung der Empfindlichkeit auf Chemotherapeutika.

Neben der Beteiligung von CKI an apoptotischen Signalwegen konnte auch ihre Beteiligung an Signalwegen der Differenzierung im Rahmen der Wnt-Signalkaskade gezeigt werden. Diese Signalkaskade wurde zunächst im Zusammenhang mit der Entwicklung der Körperachse bei *Drosophila* entdeckt. Inzwischen ist bekannt, dass der Wnt-Signalweg als essentieller Regulator in der tierischen Entwicklung fungiert, sowohl in der Embryogenese, als auch in ausgereiften Organismen (Eastman und Grosschedl, 1999; Huelsken und Birchmeier, 2001; Peifer und Polakis, 2000; Wodarz und Nusse, 1998). Die Aktivierung der Wnt-Signalkaskade führt über die Stabilisierung von β -Catenin und dessen Komplexierung mit den Transkriptionsfaktoren der Tcf3/Lef1-Familie zur Transaktivierung von Wnt-spezifischen Genen wie z.B. c-myc (McKay et al., 2001a; McKay et al., 2001b). Die Stabilität von β -Catenin wird durch einen Multiprotein-Komplex reguliert, in dem an das Matrix Protein Axin (Ikeda et al., 1998; Sakanaka et al., 1998; Zeng et al., 1997) oder seinem Homolog Axin/Conductin (Behrens et al., 1998; Yamamoto et al., 1998) unter anderem die Proteine β -Catenin, Glycogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β), das Tumorsuppressor Protein APC (adenomatosis polyposis coli) (Grodin et al., 1991; Kinzler et al., 1991), Dishevelled (Dsh) und CKI ϵ gebunden sind. Die konstitutive Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK-3 β in Abwesenheit des Wnt-Liganden markiert β -Catenin für die Degradation am Proteasom. Durch die ausbleibende Phosphorylierung von β -Catenin jedoch wird dieses nicht mehr erkannt und somit bleibt die proteasomale Degradierung aus, was wiederum zu einer nukleären Akkumulation von β -Catenin und einer transkriptionellen Aktivierung von Tcf/Lef-verantwortlichen Zielgenen führt (Behrens et al., 1996; Huber et al., 1996; Molenaar et al., 1996).

Die Rolle, die die Mitglieder der CKI Familie in diesem Komplex und somit im Wnt-Signalweg einnehmen ist noch nicht vollständig geklärt. So wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen für die CKI Isoformen sowohl positive als auch negative regulatorische Funktionen im Wnt-Signalweg beschrieben. CKI ϵ werden dabei positive regulatorische Funktionen zugesprochen. Zum einen assoziiert es mit dem regulatorischen Multiprotein-Komplex und phosphoryliert Dsh, das dadurch aktiviert wird, GSK-3 β inhibiert und somit β -Catenin stabilisiert (Peters et al., 1999). Desweiteren aktiviert CKI ϵ durch die Phosphorylierung von Tcf3 dessen Bindung an β -Catenin und induziert auf diese Weise die Bildung eines aktiven Transkriptionskomplexes (Lee et al., 2001). Im Gegensatz dazu scheint CKI α als negativer Regulator des Wnt-Weges durch Phosphorylierung von β -Catenin die nachfolgende Phosphorylierung durch GSK-3 β zu ermöglichen (Liu et al., 2002a), ein Prozess der auch für CKI ϵ beschrieben wurde und kontrovers diskutiert wird (Sakanaka, 2002). Neueste Untersuchungen haben gezeigt, das auch CKI γ eine Rolle im Wnt-Signalweg spielt (Davidson et al., 2005). CKI γ ist mit LRP6 (LDL-receptor-related protein 6) assoziiert. Dieser Rezeptor wird durch Wnt Signale aktiviert und bildet einen Komplex mit dem Frizzled-Rezeptor um die Signale ins Zellinnere zu triggern (Nusse, 2005). Diese Kinase ist in der Zytoplasmamembran verankert, was wiederum essentiell für ihre Funktion ist, da sie nach Wnt Stimulation eine rasche Phosphorylierung des LRP6 bewirkt. Für GSK-3 β , der bisher eine inhibitorische Rolle im Wnt-Signalweg zugesprochen wurde, konnte ebenfalls eine Beteiligung an der Phosphorylierung des LRP6 nachgewiesen werden (Zeng et al., 2005). Diese duale Phosphorylierung zieht wiederum die Rekrutierung des Proteins Axin an den Rezeptor LRP6 nach sich, wodurch eine Stabilisierung von β -Catenin erreicht wird und es somit zu einer transkriptionellen Aktivierung der Zielgene kommt.

1.7 Beteiligung von CKI in der Entstehung von Krankheiten

Die Bedeutsamkeit der β -Catenin Phosphorylierung zur Kontrolle seiner Degradation rührt hauptsächlich aus Studien von N-terminalen β -Catenin-Mutationen in Tumorzellen (Polakis, 2000). Diese, sowie Aberrationen von APC oder Axin, führen zu einer exzessiven Akkumulation von β -Catenin im Zellkern und zu einer deregulierten Expression von Zielgenen, die eine neoplastische Transformation fördern (Morin et al., 1997; Rubinfeld et al., 1997; Sparks et al., 1998). Eine aberrante Aktivierung des β -Catenin-Signalweges wurde als charakteristischer Schritt in der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen, maligner Melanoma-Zelllinien (Bienz und Clevers, 2000; Conacci-Sorrell et al., 2002) und anderen

Typen von Karzinomen beschrieben (zur Übersicht:(Polakis, 2000)). Die herbeigeführte Aktivierung der Zielgene wie Cyclin D1 (Shtutman et al., 1999; Tetsu und McCormick, 1999) und c-myc (He et al., 1998) durch den β -Catenin-Tcf/Lef Komplex, die einen Wachstumsvorteil der Zellen vermitteln, könnten somit einen initialen Schritt der Onkogenese darstellen. Zudem wurde eine mögliche Verbindung zwischen dem β -Catenin und dem p53 Signalweg während der Tumorgenese vermutet. So konnten neuere Studien zeigen, dass ein Anstieg im p53 Protein-Level, hervorgerufen durch genotoxischen Stress oder durch Überexpression, nicht nur zur Blockierung der Zellproliferation führt, die durch β -Catenin induziert wurde, sondern ein Anstieg von p53 eine Herunterregulation von β -Catenin in einer Vielzahl von Zellen bewirkt und somit als negativer Feedbackloop fungiert (Sadot et al., 2001). Levina et al. (Levina et al., 2004) konnten nachweisen, dass der Mechanismus der p53-vermittelten Herunterregulation von β -Catenin sowohl die CKI vermittelte Phosphorylierung an Serin 45, als auch die GSK-3 β -abhängige Phosphorylierung benötigt. Zudem wurde ein schnellerer Abbau des Axin-basierten β -Catenin Degradations-Komplexes in Anwesenheit von p53 diskutiert.

Ebenfalls wurden Veränderungen der Aktivität des Wnt-Signalweges bei der Entstehung von Mammakarzinomen diskutiert (Fuja et al., 2004). Eine hohe Frequenz somatischer Mutationen im CKI ϵ -kodierenden Gen wurde in Mammakarzinomen nachgewiesen. Zudem wird CKI ϵ eine Beteiligung im Wnt-Signalweg zugesprochen. Die dem Wnt-Signalweg angehörigen Komponenten APC, β -Catenin, und Axin weisen im Gegensatz zu kolorektalen Karzinomen, keine hohen Mutationsraten in Mammakarzinomen auf. Jedoch konnten für Komponenten des Wnt-Signalweges, wie Wnt-1 und β -Catenin sowie für die Zielgene c-myc und Cyclin D1, eine gesteigerte Expression in Mammakarzinomen nachgewiesen werden (Lin et al., 2000; Wong et al., 2002). Daneben ist eine hohe β -Catenin Aktivität mit einer schlechten Prognose in Mammakarzinomen assoziiert (Lin et al., 2000). Daher könnte eine Wnt-Signalweg-Aktivierung in Mammakarzinomen hervorgerufen werden, durch somatische Mutationen in anderen Regulatoren dieses Signalweges, die bisher noch nicht entdeckt oder analysiert worden sind (Brown, 2001). CKI ϵ könnte ein solcher Regulator dieses Signalweges sein. Die meisten Mutationen im CKI ϵ -kodierenden Gen betreffen hoch konservierte Regionen, von denen einige wiederholt in unterschiedlichen Patientinnen gefunden wurden. Es konnten jedoch keine identischen Mutationen nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass die entsprechenden Mutationen in den Tumoren selektiert wurden und somit eine funktionelle Signifikanz darstellen. Zudem konnte in immunhistochemischen Analysen nachgewiesen werden, dass CKI ϵ in schlecht

differenzierten Tumoren reduziert ist und zudem eine positive Assoziation zwischen verminderter Proteinreaktivität, Verlust der Heterozygotie und somatischen Mutationen besteht (Fuja et al., 2004). Für CKI δ konnte in immunhistochemischen Analysen ebenfalls eine Reduktion der Expression in schlecht differenzierten Mammakarzinomen, sowie auch in DCIS (ductales carcinoma in situ), nachgewiesen werden (Knippschild et al., 2005).

Für eine Beteiligung von CKI an der Pathogenese verschiedener maligner Tumorerkrankungen spricht ferner, dass in Nierenzellkarzinomen eine Steigerung der Expression von CKI γ 3 beobachtet wurde (Masuda et al., 2003). Eine allgemein erhöhte Aktivität von CKI konnte in verschiedenen humanen Leukämie-Zelllinien sowie in primären humanen myeloblastischen Zellen detektiert werden (Elias et al., 1981). Die Tatsache, dass die Gene von humaner CKI α und CKI ϵ auf chromosomalen Loci gefunden wurden, die mit chronisch lymphoproliferativen Erkrankungen und der Entwicklung von Meningiomen in Verbindung gebracht werden (in: (Gross und Anderson, 1998)), scheint einen Zusammenhang mit der Entstehung dieser Krankheitsbilder anzudeuten. Daneben wird für CKI ϵ auch eine Rolle in der Entwicklung von ACC (adenoid cystic carcinoma) der Speicheldrüsen diskutiert (Frierson et al., 2002). In Choriokarzinomen konnte zudem eine starke CKI δ Expression nachgewiesen werden (Stöter et al., 2005).

Neben der Beteiligung von CKI in der Tumorphathogenese gibt es Hinweise, dass CKI auch bei neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle zu spielen scheint. Bei der Alzheimer Erkrankung scheint eine Fehlregulation der Phosphorylierung Mikrotubuli-assoziiierter Proteine eine bedeutende Rolle zu spielen. Diese Krankheit ist unter anderem dadurch gekennzeichnet, dass die hyperphosphorylierte Form des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau innerhalb von NFTs (neurofibrillary tangles) im Gehirn akkumuliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass CKI δ mit den Tau-enthaltenden NFTs kolokalisiert (Yasojima et al., 2000). CKI δ ist, wie auch einige andere Isoformen, in der Lage, Tau zu hyperphosphorylieren, was eine Konformationsänderung des Proteins bewirkt (Singh et al., 1995) und es infolgedessen zu einer Dissoziation des Tau Proteins vom Mikrotubuli-Netzwerk kommt. Diese Dissoziation wiederum führt zu einer Destabilisierung des Mikrotubuli-Netzwerks, was wahrscheinlich zum Absterben der betroffenen Neurone führt (Illenberger et al., 1998). Zudem wurde nachgewiesen, dass der Gehalt an CKI δ -mRNA, in den Gehirnen von Alzheimer Patienten in manchen Regionen um das bis zu 24-fache erhöht ist (Yasojima et al., 2000). Neben Tau phosphoryliert CKI δ noch weitere mit Alzheimer assoziierte Proteine, wie β -APP (beta-amyloid precursor protein) (Walter et al., 1998) und

Presinilin-2 (Walter et al., 2000). Die Überexpression von CKI δ scheint somit ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung zu sein.

Ebenfalls können Fehlregulationen in Signalwegen der zirkadianen Rhythmik auftreten, die so zu einer Krankheitsentstehung beitragen. So wurde eine mangelhafte Phosphorylierung des „clock“-Proteins hPER durch CKI ϵ als Ursache menschlicher Schlafstörungen diskutiert. FASPS (familial advanced sleep phase syndrome) konnte auf eine Missense-Mutation in hPer2 zurückgeführt werden. Diese Mutation liegt innerhalb der CKI ϵ -Bindungsregion von hPPER die wiederum zu einer Hypophosphorylierung des hPER Proteins durch CKI ϵ *in vitro* führt (Toh et al., 2001). Kürzlich konnte auf dem humanen CKI δ Gen eine Missense-Mutation (T44A) identifiziert werden, die FASPS durch die verminderte Enzymaktivität der mutierten Kinase hervorrufen könnte (Xu et al., 2005). Weiterhin wurde beschrieben, dass der Polymorphismus in einer Region des hPer3 Gens, eine vermutliche CKI ϵ Bindungsdomäne, möglicherweise mit dem DSP-Syndrom (delayed sleep phase syndrome) assoziiert ist (Ebisawa et al., 2001).

2 Problemstellung

CKI Isoformen sind in eine Vielzahl physiologischer Vorgänge eingebunden, deren kontrollierter Ablauf essentiell für das Überleben, die Differenzierung und die Proliferation von Zellen ist.

Dass CKI δ regulatorische Funktionen im Organismus wahrnimmt, wird durch die Tatsache untermauert, dass sich CKI δ sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene ubiquitär nachweisen lässt. CKI δ beeinflusst durch die Phosphorylierung zahlreicher Substrate deren Lokalisation, Aktivität und Funktion. Die Aktivität und die subzelluläre Lokalisation von CKI δ werden wiederum durch Wechselwirkungen mit zellulären Proteinen und Strukturen beeinflusst. Dieses Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren setzt enge Regulationsmechanismen voraus. Störungen dieser Regulationsmechanismen durch die Fehlregulation von CKI δ selbst, oder durch CKI δ modulierender Faktoren, wird mit einer Reihe von Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. Besonders im Zusammenhang mit der Tumorgenese könnten CKI Isoformen ein wichtiges Ziel, für die Entwicklung CKI-spezifischer Inhibitoren darstellen, die in neue Therapiekonzepte einbezogen werden könnten.

Jedoch setzt die Behandlung von Krankheiten die Kenntnis der genauen Funktionen von CKI δ voraus. Während diese in Hefen schon sehr gut charakterisiert wurden, sind die Funktionen die CKI δ in Mammalia wahrnimmt, noch weitestgehend ungeklärt. Um die Funktion von CKI δ innerhalb eines Zellverbandes oder eines Organs zu charakterisieren, ist es wichtig, Informationen über die physiologische Gewebe-spezifische Verteilung von CKI δ innerhalb der Zellen eines Organs zu erhalten.

Daher wurden in dieser Arbeit (1.) Methoden etabliert, die es ermöglichen, die Expression sowie die genaue Lokalisation von CKI δ in unterschiedlichen Zell- und Organsystemen von BALB/c-Mäusen mittels immunhistochemischen Analysen zu bestimmen und (2.) die Expressionsverteilungen von CKI δ in einzelnen Organen der Mäuse detailliert charakterisiert.

Ziel der Arbeit war es aufgrund der Gewebe-spezifischen Verteilung von CKI δ Einblicke auf mögliche Funktionen, die CKI δ in einzelnen Organen wahrnimmt, zu erhalten.

3 Material und Methoden

Material

3.1 Mausstamm

Es wurden Organe 4-6 Wochen alter Mäuse des Mausstammes BALB/c verwendet.

3.2 Bakterienstämme

Zur Herstellung des Fusionsproteins FP267 wurden Bakterien des Stammes DH5 α von Escherischia coli verwendet: F⁻; endA1, hsdR17(rk⁻, mk⁺); supE44; thi-1; λ^- ; recA1; gyrA96; relA1; Δ [argF-lacZYA] U169; [Φ 80dlacZM15]. (Hanahan, 1983)

3.3 Bakterieller Expressionsvektor

P267 cDNA der ersten 192 bp von Maus-p53 im Expressionsvektor pGEX-2T (Amersham, Braunschweig), (Expression der AS 1-64 von murinem p53 als GST-Fusionsprotein, bezeichnet als FP267), das Konstrukt wurde von U. Knippschild bereitgestellt

3.4 Antikörper/ Antiseren

Die eingesetzten Verdünnungen sind jeweils in Klammern gesetzt angegeben und beziehen sich je nach Verwendung auf Western-Blot Analysen (WB), Immunhistochemie am Paraffinpräparat (IHC-P) oder Immunhistochemie am Gefrierpräparat (IHC-G).

3.4.1 CKI δ -spezifische Primärantikörper

IC128A	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen CKI δ . #IC128A. ICOS Corporation, USA. (WB: 1:10000)
NC10	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen CKI δ -Ratte. Sequenz des zur Immunisierung benutzten Peptids: (Behrend et al., 2000). (IHC-P: 1:1200; IHC-G: 1:400)
108	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen CKI δ -Human/Ratte. Sequenz des zur Immunisierung benutzten Peptids: (Stöter et al., 2005). (IHC-P: 1:1200; IHC-G: 1:400)
ab10877	Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen CKI δ -Human (AS 310-327). Abcam #ab10877. (Abcam, Cambridge, UK). (IHC-P: 1:1600; IHC-G: 1:200)

3.4.2 Sonstige Seren

Präimmunserum (pre-NC10)	Präimmunserum aus Kaninchen, welches zur Immunisierung des zu generierenden CKI δ spezifischen Antikörpers NC10 herangezogen wurde (U. Knippschild, Ulm). (IHC-P: 1:1200)
Präimmunserum (pre-108)	Präimmunserum aus Kaninchen, welches zur Immunisierung des zu generierenden CKI δ spezifischen Antikörpers 108 herangezogen wurde (U. Knippschild, Ulm). (IHC-P: 1:1200)
Normales Ziegenserum	Vollserum aus Ziege. DAKO Cytomation Glostrup, Denmark. (IHC-P: 1:1600)

3.4.3 Enzymgekoppelte Sekundärantikörper

Anti-Maus-HRP	IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. SAPU, Schottland. (WB:1:10000)
Anti-Kaninchen-HRP	IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. SAPU, Schottland (WB: 1:10000)
Anti-Kaninchen-Biotin	IgG, Biotinyliert. Bio Genex, San Ramon, USA. (IHC-P: 1:20; IHC-G: 1:30)
Anti-Kaninchen-HRP	IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. N-Histofine [®] , Nichirei Corporation Tokyo, Japan. (IHC-P: unverdünnt; IHC-G: unverdünnt)
Anti-Kaninchen-AP	IgG, konjugiert mit Alkalischer-Phosphatase. N-Histofine [®] , Nichirei Corporation Tokyo, Japan. (IHC-P: unverdünnt; IHC-G: unverdünnt)
Anti-Ziege-HRP	IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. N-Histofine [®] , Nichirei Corporation Tokyo, Japan. (IHC-P: unverdünnt; IHC-G: unverdünnt)
Anti-Kaninchen-AP	IgG, konjugiert mit Alkalischer-Phosphatase, F(ab') ₂ -Fragment. DAKO Cytomation Glostrup, Denmark. (IHC-G: 1:100)

3.5 Enzymgekoppelte Konjugate

Streptavidin	konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. Bio Genex, San Ramon, USA. (IHC-P: 1:20; IHC-G: 1:30)
Streptavidin	konjugiert mit Alkalischer-Phosphatase. Bio Genex, San Ramon, USA. (IHC-P: 1:20; IHC-G: 1:30)

3.6 Chromogen-Substrate

AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) Substratlösung. DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark.
DAB	3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Substratlösung. DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark.
Neufuchsin	Neufuchsin Substratlösung. DAKO Corporation, Carpinteria, USA.

3.7 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden handelsübliche Chemikalien in Analysequalität der Firmen Fluka (Neu-Ulm), Sigma (München), Merck (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) verwendet. Speziell verwendete Chemikalien und andere Materialien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Antigen Retrieval Citra Plus	Bio Genex, San Ramon, USA
AR-10 Solution	Bio Genex, San Ramon, USA
Aurion BSA-c	Bio Trend, Köln
Avidin/Biotin Blocking Kit	Zymed, San Francisco, USA
BSA	NEB, Frankfurt a.M.
Cedukol	(Kollodiumwolle mit ca. 30% Ethanol), Merck, Darmstad
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
Dextran T500	Roth GmbH, Karlsruhe
Diethylether reinst	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
ECL-Lösungen	GE-Healthcare, Little Chalfont, UK
Ethanol absolut	Riedel-de Haen, Seelzle
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin Y Lösung mit Phloxin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure 100%	AppliChem GmbH, Darmstadt
Formaldehydlösung, 37%	J.T. Baker, Deventer, Holland

Glutathion-Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
Hematoxylin Solution Gill No.3	Sigma Diagnostics, USA
IPTG	Biomol, Hamburg
Levamisole	DAKO Corporation, Carpinteria, USA
Magermilchpulver	Neuform, Herrenberg
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
O.C.T. Compound, Embedding Medium	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Netherlands
Peroxidase Blocking Reagent	DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark
Protogel (30% (w/v) Acrylamid/ 0,8% (w/v) Bisacrylamid	National Diagnostics, UK
Protein Block Serum-Free	DAKO Corporation, Carpinteria, USA
Power Block™	BioGenex, USA
Silane (3-Aminopropyl-triethoxy-Silane)	Sigma Aldrich, Seelzle
Trasylol (Wirkstoff Aprotinin)	Bayer, Leverkusen
TUF (Target Unmasking Fluid)	Kreatech, Amsterdam
Ultramount	DAKO Corporation, Carpinteria, USA
UniBlock™	Bio Genex, USA
Xylol	Riedel-de Haen, Seelzle

3.8 Arzneimittel

Ampicillin	Amersham Biosciences, Freiburg
Ketanest®	Pake-Davis GmbH, Berlin
Liquemin®	La Roche, Grenzach-Whylen

3.9 Radiochemikalien

γ - [³² P]-ATP	Hartmann, Braunschweig
-----------------------------------	------------------------

3.10 Sonstige Materialien und Kits

Biorad Protein Assay Kit	Biorad, München
Braunüle®	Braun, Melsungen
Deckgläser	Marienfild, Lauda-Königshofen

Einbettkassetten (Histosette®II)	Simport, Beloeil, Canada
Färbeküvetten	Roth GmbH, Karlsruhe
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher und Schüll, Dassel
Hybond-C Super (Nitrozellulose)	Amersham, Braunschweig
Infusionsbesteck	Braun, Melsungen
UNO-Q-Anionenaustauschsäule	Biorad, München
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Paraffin	Vogel GmbH&CoKG, Gießen
Protein Assay-Kit (Bradford)	Biorad, München
Röntgenfilm Kodak X-OMAT AR	Kodak, USA
Röntgenfilm Kodak X-OMAT BMR	Kodak, USA
Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold XR	Packard, Groningen, Netherlands
Zentrifugenröhrchen Falcon (15 u.50ml)	Becton Dickinson, USA
Zentrifugenröhrchen (15 u.30ml)	Corex, USA

3.11 Geräte

ÄKTApurifier	Amersham Biosciences, Freiburg
Analysenwaage H54AR	Mettler, Gießen
Analysenwaage BA21009	Sartorius, Göttingen
Belichtungssteuerung Kamera MC 80	Carl-Zeiss, Jena
Blotkammer Mini-Trans Blot	Biorad, München
Dampfkochtopf	Nordic Ware®, Minneapolis, USA
Gelkammer Modell 1068BD	Life Technologies, USA
Gelkammer Modell AE-6450	Atto, Japan
Geltrockner Modell 583	Biorad, München
Gewebe-Ausgießstation EC 350	Microm International GmbH, Walldorf
Kryostatmodell Jung CM 1800	Leica, Bensheim
Mikrowellengerät M 754	Landgraf Laborsysteme HLL GmbH Langenhagen
Universalmikroskop Axioplan 2	Carl-Zeiss, Jena
Mikroskop Kamera MC 80	Carl-Zeiss, Jena
Paraffin-Streckbad	Vogel, GmbH&CoKG, Gießen
pH-Meter PH 525	WTW, Weilheim

Plastikküvette für die Mikrowelle	VWR International, Darmstadt
Power-Supply PAC 300	Biorad, München
Power-Supply EPS 2A200	Hofer, USA
Schlittenmikrotom HM 450	Microm International GmbH, Walldorf
SPECTRA Classic	TECAN München GmbH, Kirchheim
Szintillationszähler LS5000TD	Beckman, Unterschleissheim-Lohhof
Tissue Processing ASP 200	Leica, Bensheim
Ultraschall Sonifier 250	Branson, USA
Ultraschall Sonifier B12	Branson, USA
Vacuum-Pumpe Lyvac GT2	Heraeus, Homburg
Wasserbad Typ 1086	GFL, Burgwedel
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Homburg

Methoden

3.12 Arbeiten mit Bakterien

3.12.1 Bakterielle Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden 50 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin aus der entsprechenden *E.coli* DH5α Stammkonserve (U. Knippschild, Ulm) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 upm inkubiert. Bei dem GST-Fusionsprotein handelt es sich um das FP267, das neben GST für die Aminosäuren 1-64 des Wildtyp Mausproteins p53 codiert. Dieser N-terminale p53 Bereich enthält potentielle Phosphorylierungsstellen für CKIδ (Ser 4, 6, 9 und 15, Thr 18 und Ser 33 und 37). Am nächsten Tag wurden 450 ml LB-Medium hinzugefügt und bis zu einer Abs₅₉₅ von 0,700-0,900 inkubiert. Die Expression des Fusionsproteins erfolgte nach Induktion mit IPTG bei 30°C und 180 upm für 2 Stunden. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 500 upm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, das Bakteriensediment auf Eis in 10 ml Lysispuffer resuspendiert und in ein 30 ml Sorvall Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 2,5 mg Lysozym wurden die Bakterien auf Eis lysiert. Anschließend wurden 10 ml Lysispuffer zugegeben. Mit Ultraschall (Ultraschall Sonifier, 2 Sekunden, Stufe 3) wurde die bakterielle DNA fragmentiert. Die unlöslichen Bakterienbestandteile wurden nach Zentrifugation bei 10000 upm für 30 Minuten bei 4°C verworfen. Der Überstand wurde mit 300 µl aufgeschwemmter Gluthation-Sepharose dreimal mit dem Lysispuffer, zweimal mit Lysispuffer mit 1 M NaCl und zweimal mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 150 mM NaCl gewaschen. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte durch Inkubation der Sepharose mit 200-500 µl Elutionspuffer. Die eluierten Proteine wurden anschließend 2x für 3 Stunden in 2 L 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) bei 4°C dialysiert. Die Lagerung der Proteine erfolgte nach Zugabe von 10% (v/v) Glycerin und Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -70°C.

Lysispuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 0,5% NP40, 1mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM Benzamidin, 50 µM Leupeptin, Trasylol 1:100

Elutionspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 5 mM reduziertes Glutathion

3.13 Proteinbiochemische Methoden

3.13.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration gemäß der Methode nach Bradford beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue an basische und aromatische Aminosäuren in saurer Lösung und einer damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm. Die Ermittlung der Proteinkonzentration aus der gemessenen Absorption bei 595 nm (Abs_{595}) erfolgt dabei mit Hilfe einer zuvor angefertigten BSA Standard-Eichreihe.

Zur Durchführung wurden 10 μ l des zu analysierenden Zellextraktes in 800 μ l H₂O aufgenommen und mit 200 μ l Bradford Reagenz versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln wurde die Abs_{595} der Proteinlösung im Spektralphotometer bestimmt.

Bradford Reagenz: Protein Assay Kit (BioRad)

3.13.2 Angleichen der Proteinkonzentration in den Zelllysaten

Um Proben untereinander vergleichen zu können, wurden die Extrakte mit SDS-Probenpuffer auf gleichen Proteingehalt pro Volumeneinheit eingestellt.

SDS-Probenpuffer: 50 mM Tris-HCl (pH6,8), 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau

3.13.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese. Es wurden Gele der Abmessung 90x 80x 1 mm verwendet. Alle verwendeten Gele bestanden jeweils aus einem Trenngel und einem darüber gegossenen Sammelgel. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend abgekühlt. Die Proteine wurden im Sammelgel bei einer Spannung von 80 V konzentriert und im Trenngel bei 200 V getrennt.

<u>SDS-Sammelgelpuffer:</u>	0,1 % (w/v) SDS, 4 % Acrylamid, 130 mM Tris-HCl (pH 6,8), erst unmittelbar vor dem Gießen wurden 0,09 % APS und 0,3 % (v/v) TEMED zugegeben
<u>SDS-Trenngelpuffer:</u>	0,1 % (w/v) SDS, 10-15 % Acrylamid, 130 mM Tris-HCl (pH 8,8), erst unmittelbar vor dem Gießen wurden 0,05 % APS und 0,12 % (v/v) TEMED zugegeben
<u>5x SDS-Probenpuffer:</u>	250 mM Tris-HCl (pH6,8), 25 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 50 % (v/v) Glycerin, 10 % SDS, 0,5 % Bromphenolblau
<u>SDS- PAGE-Laufpuffer</u>	250 mM Tris-HCl (pH6,8), 200 mM Glyzin, 0,1 % SDS

3.13.4 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue

Die Proteinbanden in den Polyacrylamidgelen wurden für 15 Minuten in Coomassie Brilliant Blue Färbelösung angefärbt. Anschließend wurden die Gele bis zur Entfärbung des Hintergrundes in Coomassie-Entfärber geschwenkt.

Coomassie-Färbelösung: 1,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 in 1L Methanol/dd H₂O/Eisessig (5:5:1)

Coomassie-Entfärber: 10 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure

3.13.5 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Die Membranen wurden zunächst durch Benetzen mit Methanol aktiviert und nach Abspülen unter fließendem Wasser deionisiert und für 5 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Die elektrophoretisch auftrennten Proteine wurden in einer Nassblottapparatur (Mini-Trans Blot Kammer) bei 60 V für 1,5 Stunden unter Eiskühlung aus den Gelen der SDS-PAGE in Richtung Anode auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

WB-Transferpuffer: 192 mM Glyzin, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3)

3.13.6 Immundetektion (Western Blot-Analyse)

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers auf der Membran mit Blockpuffer 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die anschließende Inkubation der Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe **Kapitel 3.4.1**) erfolgte in Blockpuffer für 45 Minuten bei

RT. Zur Entfernung des nicht gebundenen Antikörpers wurde die Membran dreimal für jeweils 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen, 30 Minuten bei RT unter Schwenken mit dem sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper inkubiert, erneut dreimal für jeweils 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen und in die ECL-Reaktion (siehe 3.13.7) eingesetzt. Zur Weiterverwendung wurden die Membranen kurz mit Waschpuffer gewaschen und getrocknet oder erneut für 45 Minuten in Blockpuffer inkubiert, um in eine neue Immunreaktion eingesetzt zu werden. Getrocknete Membranen wurden vor Einsatz in einer weiteren Immunreaktion zunächst mit Methanol benetzt, unter fließendem Wasser (deionisiert) abgespült und für 45 Minuten in Blockpuffer inkubiert.

TBS: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl

Waschpuffer: 0,05 % (v/v) Tween-20 in TBS

Blockpuffer: 5 % (w/v) Milchpulver in Waschpuffer

3.13.7 ECL-Reaktion

Zur Sichtbarmachung von Banden wurden die Membranen mit ECL-Reaktionslösung für 1-2 Minuten im Dunkeln inkubiert und dann für verschiedene Zeiten (15 Sekunden-5 Minuten) auf Röntgen-Filmen exponiert. Die an die sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) spaltet dabei das in der ECL-Lösung angebotene Substrat Wasserstoffperoxid, die entstehenden Radikale lösen dann eine Chemolumineszens-Reaktion aus, welche eine Schwärzung des Röntgen-Films an der Position des gebundenen HRP-gekoppelten Antikörpers führt.

Lösung A: 100 µl Luminolstammlösung, 44 µl 4-Coumarinsäure-Stammlösung, 10 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,5), jeweils frisch angesetzt; im Kühlschrank ca. 1 Woche haltbar

Lösung B: 15 µl Wasserstoffperoxid 30%, 10 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,5), jeweils frisch angesetzt

Stammlösung Luminol: Luminol (3-Aminophthalhydrazid): 443 mg in 10 ml DMSO (250 mM), Lagerung in Aliquoten bei -20°C

Stammlösung 4-Cumarinsäure: 4- Cumarinsäure (p-Hydroxycimtsäure): 74 mg in 5 ml DMSO (90mM), Lagerung in Aliquoten bei -20°C

ECL-Reaktionslösung: 1:1 Gemisch aus Lösung A und Lösung B, unmittelbar vor Gebrauch ansetzen

3.13.8 Proteinfractionierung durch FPLC

Die postmortem entnommenen Organe 4-6 Wochen alter BALB/c Mäuse wurden in eisgekühltem Lysispuffer zermörsert, auf Eis lysiert und die DNA der Zellextrakte mit Ultraschall (Ultraschall Sonifier, 2 Sekunden, Stufe 3) fragmentiert. Die Proteinlysate wurden bei 10000 upm für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert, die Überstände durch einen 0,22 µm-Filter gegeben und die unlöslichen Bestandteile verworfen. Die relativen Proteinnengen im Überstand wurden anhand der Methode nach Bradford bestimmt und die Proteinkonzentrationen durch Zugabe von Lysispuffer angeglichen. Jeweils 1 ml des Proteinlysats, wurde durch einen 0,22 µm-Filter auf eine UNO-Q-Anionenaustauschsäule gegeben, die an ein FPLC-System (ÄKTApurifier) angeschlossen war. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe eines linearen NaCl-Gradienten ansteigender Konzentration im Bereich von 50 bis 550 mM. Es wurden jeweils 0,5 ml Fraktionen gesammelt. 2 µl Aliquots dieser Fraktionen wurden in Versuchen zur *in vitro* Kinasierung von Substraten durch CKIδ eingesetzt. Zur Immundetektion von CKIδ wurden die Fraktionen im Vakuum auf 100 µl eingengt, mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 Minuten bei 100°C denaturiert und 20 µl jeder Fraktion in der SDS-PAGE aufgetrennt. Alternativ wurden die 0,5 ml Aliquots der Fraktionen bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

<u>Lysispuffer:</u>	20 mM Tris-Acetat (pH 7,0), 0,27 M Sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % (v/v) Triton X-100, 1% (v/v) Trasylol, frisch zugeben
<u>FPLC-Puffer A:</u>	50 mM Tris (pH 7,0), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 % (v/v) Glycerol, 0,03% Brij35 (w/v), 1mM Benzamidin, 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol
<u>FPLC-Puffer B:</u>	1 M NaCl, 50 mM Tris (pH 7,0), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 % (v/v) Glycerol, 0,03% Brij35 (w/v), 1mM Benzamidin, 0,1 % (v/v) β-Mercaptoethanol

3.13.9 *In vitro* Kinasierung von Proteinen aus Zellextrakten

Für die CKIδ *in vitro* Kinasierungen wurde als Substrat das GST-p53 Fusionsprotein FP267 verwendet. Pro Ansatz von 20 µl wurden 0,2 µCi [γ -³²P]-ATP, 20-100 µM ATP und 0,5-1 µg des Substrats in Kinasepuffer mit 2 µl der FPLC-Fraktionen als Enzym-haltige Lösungen, zum Starten der Reaktion, in die Reaktionsansätze gegeben. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte nach 30 Minuten bei 30°C mit 5 µl 6x SDS-Probenpuffer.

Die Reaktionsprodukte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Färben und Entfärben wurden die Gele getrocknet. Die Quantifizierung erfolgte durch Cherenkov-Zählung der ausgeschnittenen Proteinbanden im Szintillationszähler. Gemessen wurden die Zerfälle pro Minute (cpm: counts per minute), die als relatives Maß für die Intensität der Phosphorylierung dienen.

Kinasepuffer (10x): 1 mM ATP, 250mM Tris (pH 7,5), 100 mM MgCl₂, 1mM EDTA

3.14 Immunhistochemische Methoden

3.14.1 Vorbereitung der Objektträger

Um eine bessere Haftbarkeit der Schnitte auf den Objektträgern zu garantieren, wurden diese silanisiert. Dazu wurden die Objektträger für 1 Minute in ein 2 % Silan-Aceton-Gemisch gestellt. Danach erfolgte eine zweimalige Inkubation für jeweils 1 Minute in reinem Aceton, sowie eine zweimalige Inkubation in ddH₂O für jeweils 1 Minute. Anschließend wurden die Objektträger in einen Wärmeschrank (40°C) zum Trocknen über Nacht gegeben.

Silan-Aceton-Gemisch: 2% (v/v) Silane (3-Aminopropyl-triethoxy-Silane) in Aceton

3.14.2 Fixierung der Organe und Herstellung von Schnittpräparaten

Gefrierschnitte

Die Mäuse wurden mittels Ethernarkose getötet, danach erfolgte die zügige Präparation und Organentnahme. Die Organe wurden auf ein Korkplättchen, auf welches zuvor ein Einbettmedium für Gefrierschnitte (O.C.T. Compound) aufgebracht wurde, gelegt. Danach erfolgte die Kühlung der Organe auf einem Block im Kryostat (bei ca. -20°C). Nach Herstellung von Gefrierschnitten mit einer Dicke von 5-10 µm und Aufbringen auf einen silanisierten Objektträger wurden die Präparate zur Fixierung für 10 Minuten in 4°C kaltes Aceton gestellt. Nach Trocknung über Nacht bei RT erfolgte dann der immunhistochemische Nachweis von CKIδ. Alternativ wurden die entnommenen Organe in flüssigen Stickstoff bis zur vollständigen Durchfrierung getaucht und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Perfusionsfixation

Vor der transkardialen Perfusion wurden die Mäuse mit einer intramuskulären Injektion von Ketamin (Ketanest[®] S 5 mg/ml, 5ml Injektionslösung, 2 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und danach eine gewichtsadaptierte Antikoagulation mit Liquemin[®] (Liquemin[®] N 25.000 I.E., 5 ml Injektionslösung, 1.000 I.E./kg Körpergewicht) durchgeführt. Nach Thorakotomie wurde der linke Ventrikel mit einer Braunüle[®] perforiert und nachfolgend das rechte Herzohr zum Druckausgleich inzidiert. Die Braunüle[®] wurde mit dem Infusionsbesteck konnektiert und das Gefäßsystem darauf für ca. 2 Minuten mit Dextran-Lösung bei einer Wassersäule von 108 mmHg perfundiert. Danach wurde die Perfusionsfixation mit einem der unten aufgeführten Fixierungslösungen sofort für weitere 20 Minuten über denselben intrakardialen Anschluss unter gleichen Druckverhältnissen weitergeführt. Nach abgeschlossener Perfusionsfixierung erfolgte die Organentnahme. Die entnommenen Präparate wurden dann in der gleichen Fixierungslösung, die zur Perfusion eingesetzt wurde, für 24 Stunden bei 4°C asserviert.

Dextranlösung: 5% Dextran T500-NaCl (0,9%)-Gemisch

Fixans 1: *Bouin-Lösung:* gesättigte Pikrinsäure, Formalin, Eisessig im Verhältnis 15:5:1

Fixans 2: *Saures Formalin:* 4% Formaldehyd; 1,5% Essigsäure

Fixans 3: *Neutral gepuffertes Formalin (10%):* 0,4% Natrium-hydrogenphosphat; 0,65% Dinatriumhydrogen-phosphat; 10% (v/v) Formaldehyd 37%; ad 1000 ml H₂O

Immersionsexation

Die Mäuse wurden mittels Ethernarkose getötet, danach erfolgte die zügige Präparation und Organentnahme. Die Organe wurden in einer, der unten aufgeführten Fixierungslösung für 24 Stunden bei RT fixiert. Bei Verwendung des sauren Formalins, wurde dieses nach 24 Stunden gegen neutrales Formalin ausgetauscht und das Gewebe erneut für 24 Stunden bei RT asserviert.

Fixans 1: *Bouin-Lösung:* gesättigte Pikrinsäure, Formalin, Eisessig im Verhältnis 15:5:1

Fixans 2: *Saures Formalin:* 4% Formaldehyd; 1,5% Essigsäure

Fixans 3: *Neutral gepuffertes Formalin (10%):* 0,4% Natrium-hydrogenphosphat; 0,65% Dinatriumhydrogen-phosphat; 10% (v/v) Formaldehyd 37%; ad 1000 ml H₂O

<u>Fixans 4:</u>	<i>Carnoysches Gemisch</i> : 60% Ethanol absolut, 30% Cholorform, 10% Eiseisig
<u>Fixans 5:</u>	<i>Zink-Fixierungslösung</i> : 0,1 M Tris (pH 7,4); 0,05% Calciumacetat; 0,5% Zincacetat; 0,5% Zinccchlorid
<u>Fixans 6:</u>	<i>Zinc Formal-FixxTM</i> : gebrauchsfertige Lösung der Firma Shandon, USA
<u>Fixans 7:</u>	<i>NOTOXTM</i> : gebrauchsfertige Lösung der Firma Quartett, Berlin
<u>Fixans 8:</u>	<i>Glyo-FixxTM</i> : gebrauchsfertige Lösung der Firma Shandon, USA

3.14.3 Einbettung des Gewebes

Nach Fixierung der Organe in den entsprechenden Lösungen, erfolgte sowohl für die perfusionsfixierten, als auch für die immersionsfixierten Organe ein Auswaschen der Fixierungslösung unter fließendem Wasser für ca. 4 Stunden. Danach fand die automatische Einbettung (Tissue Processing ASP 200) über Nacht nach unten stehendem Schema statt. Zuerst erfolgte die Entwässerung mit steigenden Konzentrationen von Ethanol, sowie im Anschluss daran eine Inkubation in Methylbenzoat, bevor die Entfernung des Alkohols durch das Intermedium Toluol erfolgte. Abschließend erfolgt die vollständige Durchtränkung des Gewebes mit Paraffin, woran sich das Ausgießen des Gewebes (Gewebe-Ausgießstation EC 350) anschloss.

Arbeitsschritt	Reagenz	Einwirkdauer	Temperatur
1	Ethanol 70 %	1:30 Std.	45°C
2	Ethanol 80 %	2:00 Std.	45°C
3	Ethanol 96 %	2:30 Std.	45°C
4	Ethanol 100 %	1:00 Std.	45°C
5	Ethanol 100 %	2:00 Std.	45°C
6	Ethanol 100 %	4:00 Std.	45°C
7	Methylbenzoat	4:00 Std.	45°C
8	Methylbenzoat	3:00 Std.	45°C
9	Toluol	0:20 Std.	45°C
10	Toluol	0:20 Std.	45°C
11	Paraffin	1:00 Std.	60 °C
12	Paraffin	1:00 Std.	60 °C
13	Paraffin	1:00 Std.	60 °C

Tabelle 2: Reagenzien der maschinellen Einbettung, sowie deren Einwirkdauer und Temperatur

3.14.4 Entparaffinieren der Schnittpräparate für HE-Färbungen und Immunhistochemie

Nach Herstellung von Paraffinschnitten (Schlittenmikrotom) mit einer Dicke von ca. 3 µm und Aufbringen auf einen silanisierten Objektträger wurden die Präparate über Nacht bei 40°C getrocknet.

Um das Paraffin vollständig aus dem Gewebe herauszulösen, wurden die Präparate zweimal für je 10 Minuten in Xylol gestellt. Danach erfolgte eine Rehydrierung des Gewebes in einer absteigenden Alkoholreihe. Dazu wurden die Präparate für jeweils 5 Minuten dreimal in 100 %-igem, einmal in 96 %-igem, 80 %-igem, 70 %-igem und 50 %-igem Ethanol inkubiert. Danach erfolgte die zweimalige Spülung in ddH₂O um anschließend eine HE-Färbung durchzuführen.

Für die Vorbereitung zur Immunhistochemie wurde zur Entparaffinierung der Präparate, zweimal für jeweils 10 Minuten eine Inkubation in Xylol durchgeführt. Danach erfolgte eine dreimalige, jeweils 5 minütige Rehydrierung in 100 %-igem Ethanol. Um das Abschwimmen der Schnitte während der Hitzedemaskierung zu verhindern, wurden die Präparate für 1 Minute in eine 0,05 %-ige Celloidinlösung gestellt. Nach kurzem Antrocknen der Lösung wurden die Präparate für 5 Minuten in 70 %-igem Ethanol inkubiert und anschließend zweimal in destilliertem Wasser für jeweils 5 Minuten gespült.

Celloidinlösung 0,05 %: 0,05% Cedukol in 50% (v/v) Ethanol absolut und 50% (v/v) Diethylether reinst

3.14.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur Übersicht und Beurteilbarkeit der Schnitte wurde zunächst eine Routine-Färbung, mittels Hämatoxylin-Eosin (HE), sowohl der Gefrierschnitte als auch der in Paraffin eingebetteten Schnittpräparate durchgeführt.

Nach Entparaffinierung der Paraffinpräparate (Gefrierschnitte wurden nur in absteigender Alkoholreihe rehydriert) wurde eine Färbung für 3-4 Minuten in Hämatoxylinlösung (Sigma) durchgeführt. Danach erfolgte das zweimalige Spülen für jeweils 1 Minute in ddH₂O. Vor dem Bläuen, d.h. Inkubation für 10 Minuten unter fließendem Wasser, wurden die Präparate kurz in 1%-igen HCl-Alkohol differenziert. Nach dem Bläuen erfolgte eine Spülung in

ddH₂O für 1 Minute, an die sich eine Färbung für 2-3 Minuten in Eosinlösung (Sigma) anschloss. Nachfolgend wurden die Präparate, in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten inkubiert, zweimalig in 96 %-igem Ethanol und jeweils dreimal in 100 %-igem Ethanol. Nach zweimaliger Inkubation für jeweils 5 Minuten in Xylol, erfolgte abschließend das Eindecken der Schnitte mit Entellan.

3.14.6 Immunhistochemische Färbungen

3.14.6.1 Immunhistochemische Detektionsmethoden und Verdünnungsreihen

Es waren Versuchsreihen nötig zur Identifizierung des Zielantigens CKI δ in Mausgewebe, dies beinhaltete die Austestung der optimalsten Antikörperverdünnung, sowie des günstigsten Detektionssystems.

Antikörperverdünnung

Zur Detektion von CKI δ wurden die polyklonalen Antikörper NC10 (Behrend et al., 2000), 108 (Stöter et al., 2005) und ab10877 (Abcam) eingesetzt. Um falsch positive bzw. negative Ergebnisse zu vermeiden, wurden unterschiedliche Verdünnungsreihen des jeweils eingesetzten Primärantikörpers, sowohl für Gefrier- (GS) als auch für Paraffinschnitte (PS), ausgetestet. Hierbei zeigte sich, dass eine Verdünnung von 1:200 (GS) bzw. 1:1200 (PS) für das polyklonale Serum 108, 1:400 (GS) bzw. 1:1200 (PS) für den Antikörper NC10 und 1:400 (GS) bzw. 1:1600 (PS) für den Primärantikörper ab10877 (Abcam) sich am besten für die Detektion von CKI δ eignet .

Detektionssysteme

In den Aceton fixierten Gefrierschnitten, sowie in den Paraffinpräparaten wurde CKI δ mit Hilfe der Avidin-Biotin-Methode nachgewiesen (Hsu et al., 1981). Da die LSAB-Methode (Labeled Streptavidin-Biotin-Methode) etwa um den Faktor 4 bis 8 mal empfindlicher gegenüber der ABC-Technik (Avidin-Biotin-Komplexmethode) beschrieben worden ist (Giorno, 1984), wurde der LSAB-Methode der Vorzug gegeben. Dennoch ist die LSAB-Methode mit dem Nachteil behaftet, dass unspezifische Hintergrundreaktionen auftreten können, die auf das Vorhandensein von endogenem Biotin zurückzuführen sind. Zusätzlich können bei den Schnittpräparaten, bedingt durch die vielen Inkubations- und Spülschritte,

die bei dieser Methode erforderlich sind, störende morphologische Veränderungen auftreten. Daher wurde als weitere Detektionsmethode sowohl bei den Gefrierschnitten als auch bei den Paraffinschnitten die neuere, sehr sensible Zweischritt immunhistochemische Technik von N-Histofine[®] verwendet, die sich sowohl für Gefrier- als auch Paraffinschnitte als Methode der Wahl erwies.

3.14.6.2 Immunhistochemie an Gefrierschnitten

Nach Acetonfixation und Trocknung bei RT erfolgte die Rehydrierung der Präparate für 5 Minuten in Tris-Puffer. Um unspezifische Hintergrundreaktionen zu blockieren, erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Blockierungslösungen, die im Anschluss in tabellarischer Form aufgeführt sind. Nach erneutem, zweimaligem Spülen für je 5 Minuten in Tris-Puffer wurden die Präparate mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe **Kapitel 3.4.1**) für 40 Minuten bei RT inkubiert. Vor Auftragen des Sekundärantikörpers wurden die Schnitte jeweils zweimal mit Tris-Puffer für 5 Minuten gespült.

Zur Detektion kam zum einen die LSAB Methode und zum andern die Zweischritt Methode von N-Histofine[®] zum Einsatz. Für die LSAB-Methode wurde nach Inkubation des Primärantikörpers zunächst der biotinylierte Sekundärantikörper aufgetragen und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneuter, zweimaliger Spülung erfolgte die Inkubation mit dem enzymkonjugierten Streptavidin (Enzym: Peroxidase oder alkalische Phosphatase) für 30 Minuten bei RT.

Für die Zweischritt Methode von N-Histofine[®] wurde der sekundäre Antikörper, konjugiert mit HRP oder AP, unverdünnt aufgetragen und für 30 Minuten bei RT inkubiert.

Nach erneutem, zweimaligem Spülen für jeweils 5 Minuten in Tris-Puffer, wurden Chromogene für die Reaktionen mit Meerrettichperoxidase (DAB; AEC) oder mit alkalischer Phosphatase (Neufuchsin) zur Sichtbarmachung der Enzyme auf die Schnittpräparate aufgetragen. Diese Reaktionen wurden nach 5-30 Minuten Einwirkzeit nach Eintreten der Färbung mit ddH₂O gestoppt. Nach zweimaligem Spülen für jeweils 5 Minuten in ddH₂O erfolgte die Gegenfärbung der Kerne mit Mayers Hämatoxylinlösung. Nach kurzem Eintauchen in die Färbelösung, wurden die Schnittpräparate für 10 Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Danach wurden die Schnitte erneut mit ddH₂O für 5 Minuten gespült.

Bei Verwendung von DAB als Chromogen erfolgte die Inkubation der Präparate für jeweils 5 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit jeweils 70 %-igem, 96 %-igem und dreimal 100 %-igem Ethanol. Nach zweimaliger Inkubation für jeweils 5 Minuten in Xylol, erfolgte abschließend das Eindecken der Präparate mit Entellan .

Bei Verwendung von AEC und Neufuchsin, die beide in organischen Lösungsmitteln löslich sind, wurden die Präparate in einem wässrigem Eindeckmedium (Ultramount, DAKO) nach dem Bläuen eingedeckt. Nach Trocknung über Nacht bei RT erfolgte anschließend die Einbettung der Präparate in Entellan.

Tris-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl

Blockierungslösung	Anwendung	Inkubation
<i>Spezifisch gegen endogene alkalische Phosphatase</i>		
Levamisole (DAKO)	Zugabe von 0,2 mM Levamisole zum Substrat-Chromogen	5-30 Minuten bis zum Eintreten der Färbung
<i>Spezifisch gegen endogene Peroxidase</i>		
Peroxidase Blocking Reagent (DAKO)	Unverdünnt	10 Minuten
<i>Spezifisch gegen endogenes Biotin</i>		
Uni-Block (BioGenex)	Unverdünnt	10 Minuten bei RT
Avidin/Biotin Blocking Kit (Zymed)		
• Lösung A	Unverdünnt	30 Minuten bei RT
• Lösung B	Unverdünnt	30 Minuten bei RT
<i>Unspezifisch gegen hydrophobe –und elektrostatische Interaktionen</i>		
Aurion BSA-c, Rinderserumalbumin (Bio Trend)	0,2% Aurion BSA-c-Tris-Puffer Lösung herstellen, diese zur Primärantikörper Verdünnung verwenden	40 Minuten bei RT
Power Block, Casein (BioGenex)	1:10 in Tris Puffer verdünnen	8 Minuten bei RT

Tabelle 3: Verwendete Blockierungslösungen und deren Handhabung

3.14.6.3 Immunhistochemie an Paraffinschnitten

Während des Fixierungsvorgangs mit Formalin kommt es zu einer chemischen Veränderung der Antigene. Dies führt zu einer Antigenmaskierung, so dass das zu detektierende Antigen möglicherweise für den Antikörper nicht mehr erkennbar ist (Shi et al., 1997). Durch die Einführung der hitzeinduzierten Demaskierung konnte die Sensitivität der immunhistochemischen Detektion von verschiedenen in Formalin fixierten Antigenen wesentlich verbessert werden (Kim et al., 2004). Da diese Methode eine gängige Technik in der Pathologie sowie in der Histologie ist (Cattoretti et al., 1993; Morgan et al., 1994; Pileri et al., 1997; Werner et al., 1996), wurde sie auch für die Antigenerkennung von CKI δ angewandt und auf die Methode der enzymatischen Demaskierung verzichtet.

Nach Entparaffinierung der Schnittpräparate erfolgte die Hitzedemaskierung in der Mikrowelle. Zur Hitzedemaskierung wurden die Schnitte in eine Plastikkuvette gestellt und mit der entsprechenden Lösung bis zum oberen Küvettenrand aufgefüllt und erhitzt. Die Demaskierungslösungen sowie deren Handhabung sind im Anschluss in tabellarischer Form aufgeführt. Nach der Wärmebehandlung wurden die Präparate aus der Mikrowelle entfernt und bei geöffneter Plastikkuvette für 20 Minuten bei RT in der Demaskierungslösung abgekühlt.

Im Anschluss an die Demaskierungsbehandlung erfolgte die Spülung der Schnitte für jeweils 5 Minuten zweimal in ddH₂O. Zur Blockierung der endogenen Enzyme wurden die Paraffinschnitte auf die selbe Art wie die Gefrierschnitte mit Blockierungslösungen behandelt. Vor Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Präparate zweimal für jeweils 10 Minuten in Tris-HCl-Puffer gespült. Der Primärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung (siehe **Kapitel 3.4.1**) auf die Schnitte aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde durch zweimaliges Spülen für jeweils 10 Minuten in Tris-HCl-Puffer der Primärantikörper entfernt und die Detektion mit dem sekundären Antikörper durchgeführt.

Zur Detektion kam, wie auch bei den Gefrierschnitten, zum einen die LSAB-Methode und zum andern die Zweischnitt Methode von N-Histofine[®] zum Einsatz. Für die LSAB-Methode wurde nach Inkubation des Primärantikörpers zunächst der biotinylierte Sekundärantikörper aufgetragen und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneuter, zweimaliger Spülung mit Tris-HCl-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem enzymkonjugierten Streptavidin (Enzym: Peroxidase oder alkalische Phosphatase) für 30 Minuten bei RT.

Für die Zweischnitt Methode von N-Histofine[®] wurde der sekundäre Antikörper, konjugiert mit HRP oder AP, unverdünnt aufgetragen und für 30 Minuten bei RT inkubiert.

Nach erneutem, zweimaligem Spülen für jeweils 5 Minuten in Tris-HCl-Puffer wurden Chromogene für die Reaktionen mit Meerrettichperoxidase (DAB, AEC) oder mit alkalischer Phosphatase (Neufuchsin) zur Sichtbarmachung der Enzyme auf die Schnittpräparate aufgetragen. Die weitere Behandlung der Schnittpräparate, erfolgte in gleicher Weise wie bei den Gefrierschnitten beschrieben.

Tris-HCl-Puffer: 0,004% Triton-X-100, 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl

Demaskierungslösung	pH-Wert	Mikrowellenbehandlung
Citra Plus 10x (Bio Genex) • 1:10 verdünnen	6,03	Plastikküvette in Mikrowelle stellen; Lösung bei 450 Watt zum Kochen bringen; 20 Minuten bei 80 Watt Abkühlen für 20 Minuten
Citra Plus 10x (Bio Genex) • 1:10 verdünnen	6,03	Plastikküvette in Dampfkochtopf mit 600 ml ddH ₂ O stellen, beides in Mikrowelle; 15 Minuten bei 450 Watt 20 Minuten 150 Watt Abkühlen für 20 Minuten
AR-10 Solution 10x (Bio Genex) • 1:10 verdünnen	10,7	Plastikküvette in Mikrowelle stellen; Lösung bei 450 Watt zum Kochen bringen; 20 Minuten bei 80 Watt Abkühlen für 20 Minuten
Tris-Puffer	7,3	Plastikküvette in Mikrowelle stellen; Lösung bei 450 Watt zum Kochen bringen; 20 Minuten bei 80 Watt Abkühlen für 20 Minuten
TUF 3x concentrated • 1:3 verdünnen	5,70	Plastikküvette in Mikrowelle stellen; 20 Minuten bei 90°C, 150 Watt Abkühlen für 20 Minuten

Tabelle 4: Unterschiedliche Demaskierungslösungen und deren Handhabung.

3.14.6.4 Spezifitätskontrollen

Spezifität der angewandten Methode

Zum Ausschluss von methodisch bedingten unspezifischen Reaktionen wurden Spezifitätskontrollen durchgeführt. Die Negativkontrollen sollten daher mit anderen Reagenzien keine erkennbare Färbung aufweisen (Burry, 2000; Petrusz, 1983). In Negativkontrollen wurden die Primärantikörper ersetzt durch Puffer oder durch Präimmunsere (pre-NC10, pre-108), bzw. durch normales Serum (Non-Immunsere) für ab10877 (Abcam). Diese Seren wurden in der gleichen Verdünnung (siehe **Kapitel 3.4.1**) wie der jeweilige Primärantikörper eingesetzt und stammen aus der selben Spezies, nämlich Kaninchen (für NC10 und 108) oder Ziege (ab10877, Abcam). Diese Kontrollen wurden auf dieselbe Art und Weise fixiert und bearbeitet wie das zu vergleichende Präparat, welches mit NC10, 108 oder ab10877 (Abcam) inkubiert wurde.

Spezifität des verwendeten Antikörpers

Der Spezifitätsnachweis des verwendeten CKI δ spezifischen polyklonalen Antikörpers 108 wurde von Stöter et.al (Stöter et al., 2005) erbracht, diejenige von ab10877 durch die Firma Abcam gewährleistet.

Um die Spezifität des Antikörpers NC10 in der Immunhistochemie nachzuweisen, wurde die Immunreaktivität von NC10 durch kompetitive Hemmung mit dem zur Immunisierung benutzten Peptid getestet.

Der Antikörper NC10 wurde sowohl mit einem unspezifischen Peptid (Maus-p53; AS 4-15; Sequenz: MEESQSDISLELGGC,) als auch mit dem spezifischen Blockierungspeptid (Ratten-CKI δ , AS 404-418; Sequenz: CGDMASLRLHAARQGARC, (Behrend et al., 2000)) bei 4°C über einen Zeitraum von 3 Stunden, präinkubiert. Zuvor erfolgte die Bestimmung des molaren Gewichtes unter zu Hilfenahme des folgenden Computerprogrammes: Compute pI/Mw (www.expasy.ch): $MG_{p53\text{-Peptid}} = 1597,73 \text{ kDa} = 1597730 \text{ g/mol}$; $MG_{\text{CKI}\delta\text{-Peptid}} = 1916,22 \text{ kDa} = 1916220 \text{ g/mol}$. Die molare Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c = c_0 \text{ (g/l)} / MW \text{ (g/mol)}$$

Für c_0 (Konzentration) wurden für die beiden Peptide folgende Konzentrationen, die zur Präinkubation verwendet wurden, eingesetzt: 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$. Daraus ergaben sich die folgenden molaren Konzentrationen:

Ratten-CKI δ -Peptid: 0,1 $\mu\text{g/ml}$ = 52,2 pM; 1 $\mu\text{g/ml}$ = 522,0 pM; 10 $\mu\text{g/ml}$ = 5,22 nM

Maus-p53-Peptid: 0,1 $\mu\text{g/ml}$ = 62,59 pM; 1 $\mu\text{g/ml}$ = 625,89 pM; 10 $\mu\text{g/ml}$ = 6,26 nM

Nach Präinkubation der Peptide mit dem Antikörper NC10 erfolgte die immunhistochemische Detektion. Die Paraffinschnitte wurden zuvor mit der Demaskierungslösung TUF in der Mikrowelle behandelt. Anschließend erfolgte die Detektion nach der LSAB-Methode (siehe **Kapitel 3.14.6.3**).

3.14.6.5 Beurteilung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte

Eine Detektion von CKI δ in Gewebestrukturen äußert sich in einer, für das eingesetzte Chromogen typischen Farbreaktion (DAB: braun, AEC und Neufuchsin: rot). Es wurden Serienschnitte der Organe angefertigt und diese jeweils mit den CKI δ spezifischen Antikörpern (NC10, 108 und ab10877) behandelt. Die Intensität der Anfärbung wurde in 5 Kategorien eingeteilt: - negativ, -/+ blass, + schwach, + + gut und + + + stark. Die Ergebnisse sind im **Kapitel 4.2.3** jeweils in tabellarischer Form aufgeführt.

4 Ergebnisse

Mitglieder der CKI Familie, insbesondere die Isoformen δ und ϵ , beeinflussen die Aktivität zahlreicher regulatorischer Proteine, die Schlüsselfunktionen in proliferativen Prozessen und in apoptotischen Signalwegen wahrnehmen (Knippschild et al., 2005). Daher könnten Veränderungen in CKI-vermittelten Signaltransduktionswegen zur Entstehung von Tumoren beitragen. Inzwischen wurden in verschiedenen Tumoren Veränderungen in der CKI δ und ϵ Expression nachgewiesen (Frierson et al., 2002; Fuja et al., 2004; Maritzen et al., 2003; Stöter et al., 2005). Um pathologische Veränderungen in der Expression von CKI δ , insbesondere bei Tumorerkrankungen besser beurteilen zu können, ist es daher wichtig, zunächst detaillierte Aussagen über die Expression von CKI δ in Organen und Geweben unter physiologischen Bedingungen zu besitzen. Aus diesem Grund wurde die Gewebespezifische Verteilung von CKI δ in jungen adulten BALB/c Mäusen zunächst biochemisch und insbesondere unter morphologischen Aspekten mittels Immunhistochemie analysiert.

4.1 Expressions- und Aktivitätsnachweis von CKI δ mittels Western Blot-Analysen und Kinaseassays

Die hier aufgeführten Western Blot-Analysen, sowie die Kinaseaktivitätsbestimmungen wurden in Zusammenarbeit mit T. Maritzen, im Rahmen ihrer Diplomarbeit, durchgeführt. Zur Bestimmung der CKI δ Expressionsrate in Organen 4-6 Wochen alter BALB/c Mäuse, wurden diese entnommen, Zellysate hergestellt und jeweils gleiche Proteinmengen für Western Blot-Analysen eingesetzt. Wie aus **Abbildung 4** ersichtlich, lässt sich eine besonders hohe Expression von CKI δ der Lunge, des Pankreas, des Thymus, des ZNS, der Milz, des Ovars, des Nebenhodens und des Hodens, nachweisen. Für Muskelgewebe, Speicheldrüsen und Herz kann hingegen nur eine äußerst geringe Konzentration von CKI δ in den Lysaten detektiert werden. Eine mittelstarke Expression findet sich in der Leber und im Dünndarm. In einigen Fällen ist neben der bisher beschriebenen 49 kDa Bande für CKI δ eine zweite Bande erkennbar. Diese entspricht der hyperphosphorylierten, langsamer wandernden Form dieser Kinase, erkennbar in den Zellextrakten der Milz, des Ovars und des Thymus. Zusätzlich lassen sich in der Leber, Milz und den Speicheldrüsen Abbauprodukte von CKI δ

nachweisen. Hinsichtlich des Zellextraktes, der aus den Speicheldrüsen gewonnen wurde, ist anzumerken, dass nur noch Abbauprodukte von CKI δ nachweisbar sind (siehe auch (Maritzen et al., 2003)).

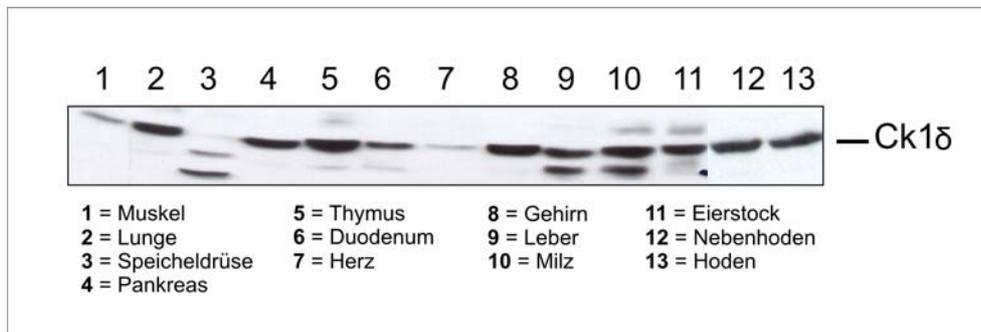


Abbildung 4: Detektion von CKI δ in Proteinlysaten unterschiedlicher Organe einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. Nach Homogenisierung des Gewebes, wurden jeweils 50 μ g Gesamtprotein in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die immunologische Detektion mit dem CKI δ -spezifischen, monoklonalen Antikörper IC128A (ICOS) und anschließender ECL-Reaktion.

Auch in den Organen, in denen die gleiche Proteinmenge von CKI δ nachweisbar ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich Unterschiede in der Aktivität von CKI δ zeigen. Aus diesem Grund wurden Zellextrakte mit gleicher Proteinkonzentration aus Hoden, ZNS, Ovar, Milz, Pankreas, Speicheldrüsen und Thymus über eine Anionenaustauschsäule aufgetrennt (siehe Material und Methoden) und die CKI δ Aktivität in Kinasierungsreaktionen in den einzelnen Fraktionen bestimmt. In den analysierten Organextrakten lässt sich, bis auf den Hoden, ein einzelner Peak an Kinaseaktivität darstellen, der bei einer NaCl-Konzentration von ca. 130 mM eluiert (siehe **Abbildung 5** und (Maritzen et al., 2003)). Die Kinaseaktivität ist in den Fraktionen des Milzlysats neunmal höher als die des Pankreas und des Thymus und ca. doppelt so hoch wie die Kinaseaktivität in den Lysaten des Hodens, ZNS und des Ovars. Dass die detektierte Kinaseaktivität auf CKI δ zurückzuführen ist, konnte zum einen dadurch gezeigt werden, dass CKI δ in der Kinasepeakfraktion im Western Blot nachweisbar ist und zum anderen dadurch, dass die Kinaseaktivität der Peakfraktion durch den CKI δ/ϵ spezifischen Inhibitor IC261 (Mashhoon et al., 2000) gehemmt werden konnte (Maritzen et al., 2003).

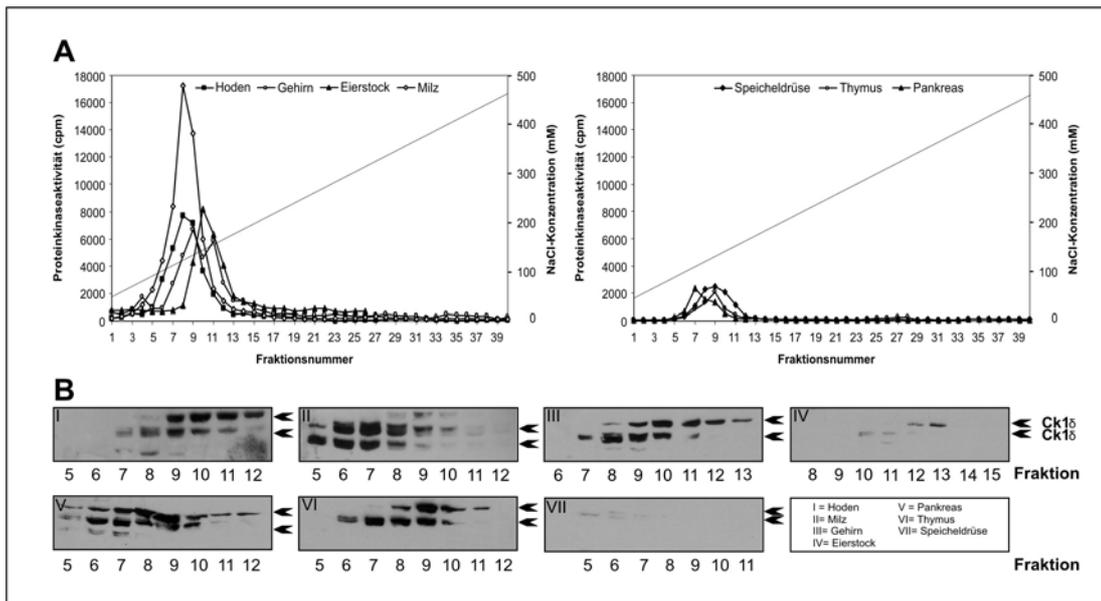


Abbildung 5: Charakterisierung der CKI δ Aktivität unterschiedlicher Organe einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. Gleiche Mengen an Proteinlysate aus unterschiedlichen Organen wurden in der Anionenaustauschchromatographie fraktioniert. Die Proteine wurden mit einem linear ansteigenden NaCl-Gradienten (dargestellt als durchgängige Diagonale) eluiert. Jeweils 2 μ l der Peakfraktionen wurden in *in vitro* Kinasierungen mit dem Substrat FP267 verwendet. **A:** *In vitro* Kinasierung von FP267. Schematische Darstellung der *in vitro* Kinaseaktivität in Proteinlysaten unterschiedlicher Organe. **B:** Nachweis von CKI δ in den eluierten Peakfraktionen. Nach der Konzentration der Peakfraktionen, der Auftrennung in der SDS-PAGE und dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde CKI δ mit dem monoklonalen Antikörper IC128A (ICOS) detektiert.

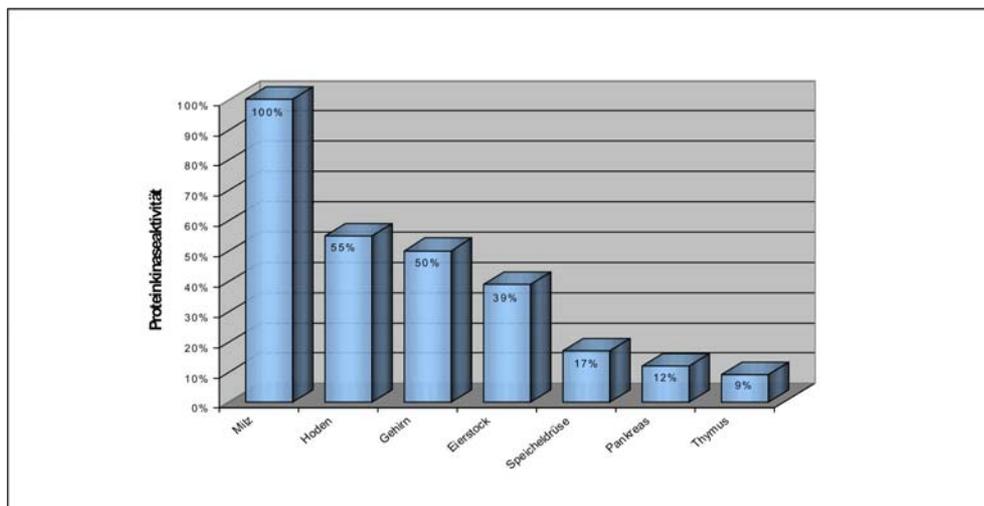


Abbildung 6: Darstellung der CKI δ Aktivität unterschiedlicher Organe einer 5 Wochen alten BALB/c Maus im Balkendiagramm. Die Quantifizierung der Kinaseaktivität erfolgte nach der Auftrennung der Reaktionen in der SDS-PAGE durch Cherenkov-Zählung der aus den Gelen ausgeschnittenen, getrockneten Substraten. Die Höchste detektierbare Kinaseaktivität (Milz) wurde mit 100% gleichgesetzt.

4.2 Expressionsnachweis von CKI δ in Gewebeschnitten der Maus

Der Nachweis der CKI δ Expression aus den Proteinlysaten verschiedener Organe lässt jedoch keinerlei Rückschlüsse auf die Verteilung von CKI δ in den einzelnen Zellen eines Organs zu. Daher wurde die Gewebe-spezifische Lokalisation von CKI δ unter morphologischen Aspekten mittels immunhistochemischer Techniken untersucht. Es wurden Methoden etabliert, mit denen CKI δ in den einzelnen Organen 4-6 Wochen alter BALB/c Mäuse in Gefrierpräparaten und paraffineingebettetem Gewebe nachgewiesen werden konnten.

4.2.1 Nachweis der CKI δ Expression in Gefrierschnitten

Um ein Antigen mit immunhistochemischen Methoden detektieren zu können, muss gewährleistet sein, dass das nachzuweisende Antigen während des Fixierungsvorgangs erhalten bleibt. Da sich in Gefrierschnitten im Gegensatz zu paraffineingebettetem Gewebe auch labile Antigene nachweisen lassen, wurden zunächst Gefrierschnitte von Organen 4-6 Wochen alten Mäusen angefertigt.

Zum Nachweis von CKI δ in den Aceton fixierten Gefrierschnitten wurden die CKI δ -spezifischen polyklonalen Antikörper NC10 (Behrend et al., 2000), 108 (Stöter et al., 2005) und ab10877 (Abcam) eingesetzt (siehe Kapitel Material und Methoden). Eines der häufigsten Probleme in der Immunhistochemie ist das Auftreten einer Hintergrundfärbung. Trotz der Fixierung und Einbettung des Untersuchungsmaterials wird die endogene Enzymaktivität im Gewebe nicht völlig zerstört. Diese Problematik betrifft sowohl die Enzyme Peroxidase und alkalische Phosphatase als auch das Vitamin Biotin. Daher sind für die immunhistochemischen Nachweise Blockierungen der endogenen Enzyme notwendig, um deren Mitreaktion und somit falsch positive Ergebnisse zu verhindern. Ebenfalls können elektrostatische und hydrophobe Interaktionen, zu einer unspezifischen Anfärbung führen. Um dem entgegenzuwirken, wurden die Präparate mit entsprechenden Lösungen inkubiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Tabelle 5** zusammengefasst. Eine Blockierung der endogenen Enzyme, alkalische Phosphatase, Peroxidase sowie von Biotin ist bei der Verwendung der jeweiligen Detektionssysteme notwendig. Unspezifische Bindungen scheinen beim Nachweis von CKI δ keine wesentliche Rolle bezüglich der Hintergrundreaktivität zu spielen.

Ebenfalls können, besonders bei Gefrierschnitten, unspezifische Hintergrundreaktionen auftreten, die auf das Vorhandensein von Fc-Rezeptoren auf Zelloberflächen zurückzuführen sind, an welche die Antikörper binden könnten (Boenisch, 2003). Um die mögliche Bindung an Fc-Rezeptoren zu verhindern wurde anstelle von ganzen IgG-Molekülen, F(ab')₂-Fragmente verwendet. Jedoch zeigt sich hierbei kein Unterschied zwischen IgG-Sekundärantikörpern und den F(ab')₂-Fragmenten bezüglich der Hintergrundfärbung (siehe auch **Tabelle 5**).

Blockierungslösung	Reduktion der Hintergrundreaktivität
Spezifisch gegen endogene alkalische Phosphatase • Levamisole	++
Spezifisch gegen endogene Peroxidase : • Peroxidase-Blockierungsreagenz (DAKO)	++
Spezifisch gegen endogenes Biotin: • Uni-Block (BioGenex) • Avidin/Biotin Blocking Kit (Zymed)	+++ +
Unspezifisch gegen hydrophobe- und elektrostatische Interaktionen: • Power Block, Casein (BioGenex) • Aurion BSA-c, Rinderserumalbumin (Biotrend)	- -
Anti- IgG F(ab')₂-Fragment	
• Anti-Rabbit IgG F(ab') ₂ biotinyliert (DAKO)	-

Tabelle 5: Reduktion der Hintergrundreaktivität an Gefrierschnitten durch unterschiedliche Blockierungsreagenzien. Die Abnahme der Hintergrundreaktivität wurde anhand behandelte Schnitte im Vergleich zu unbehandelten Schnitten mit der folgenden Zeichenbeschreibung der Tabelle evaluiert: - negativ, kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Schnitten; + wenig Minimierung des Hintergrundes; ++ deutliche Minimierung des Hintergrundes; +++ starke Minimierung des Hintergrundes.

Infolge des schlechten morphologischen Erhalts der Gefrierschnittpräparate ist eine präzise Interpretation hinsichtlich der Lokalisation von CKI δ sehr schwierig. Um eine genauere Aussage zur zellulären Verteilung von CKI δ treffen zu können wurden daher Paraffinschnitte zum Vergleich herangezogen. Als Voraussetzung hierfür müsste jedoch ein vergleichbar guter Antigenhalt in Paraffinschnitten gegeben sein wie dies der Fall ist für Gefrierschnitte. Diese Voraussetzung ist erfüllt und in **Abbildung 7** dargestellt. Daher wurde bewusst auf eine detaillierte Beschreibung der Markierungsergebnisse der Gefrierschnitte

bezüglich der Lokalisation von CKI δ in den verschiedenen Geweben verzichtet. Eine ausführliche Beschreibung der Ergebnisse erfolgt im **Kapitel 4.2.3**.

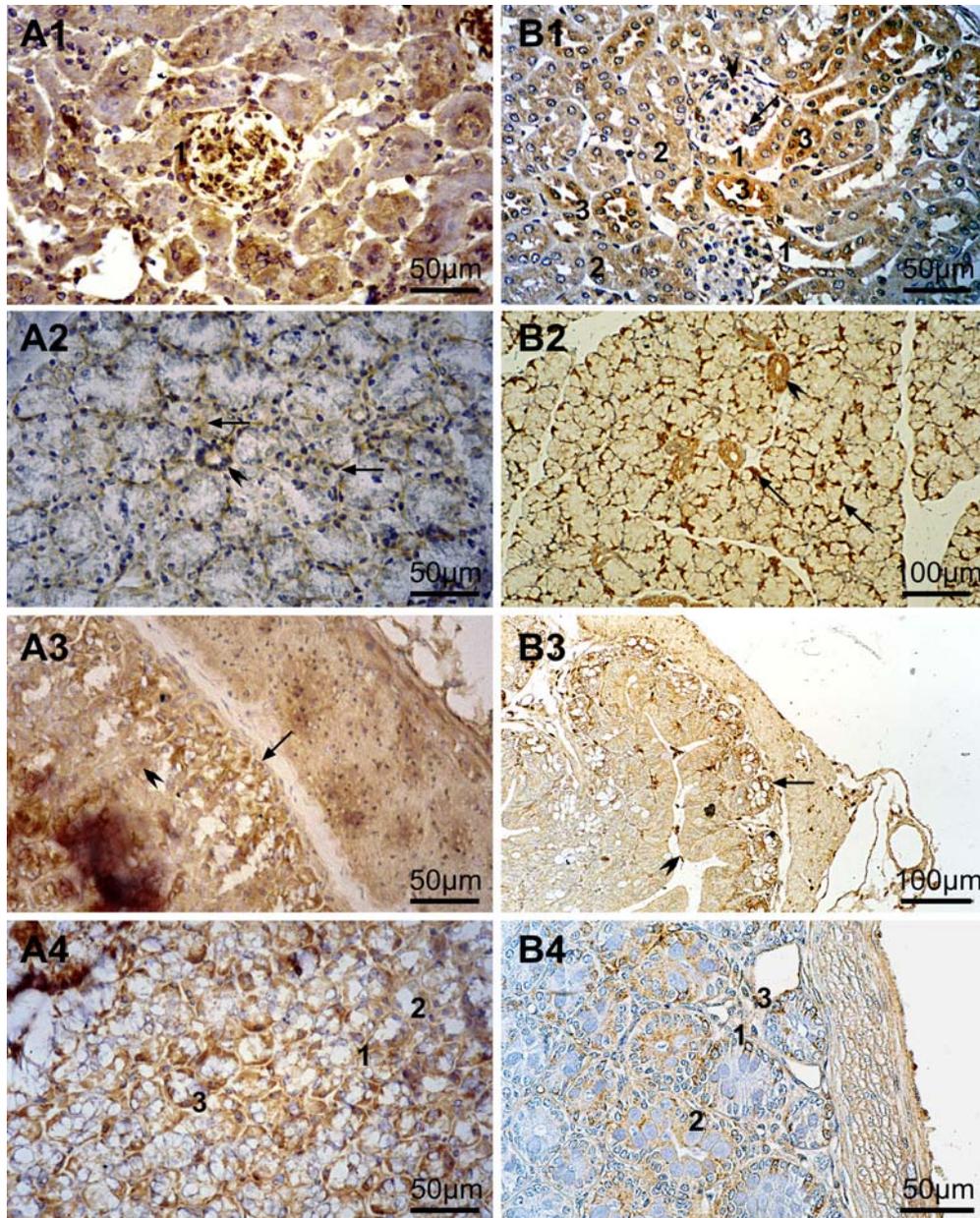


Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in Gefrierschnitten (A) und in paraffineingebettetem Gewebe (B). Peroxidase-reaktion, Farbstoff DAB. **(A1/B1): Nachweis von CKI δ in der Niere einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.** Detektion von CKI δ durch den Antikörper ab10877 (Abcam). **(A1):** Gefrierschnitt. **B1:** Paraffinschnitt, Immersionsfixation mit saurem Formalin. Vergr. jeweils 100fach. Im Paraffinschnitt zeigen die Podozyten (Pfeil) der Glomeruluskapillaren wie auch die Endothelzellen (Pfeilspitze) eine CKI δ Expression. Im Gefrierschnitt zeigen die Glomeruluskapillaren eine positive Markierung. Jedoch ist eine genaue Zuordnung der Zellen der Glomeruluskapillaren aufgrund der schlechteren Morphologie nicht möglich. Am Harnpol des Glomerulums zeigt sich im Gefrier- als auch im Paraffinschnitt eine CKI δ Markierung im Zytoplasma der proximalen Tubulusepithelien (1). Im Gefrierschnitt (A1) lässt sich eine CKI δ Expression im Zytoplasma, der das Glomerulum umgebenden Tubuli nachweisen. Eine genaue Zuordnung ist aufgrund der schlechteren Morphologie nicht möglich. Im Paraffinschnitt (B1) lässt sich die CKI δ Expression im Zytoplasma der Tubuli hingegen zuordnen, in positiv markierte Tubuli proximales (2) und Tubuli distales (3).

(A2/B2): Nachweis von CKI δ in der Glandula sublingualis einer 5 Wochen alten BALB/c Maus (siehe Seite 56). Detektion von CKI δ durch das Antiserum 108. **(A2:** Gefrierschnitt. Vergr. 100fach. **B2:** Paraffinschnitt. Perfusionsfixation mit saurem Formalin. Vergr. 50fach). Positive Markierung von CKI δ im Zytoplasma der, den mukösen Drüsentubuli aufsitzenden, serösen Kappen (Pfeil). Das Zytoplasma des Gangepithels (Pfeilspitze) stellt sich ebenfalls CKI δ -positiv dar. **(A3,4/B3,4): Nachweis von CKI δ im Colon (siehe Seite 56).** Detektion von CKI δ durch das Antiserum NC10. **(A3, A4:** Gefrierschnitt. Vergr. 100fach. **B3, B4:** Paraffinschnitt. Perfusionsfixation mit saurem Formalin). Vergr. 50fach (B3) Vergr. 100fach (B4). **(A3/B3):** Längsschnitt durch das Colon. In der Tiefe der Krypten zeigen die Zellen eine starke CKI δ positive zytoplasmatische Markierung (Pfeil), wohingegen das Zytoplasma der Saumzellen eine abgeschwächtere Markierung aufweist (Pfeilspitze). **(A4/B4):** Im Querschnitt durch die Krypten des Colons ist eine deutliche CKI δ positive zytoplasmatische Markierung der Schleimbecherzellen erkennbar (1), wohingegen das Zytoplasma der Saumzellen (2) eine abgeschwächtere Färbintensität aufweist. Vereinzelt finden sich auch enteroendokrine Zellen in der Wand der Krypten, diese zeigen ein starkes CKI δ positives Reaktionsmuster in ihrem Zytoplasma (3).

4.2.2 Nachweis der CKI δ Expression in Paraffinschnitten

In der Routine ist der bei weitem größte Anteil von Proben, die immunhistochemisch gefärbt werden, in Paraffin eingebettet. Dies ist darauf zurückzuführen, das bei diesem Verfahren die morphologischen Details des zu untersuchenden Gewebes besser erhalten bleiben als bei Gefrierschnitten. Durch den Einsatz von Paraffinschnitten soll eine genauere Aussage bezüglich der zellulären Verteilung von CKI δ in den einzelnen Geweben ermöglicht werden. Um die Nachteile dieser Methode zu minimieren, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. In den nachfolgenden Kapiteln werden die unterschiedlichen Ansatzpunkte näher erörtert.

4.2.2.1 Optimierung der Antigenerkennung in Paraffin eingebettetem Gewebe

Zur Detektion von CKI δ , in den Paraffin-eingebetteten Geweben, wurden wie auch in den Gefrierschnitten die polyklonalen Antikörper NC10, 108 und ab10877 (Abcam) eingesetzt (siehe Kapitel Material und Methoden). Um für die immunhistochemische Reaktion an Paraffinschnitten jedoch ein möglichst gutes Färbeergebnis erzielen zu können, muss gewährleistet sein, dass das zu detektierende Antigen von seinem Antikörper erkannt wird. Um einer Autolyse und die damit verbundene Zerstörung des Antigens entgegenzuwirken, ist es wichtig, dass die Fixierung möglichst schnell nach der Gewebeentnahme stattfindet.

Des weiteren spielt die Art der Fixierung sowie die chemische Zusammensetzung der Fixative, eine wichtige Rolle in bezug auf den Erhalt bestimmter Antigene (Beckstead, 1994; Johnson et al., 1978; Kan et al., 2005; Leong, 2004; Miller et al., 2000). Angesichts der Tatsache, dass in Stress-Situationen eine Hochregulation von CKI δ beschrieben wurde (Knippschild et al., 1997), muss gewährleistet sein, dass ein Expressionsmuster erreicht

wird, welches dem physiologischen Zustand möglichst nahe kommt. Bei der Organpräparation, die vor der Immersionsfixation stattfindet, könnte ein Stresszustand entstehen, der die CKI δ Expression verstärkt. Daher wurde in dieser Arbeit anhand verschiedener Gewebeproben von 4-6 Wochen alten BALB/c Mäusen nicht nur die unterschiedlichen Fixierungslösungen, sondern auch die unterschiedlichen Arten der Fixierung miteinander verglichen. Es wurde die Immersionsfixation gegenüber der Perfusionsfixation überprüft. Die Auswirkungen der unterschiedlichen Fixierungslösungen sowie Fixierungsmethoden auf die Morphologie und den Antigenerhalt sind in **Tabelle 6** dargestellt.

Fixierungslösung	Antigenerhalt	Morphologie
Perfusionsfixation		
• Bouin Lösung	++ (+)	+++
• Saures Formalin (4%)	++ (+)	+++
• Neutral gepuffertes Formalin (10%)	++	+++
Immersionfixation		
• Bouin Lösung	++	+++
• Saures Formalin (4%)	++	+++
• Neutral gepuffertes Formalin (10%)	+(+)	+++
• Carnoyfixation	--	++
• Zinkfixation	+(+)	-
• Glyo Fixx (Shandon)	+	++
• Zinc Formal-Fixx (Shandon)	(+) Myelin: +++	++
• Notox Histological Fixative (Quartett)	-/+	++

Tabelle 6: Gewebefixation: Vergleich verschiedener Fixierungslösungen, sowie verschiedener Fixierungsmethoden. Die Färbeintensität des nachzuweisenden Antigens (CKI δ), sowie die Morphologie wurden mit der folgenden Zeichenbeschreibung der Tabelle evaluiert: - negative Färbung bzw. sehr schlechte Morphologie, -/+ blasse Färbeintensität bzw. schlechte Morphologie, + schwache Färbeintensität bzw. moderate Morphologie, ++ gute Färbeintensität bzw. gute Morphologie, +++ starke Färbeintensität bzw. sehr gute Morphologie. Der immunhistochemische Nachweis erfolgte jeweils mit den CKI δ spezifischen Antikörpern NC10, 108, ab10877 (Abcam).

Wie aus **Tabelle 6** ersichtlich, sind die optimalsten Bedingungen hinsichtlich des Antigenerhaltes von CKI δ in der Perfusionsfixation zu finden. Als Fixierungsreagenzien sind die Bouinlösung und das saure Formalin den anderen Reagenzien vorzuziehen, da hier neben dem optimalen Antigenerhalt, auch der bestmögliche Erhalt der morphologischen Details des zu untersuchenden Gewebes gegeben ist. Jedoch ist anzumerken, dass zum Nachweis der CKI δ Detektion in der Leber sowohl die Art der Fixationsmethode als auch das verwendete Fixierungsreagenz eine Rolle zu spielen scheint. Eine ausführliche Beschreibung dieses Phänomens erfolgt im **Kapitel 4.2.3.3** und ist aus **Abbildung 18** des genannten Kapitels ersichtlich. Unterschiede in der Art der verwendeten Fixierungslösungen, jedoch nicht der Art der Fixierungsmethode, spiegeln sich ferner bei der Untersuchung des ZNS wider (siehe **Tabelle 6**). Bei Zinc Formal-Fix (Shandon) handelt es sich, um die geeignetste Fixierungslösung für den Nachweis einer CKI δ Expression in den Myelinscheiden (Abbildung nicht gezeigt).

Ein weiterer Aspekt in bezug auf die Antigenerkennung ist die chemische Veränderung der Antigene, die vor allem während der Fixierung mit Formalin beschrieben wurde (Shi et al., 1997). Aus diesem Grund wurde an allen Paraffinschnitten eine hitzeinduzierte Demaskierung in einem Mikrowellen-Ofen durchgeführt (Leong, 2002; MacIntyre, 2001; Shi et al., 1991) (siehe Kapitel Material und Methoden). Die Durchführung der entsprechenden Demaskierungen mittels unterschiedlicher Lösungen, erfolgte nach entsprechenden Protokollen des Herstellers (siehe Kapitel Material und Methoden). Die Ergebnisse sind in **Tabelle 7** dargestellt. Als Kontrollen dienten jeweils Schnitte ohne entsprechende Antigenmaskierung (Shi et al., 2001). Da diese eine zum Teil nur sehr schwache oder keine Markierung aufweisen, wurden diese Kontrollen in der Tabelle nicht mit aufgeführt.

Für die hitzeinduzierte Demaskierung ist es wichtig, die optimale chemische Zusammensetzung sowie den entsprechenden pH-Wert der Lösung, als auch die bestmögliche Hitzebedingungen zu finden (Leong, 2004; Shi et al., 1997; Shi et al., 2001; Yamashita und Okada, 2005). Die bekannteste und gängigste Antigenmaskierungslösung stellt der Citrat-Puffer dar (Brown und Chirala, 1995; Cuevas et al., 1994; Leong, 1996; Leong, 2002). Für die Detektion von CKI δ ist der Citrat-Puffer (pH 6,0) allen anderen erhältlichen Lösungen vorzuziehen, da sich mit der hier verwendeten Citra Plus Solution (Bio Genex) für alle 3 verwendete Antikörper gute Färbintensitäten erzielen lassen. Eine Ausnahme stellt jedoch das Antiserum NC10 dar. Hier zeigt sich eine stärkere Anfärbbarkeit

der Kinase mit der kommerziellen Demaskierungslösung TUF (Target Unmasking Fluid, PanPath). Unterschiede zeigen sich auch in den zu bevorzugenden Hitzebedingungen der hitzeinduzierten Demaskierung. In der Literatur werden eine Reihe von Methoden beschrieben, um eine effektive Hitze zur Antigenwiederherstellung zu erlangen, wie z.B. die Verwendung eines Mikrowellen-Ofens, Dampfkochtopfes, Wasserbads, Autoklaven und sogar einer schwedischen Sauna (Leong, 2002). Vom Standpunkt der Ökonomie, der Praktikabilität und der bisherigen Überzeugung ist die Methode der Wahl, die des Gebrauchs von einem Mikrowellen-Ofen oder eines Dampfkochtopfes (Kim et al., 2004; Shi et al., 1997). Wie aus der **Tabelle 7** ersichtlich, konnte für das Antiserum 108 mit einer alleinigen Mikrowellenbehandlung keine bis nur geringe Detektion von CKI δ erzielt werden. Aus diesem Grund wurde eine Hitzedemaskierung in der Mikrowelle mittels Dampfkochtopfes durchgeführt, welche sich für diesen Antikörper als die Methode der Wahl erweist. Für die Detektion von CKI δ durch den Antikörper ab10877 (Abcam) reicht die alleinige Erhitzung in der Mikrowelle aus, um optimale Färbeergebnisse zu erzielen. Um CKI δ durch das spezifische Antiserum NC10 nachzuweisen, ist eine konstante Hitze in der Mikrowelle bei 90°C einzuhalten, wie sie für den Gebrauch der TUF-Lösung erforderlich ist.

Demaskierungslösung	AK NC10	AK 108	AK ab10877
TUF (Target unmasking fluid) (Kreatech) • pH 5,70	+++	- bis -/+	+
Citra Plus 10x (Biogenex) • pH 6,0	++	-/+ +++ (mit Dampfkochtopf in der Mikrowelle)	+++
AR-10 solution 10x (Biogenex) • pH 10,7	-/+	- bis -/+	-/+
Tris-Puffer • pH 7,3	+	- bis -/+	+

Tabelle 7: Hitzeinduzierte Demaskierung in der Mikrowelle mit verschiedenen Demaskierungslösungen. Die Detektion von CKI δ wurde anhand der Färbeintensität des jeweils verwendeten Antikörpers mit der folgenden Skalierung, die in der Tabelle aufgeführt ist, evaluiert: - negativ, -/+ blass; + schwach, ++ gut, +++ stark.

Zudem wurde die Stabilität des zu untersuchenden Antigens (CKI δ) bereits geschnittener Präparate untersucht (Atkins et al., 2004). So ist bei einer Lagerung bei Raumtemperatur ein Antigenverlust von CKI δ innerhalb von 2 Wochen nachweisbar, wohingegen ein Verlust des Antigens bei einer Lagerung bei 4°C nach einem Monat eintritt. Dieser Verlust der Antigenität von CKI δ kann auch nicht durch eine hitzeinduzierte Demaskierung behoben werden.

4.2.2.2 Kontrolle der Spezifität der angewandten Methode

Positive und negative Kontrollen in der Immunhistochemie sind notwendig, um die Methodik und die dabei verwendeten Reagenzien zu überprüfen. Somit soll sichergestellt werden, dass weder falsch positive noch negative Interpretationen getroffen werden.

Da diese Arbeit erstmals einen immunhistochemischen Nachweis von CKI δ unter physiologischen Bedingungen aufzeigt und zu Beginn dieser Arbeit keine Daten über die spezifische Gewebeverteilung dieser Kinase vorlagen, wurde als Positivkontrolle der Nachweis von CKI δ mit verschiedenen Antikörpern (NC10, 108, ab10877) herangezogen (Burry, 2000; Josephsen et al., 1999), die gegen das gleiche Protein gerichtet sind. In gleichen Geweben sollten die gleichen Strukturen, unabhängig davon welcher der drei Antikörper eingesetzt wurde, markiert werden. Dies ist für die verwendeten CKI δ spezifischen Antikörper zutreffend und exemplarisch in **Abbildung 8** dargestellt.

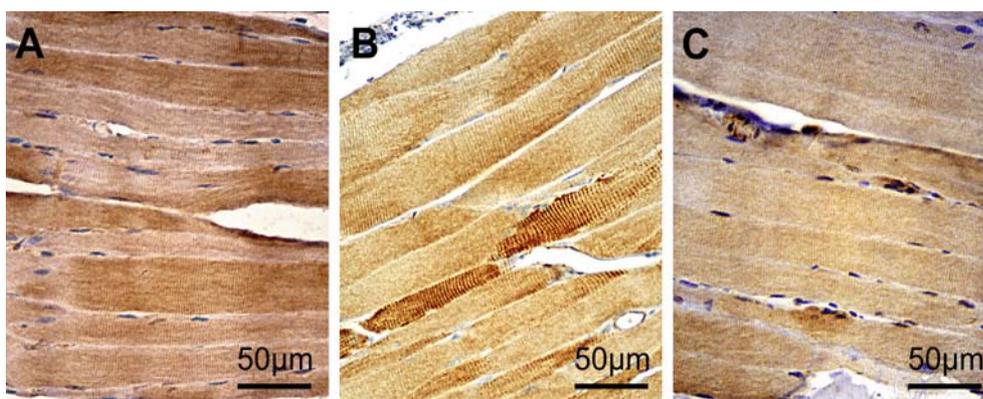


Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ der quergestreiften Skelettmuskulatur einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Längsschnitt. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Positive CKI δ Expression der Myofibrillen. Detektion von CKI δ durch die 3 verschiedenen Antikörper: **(A): NC10.** Immersionsfixation mit saurem Formalin. **(B): 108.** Perfusionsfixation mit Bouin. **(C): ab10877** (Abcam). Immersionsfixation mit saurem Formalin. Vergr. jeweils 100fach.

Zum Ausschluß von methodisch bedingten unspezifischen Reaktionen, wurden Negativkontrollen durchgeführt. In diesen wurden die Primärantikörper ersetzt durch Puffer oder Präimmunsere (pre-NC10, pre-108), bzw. durch normales Serum (Non-Immunsere) für ab10877 (Abcam) (siehe Material und Methoden). Wie anhand der folgenden Abbildungen zu erkennen ist (**Abbildung 9**), kann sowohl bei der Non-Immunsere Kontrolle, als auch bei den Präimmunsere, keine spezifische Markierung nachgewiesen werden. Vereinzelt, d.h. nicht homogen im Gesamtpräparat verteilt, kommen Strukturen zur Darstellung, die eine angedeutete, jedoch unspezifische Markierungen aufzeigen. Bezüglich der Färbintensität weisen diese Strukturen eine deutlich schwächere Färbung auf als die Präparate, die mit CKI δ spezifischen Antikörpern inkubiert wurden. Die Präparate, die mit Pufferlösung inkubiert wurden, zeigen hingegen keinerlei Markierungsmuster. Da die Kontrollen keine spezifische Markierung, bzw. keinerlei Übereinstimmung mit dem Markierungsmuster der Primärantikörper NC10, 108 und ab10877 (Abcam) aufweisen, kann eine unspezifische Bindung von Kaninchenproteinen bzw. Ziegenproteinen, sowie eine endogene Peroxidaseaktivität ausgeschlossen werden.

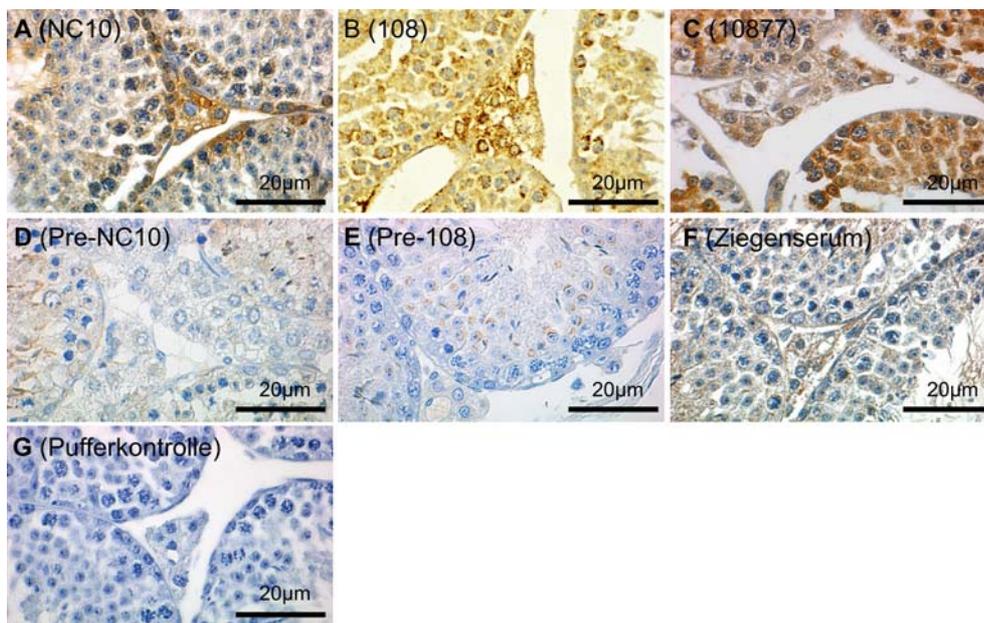


Abbildung 9: Nachweis der Spezifität der CKI δ Immunoreaktivität im Hoden einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Immersionsfixation mit saurem Formalin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Detektion von CKI δ durch den Antikörper NC10. CKI δ positive Markierung im Zytoplasma der Leydigzellen, als auch im Zytoplasma der Spermatozyten. **(B):** Detektion von CKI δ durch den Antikörper 108. CKI δ positive Markierung im Zytoplasma der Leydigzellen. Eine zytoplasmatische CKI δ Markierung findet sich zudem in den Spermatozyten und Spermatozyten I. **(C):** Detektion von CKI δ durch den Antikörper ab10877 (Abcam). CKI δ positive Markierung im Zytoplasma einzelner Leydigzellen. Ebenfalls eine CKI δ -positive zytoplasmatische Färbung findet sich in den Spermatozyten und Spermatozyten I. **(D):** Inkubation mit dem NC10-Präimmunsere aus dem Kaninchen. Die Leydigzellen weisen vereinzelte Spermatozyten eine schwache zytoplasmatische Markierung auf. Negativ stellen sich die Spermatozyten dar. **(E):** Inkubation mit dem 108-Präimmunsere aus dem Kaninchen. Die Leydigzellen weisen wie

auch die Spermatiden und Spermatogonien keinerlei Markierung auf. Vereinzelt Spermatozyten zeigen hingegen eine sehr schwache, heterologe perinukleäre Markierung. (**F**; siehe **S.62**): Inkubation mit normalem Ziegen Serum. In vereinzelt Zellen unspezifische Hintergrundreaktivität, jedoch ist keine spezifische Markierung erkennbar. (**G**; siehe **S.62**): Inkubation mit Puffer-Lösung. Keine Markierung nachweisbar. Vergr. jeweils 400fach.

4.2.2.3 Kontrolle der Spezifität der verwendeten Antikörper

Neben der Kontrolle der Spezifität der Methode ist es wichtig, auch die Spezifität des verwendeten Primärantikörpers zu untersuchen (Burry, 2000). Die Spezifität von NC10 konnte bereits anhand von Western Blot-Analysen nachgewiesen werden (Behrend et al., 2000). Um die Spezifität von NC10 in der Immunhistochemie nachzuweisen, wurde die Immunreaktivität von NC10 durch kompetitive Hemmung mit dem zur Immunisierung benutztem Peptid getestet (siehe Material und Methoden).

Der Antikörper NC10, wurde sowohl mit einem für CKI δ unspezifischen Peptid (p53) als auch mit einem spezifischen Blockierungspeptid (CKI δ) präinkubiert. Zur Detektion wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen des spezifischen sowie des unspezifischen Peptid-Antikörpergemisches eingesetzt: 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 1,0 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$. Als Kontrolle wurde ein Schnitt mit NC10 in der üblichen Verdünnung mitgeführt.

Durch die Behandlung der Schnitte mit dem unspezifischen Peptid-Antikörpergemisch, war eine CKI δ Detektion weiterhin möglich. Diese zeigte das gleiche Markierungsmuster, sowie die gleiche Färbintensität wie das NC10-Referenz-Präparat (siehe **Abbildung 10: A1, A2, A3** und **C**). Die Schnitte, bei denen eine Präabsorptionskontrolle durch das spezifische Peptid-Antikörpergemisch durchgeführt wurde, weisen hinsichtlich der Intensität der Markierung deutliche Unterschiede auf. Wie in **Abbildung 10 (B1, B2** und **B3)** dargestellt, lässt sich die stärkste Hemmung bei einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ des spezifischen Peptid-Antikörpergemisches nachweisen. Bei einer Inkubation mit 1,0 $\mu\text{g/ml}$ des spezifischen Peptid-Antikörpergemisches ist noch eine deutlich abgeschwächte Markierung erkennbar, wohingegen bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ die Intensität der Markierung wieder zunimmt. Eine komplette kompetitive Hemmung von CKI δ ist jedoch bei keiner der verwendeten Konzentrationen feststellbar.

Der Spezifitätsnachweis des verwendeten CKI δ -spezifischen polyklonalen Antikörpers 108 wurde von Stöter et al. (Stöter et al., 2005) erbracht. Die Spezifität von ab10877 wurde durch die Firma Abcam gewährleistet.

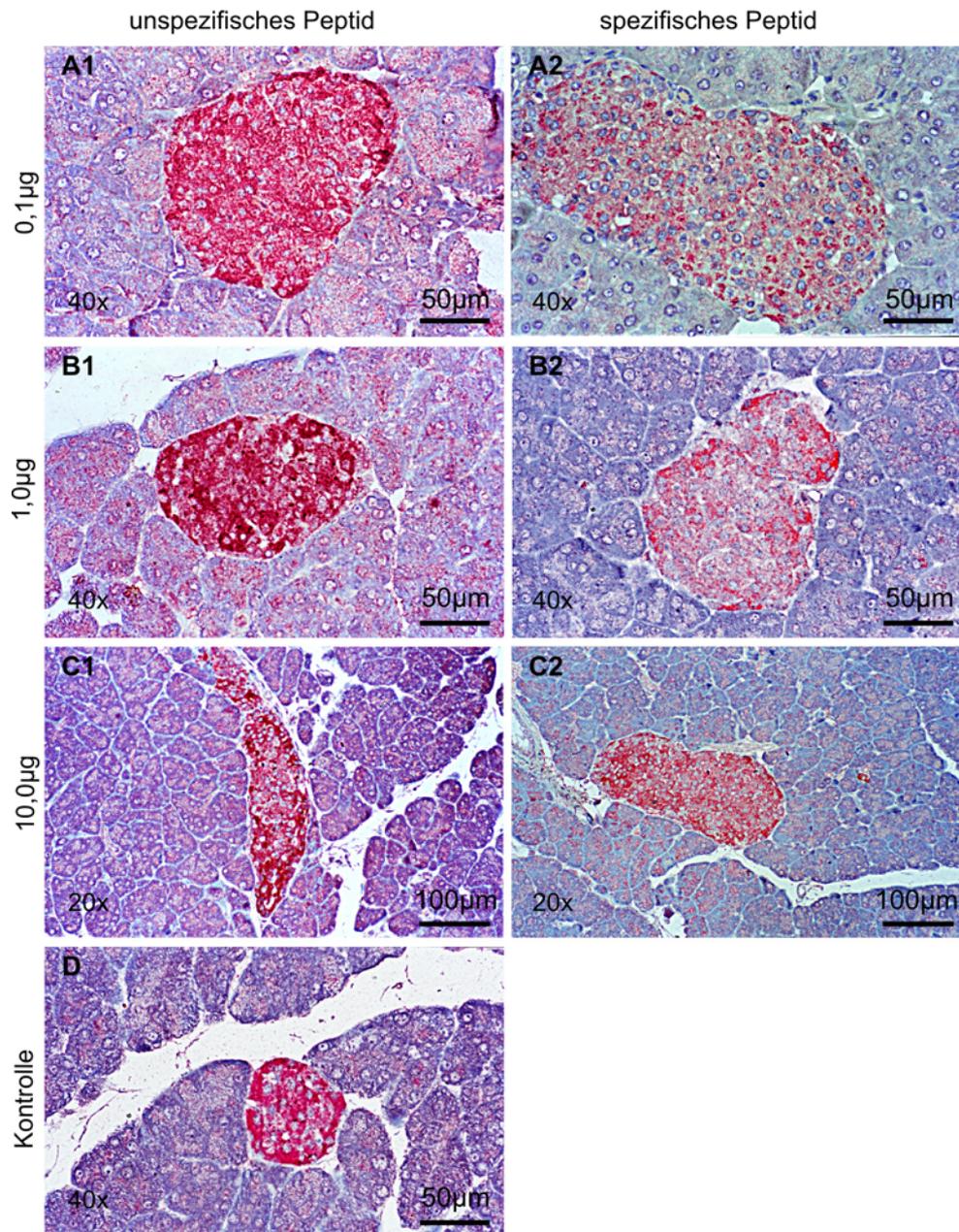


Abbildung 10: Reduktion der CKI δ Immunreaktivität durch kompetitive Hemmung im Pankreasgewebe einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. (A): Präabsorptionskontrolle mit unspezifischem Peptidgemisch (p53-Peptid, präinkubiert mit dem CKI δ spezifischen Antikörper NC10). **(B):** Präabsorptionskontrolle mit spezifischem Peptidgemisch (CKI δ spezifisches Peptid, präinkubiert mit dem CKI δ spezifischen Antikörper NC10). **(C):** Inkubation mit dem CKI δ spezifischen Primärantikörper NC10, ohne Peptidpräinkubation (NC10 Kontrolle). Immersionsfixation mit saurem Formalin. Alkalische Phosphatase Reaktion, Farbstoff Neufuchsin. Die Inkubation mit dem unspezifischen Peptidgemisch in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ **(A1)** zeigt eine intensive Markierung des Zytoplasmas der Inselzellen, sowie eine Markierung des Azinazytoplasmas. Das gleiche Markierungsmuster mit gleicher Intensität findet sich bei einer Inkubation des unspezifischen Peptidgemisches in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ **(A2)** und 10 $\mu\text{g/ml}$ **(A3)**. Die Inkubation mit dem spezifischen Peptidgemisch in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ **(B1)** weist dagegen die Schwächste CKI δ Markierung des Inselzellzytoplasmas, sowie eine kaum noch vorhandene Markierung des Zytoplasmas der Azini auf. Bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ spezifischen Peptidgemisches **(B2)** ist eine geringe Zunahme der Färbintensität der markierten Strukturen im Vergleich zu der eingesetzten Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ des spezifischen Peptidgemisches zu erkennen. Im Vergleich zu dem unspezifischen Peptidgemisch in der selben Konzentration (siehe A2) ist die Färbintensität der Markierung durch das spezifische Peptidgemisch jedoch deutlich schwächer. Die Inkubation mit dem spezifischen Peptidgemisch in einer

Konzentration von 10 µg/ml (**B3; siehe S.64**) zeigt im Vergleich zu den unter B1 und B2 beschriebenen Konzentrationen eine Zunahme der Färbintensität. Ohne Peptidinkubation des Primärantikörper NC10 als Kontrolle (**C; siehe S.64**) zeigt sich die für CKIδ typische Markierung, stark positiv angefärbtes Zytoplasma der Inselzellen sowie eine abgeschwächtere Markierung im Zytoplasma der Azini. A1, B1, A2, B2 und C Vergr. jeweils 100fach. A3 und B3 Vergr. jeweils 50fach.

4.2.3 Lokalisation von CKIδ in den verschiedenen Organen der Maus

Da diese Arbeit einen Überblick hinsichtlich der Expression von CKIδ in den unterschiedlichen Geweben 4-6 Wochen alter BALB/c Mäuse geben soll, wurden zunächst alle Organe, soweit möglich, entnommen und immunhistochemisch untersucht. Um eine gute Übersicht zu gewährleisten, wurden die einzelnen Organe in Organsysteme zusammengefasst und in tabellarischer Form aufgeführt. Wenn nicht ausdrücklich beschrieben, weisen alle drei verwendeten Antikörper das gleiche Markierungsmuster hinsichtlich der CKIδ Expression auf. Daher wird in den abgebildeten Organen exemplarisch die Detektion von CKIδ durch einen der 3 Antikörper gezeigt.

4.2.3.1 CKIδ Expression in Geweben des Herz-Kreislauf-Systems sowie in den unteren Atemwegen

Die Zusammensetzung des Blutkreislaufs bei Säugetieren, wie auch beim Menschen, gestaltet sich aus Herz, Arterien, Kapillaren, Venolen und Venen. Diese Strukturen wurden auf die Expression von CKIδ hin untersucht. Um eine bessere Übersicht zu gewähren, wurden nur die Gewebestrukturen aufgeführt, die eine entsprechende Markierung aufweisen (siehe **Tabelle 8**). In den Blutgefäßen stellen sich die Endothelzellen positiv für CKIδ dar, zudem zeigen auch die glatten Muskelzellen der größeren Gefäße eine positive Markierung. Da in den verschiedenen untersuchten Organen in unterschiedlichem Ausmaß ebenfalls Blutgefäßanschnitte zur Darstellung kommen, wurde auf eine Abbildung in diesem Kapitel verzichtet.

Die Myofibrillen der quergestreiften Herzmuskulatur (Abbildung nicht gezeigt) weisen wie auch die Myofibrillen der quergestreiften Skelettmuskulatur (siehe **Abbildung 8**) eine deutliche CKIδ Markierung auf.

Organ	Gewebe / Zelltypus	NC10	108	ab10877
Blutgefäße				
	Endothelzellen	++	++	++
	Glatte Muskelzellen der Tunica media	+	+	+
Herz				
	Myofibrillen	++	++	++
Trachea (Luftröhre) und Hauptbronchien				
Glandulae tracheales	Respiratorisches Epithel	++	++	++
	Muköse Azini	-/+	-/+	-/+
	Seröse Azini	++	++	++
Lunge				
Bronchien und Bronchioli:	Respiratorisches Epithel	++	++	++
	• Glandulae bronchiales			
	Muköse Azini	-/+	-/+	-/+
	Seröse Azini	++	++	++
• Glatte Muskulatur	Glatte Muskelzellen	+ (+)	+ (+)	+ (+)
Alveolen:	Alveolarepithelzelle Typ 2	++	++	++
	Alveolarmakrophagen	-	+++	+++

Tabelle 8: CKI δ Expression in Geweben des Herz-Kreislauf-Systems, sowie in den unteren Atemwegen. Die Detektion von CKI δ wurde anhand der Färbeintensität des jeweils verwendeten Antikörpers mit der folgenden Skalierung, die in der Tabelle aufgeführt ist, evaluiert: - negativ, -/+ blass, + schwach, ++ gut, +++ stark

Für die unteren Atemwege lässt sich für das respiratorische Epithel eine CKI δ Expression nachweisen. Das mehrreihige, hochprismatische Flimmerepithel der Trachea und der großen, sowie auch der kleinen Bronchien, setzt sich aus 6 unterschiedlichen Zelltypen zusammen (Jeffrey, 2003), die in dieser Arbeit nicht explizit untersucht wurden und daher unter dem Überbegriff respiratorisches Epithel zusammengefasst werden. Im respiratorischen Epithel der Trachea, welches im weiteren Verlauf an Höhe abnimmt, lässt sich wie auch im respiratorischen Epithel der Bronchioli, sowie der Bronchioli terminales und respiratorii (siehe **Abbildung 11**) eine CKI δ Detektion im Zytoplasma nachweisen. Die tubulo-azinären, seromukösen Drüsen in der Submukosa der Trachea und Bronchien, sowie vereinzelt in den größeren Bronchioli, zeigen in den serösen Abschnitten eine zytoplasmatische CKI δ Expression. Eine abgeschwächte Färbeintensität ist hingegen im Zytoplasma der mukösen Drüsenanteile zu finden. Eine CKI δ -positive Markierung lässt sich für die glatte Muskulatur

des Bronchialbaums nachweisen. Die Alveolen, als sackförmige Ausstülpungen der Bronchioli respiratorii stellen die Endabschnitte des Bronchialbaums dar. Das alveoläre Epithel, welches sich aus Typ 1 und Typ 2 Pneumozyten zusammensetzt, zeigt für Typ 2 Zellen eine CKI δ -positive Färbung. Ebenfalls positiv stellen sich die Alveolarmakrophagen dar. Jedoch können diese nur durch die CKI δ -spezifischen Antikörper 108 und ab10877 nachgewiesen werden. Der CKI δ -spezifische Antikörper NC10 ist nicht in der Lage diese Makrophagen zu detektieren.

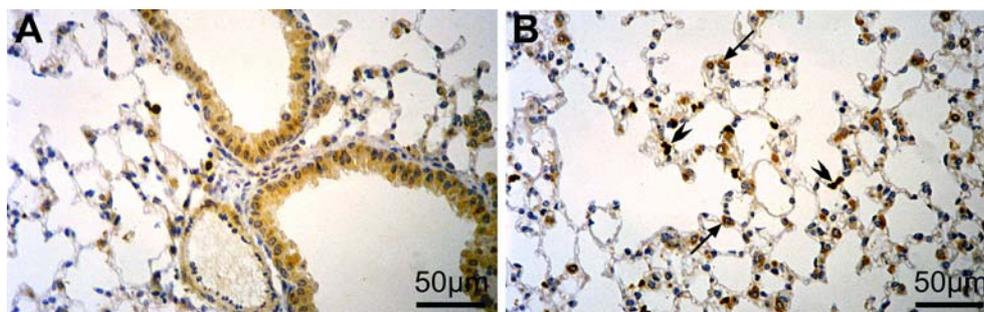


Abbildung 11 Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ der Lunge einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Immersionsfixation mit saurem Formalin. Peroxidase-reaktion, Farbstoff DAB. Detektion von CKI δ durch den Antikörper ab10877 (Abcam). **(A):** CKI δ -positive, zyttoplasmatische Markierung des respiratorischen Epithels der Bronchioli terminalis. **(B):** CKI δ -positive Färbung der Alveolarepithelzellen Typ 2 (Pfeile) sowie der Alveolarmakrophagen (Pfeilspitzen). Vergr. jeweils 100fach.

4.2.3.2 CKI δ Expression in den Organen des lymphatischen Systems

Ein hoher Grad der CKI δ Expression kann in den Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden. Diese Zellen finden sich in den lymphatischen Organen, sowie auch diffus verteilt in vielen anderen Organen. Um eine Übersicht über das Verteilungsmuster der CKI δ Expression zugeben, liegt das Augenmerk vornehmlich auf den Organen des lymphatischen Systems (siehe **Tabelle 9**).

Der Thymus weist eine typische Gliederung in Läppchen auf. Diese bestehen jeweils aus der dunkler gefärbten Rinde, aufgrund der dicht gelagerten Lymphozyten und dem zellärmeren, helleren Mark. Größere lymphatische Zellen mit auffällig breitem Zytoplasmasaum und Zellorganellen sind subkapsulär häufiger als die kleinen Lymphozyten, die sich mehr im tiefen Kortex befinden (Drenckhahn und Zenker, 1994a). Diese subkapsulär gelegenen Lymphozyten zeigen eine sehr starke zyttoplasmatische Markierung von CKI δ , wie aus **Abbildung 12 (A und B)** ersichtlich ist. Im Mark hingegen sind nur die Hassallschen

Körperchen für CKI δ positiv, die jedoch eine schwächere Färbeintensität aufweisen (siehe **Abbildung 12, C**).

Organ	Gewebe / Zelltypus	NC10	108	ab10877
Thymus				
• Rinde	Lymphozyten	+++	+++	+++
• Mark	Hassallsche Körperchen	+ (+)	++	++
Milz				
• Weiße Pulpa:				
◇ PALS	Lymphozyten	+++	+++	+++
◇ Follikel	Lymphozyten	-/+	-/+	-/+
• Marginalzone	Lymphozyten	+++	+++	+++
• Rote Pulpa	Granulozyten	+++	+++	+++
	Plasmazellen	+++	+++	+++
	Monozytäre Blutzellen:			
	Megakaryozyten	+	+	+
Lymphknoten				
• Rinde: Corona	Lymphozyten	+++	+++	+++
• Parakortikale Zone	Lymphozyten	+	+	+
• Mark	Plasmazellen	+++	+++	+++
Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe				
• Dom	Domepithel	++	++	++
• Follikel	Lymphozyten	++	++	++
	Lymphoblasten	+++	+++	+++

Tabelle 9: CKI δ Expression in den lymphatischen Organen sowie im darmassoziierten lymphatischen Gewebe. Die Detektion von CKI δ wurde anhand der Färbeintensität des jeweils verwendeten Antikörpers mit der folgenden Skalierung, die in der Tabelle aufgeführt ist, evaluiert: - negativ, -/+ blass, + schwach, ++ gut, +++ stark

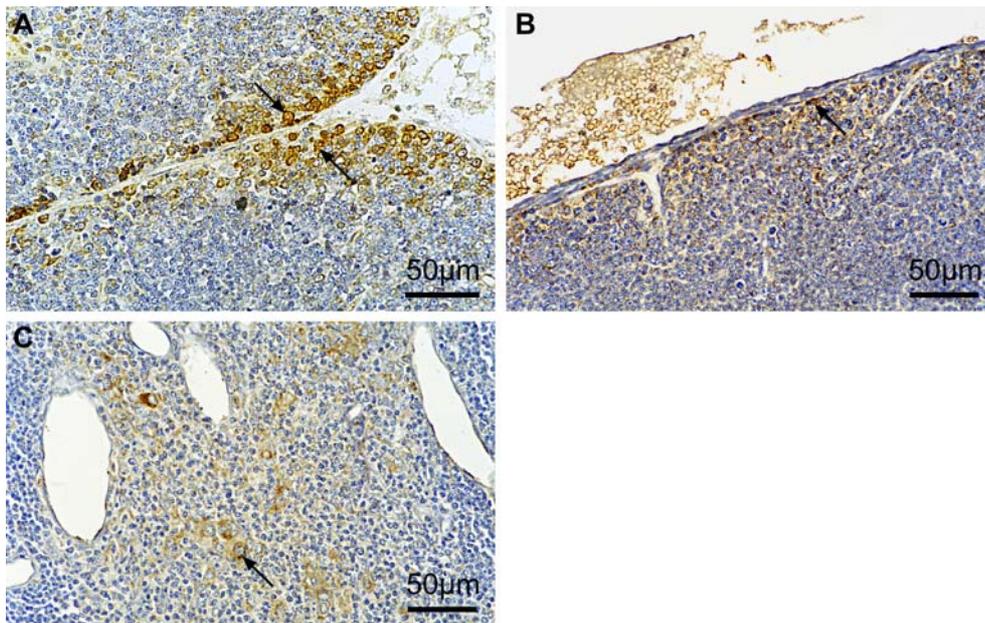


Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ im Thymus einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Anschnitt des Rindenbereichs. Detektion von CKI δ durch den Antikörper NC10. Immersionsfixation mit saurem Formalin. **(B):** Anschnitt des Rindenbereichs. Detektion von CKI δ durch den Antikörper 108. Perfusionsfixation mit Bouin. Starke CKI δ Expression in den subkapsulär gelegenen Lymphozyten (Pfeile) des Thymus. **(C):** Anschnitt des Markbereiches. Detektion von CKI δ durch den Antikörper 108. Perfusionsfixation mit Bouin. CKI δ Expression in den Hassallschen Körperchen (Pfeil). Vergr. jeweils 100fach.

Die Expression von CKI δ in der Milz konnte mit Hilfe des polyklonalen Antiserums NC10 nachgewiesen werden (Maritzen et al., 2003). In dieser Arbeit wurden zusätzlich die CKI δ -spezifischen Primärantikörper 108 und ab10877 verwendet. Wie aus **Abbildung 13 (C)** ersichtlich ist, können in der periarteriellen Begleitscheide (PALS) zahlreiche Lymphozyten mit einer starken CKI δ Markierung des Zytoplasmas nachgewiesen werden. In den Follikeln hingegen erscheint die CKI δ Expression nur auf die Zellmembran einzelner Lymphozyten beschränkt und ist insgesamt geringer ausgeprägt. In der Marginalzone lässt sich wiederum eine starke CKI δ Markierung der Lymphozyten nachweisen. In der roten Pulpa, siehe **Abbildung 13 (D)** finden sich neben CKI δ -positiven Plasmazellen auch Zellen des hämatopoetischen Systems, die eine zytoplasmatische Expression für CKI δ aufweisen. Bei den markierten Zellen handelt es sich um Megakaryozyten (Vorläuferzellen der Thrombozyten) und Granulozyten. Anzumerken ist, dass sich zur Detektion von CKI δ in den Lymphozyten der Milz die Perfusionsfixation am besten eignet.

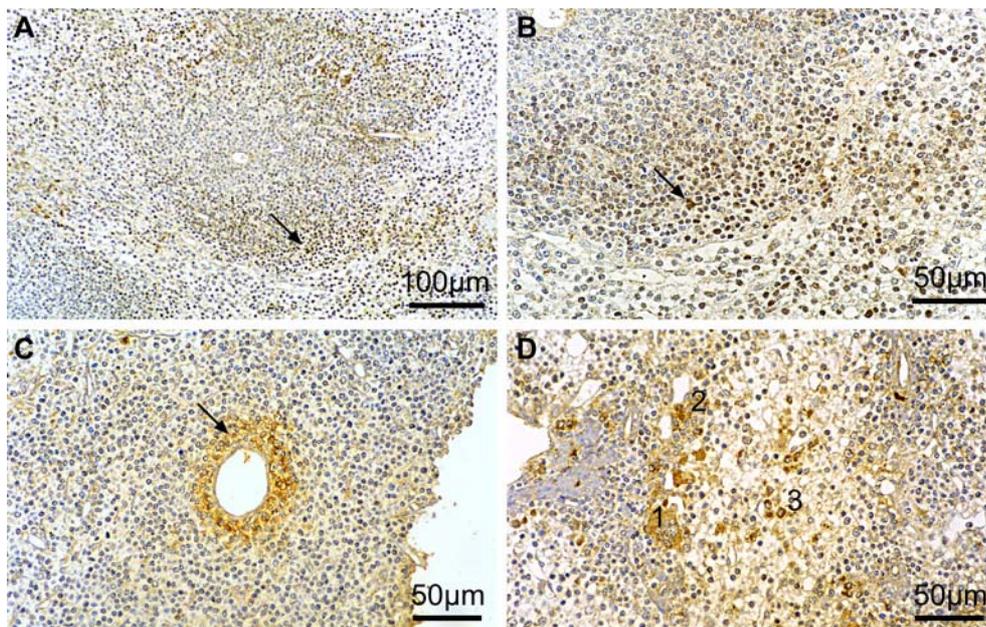


Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in der Milz einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper 108. Perfusionsfixation mit Bouin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A, B):** Weiße Pulpa der Milz. Hier zeigt sich eine starke CKI δ Expression in den Lymphozyten der Marginalzone (Pfeil) (A). Vergr. 50fach. (B) Vergr. 100fach. **(C):** PALS der weißen Pulpa der Milz. CKI δ Detektion in den perivaskulär angeordneten Lymphozyten (Pfeil). Vergr. 100fach. **(D):** Rote Pulpa der Milz. CKI δ -positiver Markierungsnachweis verschiedener Zellarten: Plasmazellen (3), Granulozyten (2), sowie etwas abgeschwächer in der Färbintensität, Megakaryozyten (1). Vergr. 100fach.

Eine CKI δ -positive Markierung lässt sich auch in den Lymphknoten darstellen. Die CKI δ Expression ist in den Sekundärfollikeln der Rinde zu finden, vor allem in den Lymphozyten der Corona, vereinzelt zeigen sich daneben positive Lymphozyten des Paracortex (siehe **Abbildung 14**). Ebenfalls lässt sich entlang der Markstränge eine starke CKI δ Expression der Plasmazellen nachweisen.

Neben den lymphatischen Organen soll hier noch das darmassoziierte lymphatische Gewebe erwähnt werden, da sich auch hier eine starke CKI δ Expression nachweisen lässt. Diese Expression findet sich sowohl in den Solitärfollikeln, als auch in den Peyerschen Plaques, welche eine Ansammlung von mehreren Follikeln mit einem spezialisierten Epithel darstellen. In den Keimzentren der Sekundärfollikel der Peyerschen Plaques zeigt sich eine deutliche Markierung des Zytoplasmas der Lymphoblasten, zudem findet sich eine starke Expression von CKI δ in vereinzelt Lymphozyten. Das den Dom bedeckende Epithel, welches auch als Follikel-assoziiertes Epithel (FAE) bezeichnet wird, ist spezialisiert auf die Aufnahme von Antigenen und mikrobiellen Erregern aus dem Lumen (Kraehenbuhl und

Neutra, 2000). Auch hier kann im Zytoplasma eine CKI δ Markierung nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 15**).

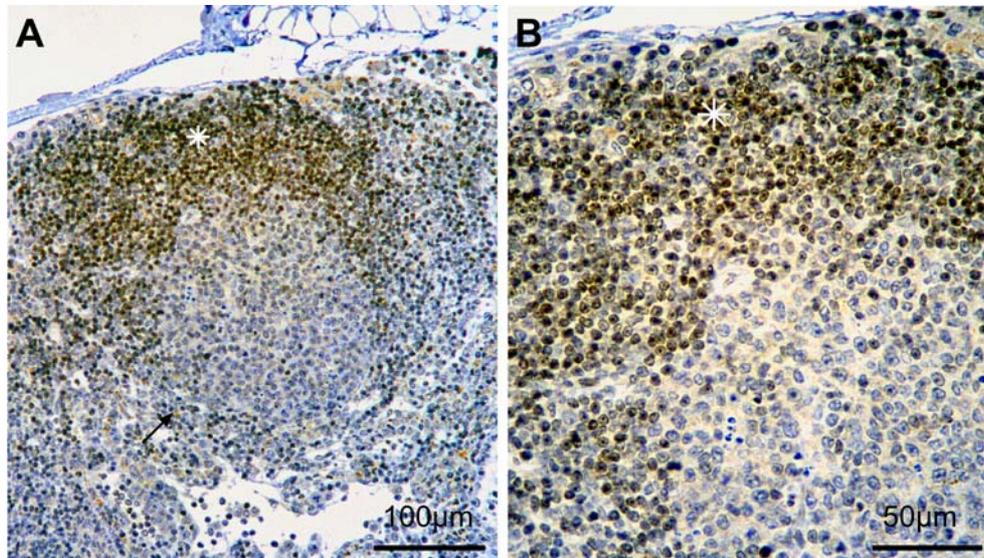


Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in einem regionären Lymphknoten der Speicheldrüse einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper 108. Perfusionsfixation mit Bouin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Nachweis einer starken CKI δ Expression der Lymphozyten der Corona (Stern). Vereinzelt positive Lymphozyten des Parakortex (Pfeil). (A) Vergr. 50fach. (B) Vergr. 100fach.

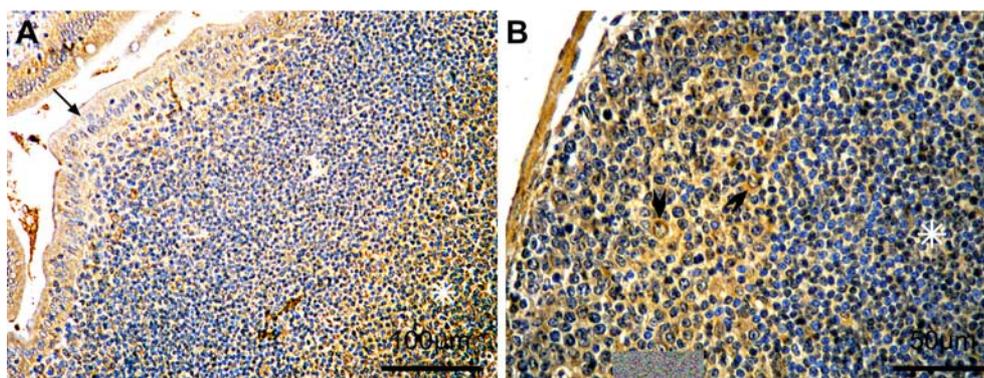


Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in einem Peyerschen Plaque des Dünndarms einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper ab10877 (Abcam). Immersionsfixation mit saurem Formalin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Übersicht. CKI δ -positive Markierung im Zytoplasma des Follikel-assoziierten Epithels (Pfeil), sowie im Keimzentrum des Follikels (Stern). Vergr. 50fach. **(B):** Keimzentrum des Sekundärfollikels. Nachweisbare CKI δ Expression der Lymphozyten (Stern), sowie der Lymphoblasten (Pfeile). Vergr. 100fach.

4.2.3.3 CKI δ Expression in den Anhangsdrüsen des Verdauungskanals

Die in **Tabelle 10** aufgeführten Drüsen bilden Sekrete, die der Verdauung dienen und die deshalb unter dem Überbegriff Anhangsdrüsen des Verdauungskanals zusammengefasst wurden. Diese Drüsen wurde auf eine mögliche CKI δ Expression untersucht.

Organ	Gewebe / Zelltypus	NC10	108	ab10877
Speicheldrüsen				
• Glandula parotidea (Ohrspeicheldrüse)	Seröse Zellen	+	+	+
	Schalt- und Streifenstücke	++	++	++
• Glandula sublingualis (Unterzungendrüse)	Seröse Zellen	+++	+++	+++
	Muköse Zellen	-	-	-
	Schalt- und Streifenstücke	++	++	++
• Glandula submandibularis (Unterkieferdrüse)	Muköse Zellen	+ (+)	+ (+)	+ (+)
	Seröse Zellen	-	-	-
	Schalt- und Streifenstücke	++	++	++
Pankreas				
• Exokriner Anteil	Seröse Zellen	++	++	++
	Ausführungsgänge	++	++	++
• Endokriner Anteil	Inselzellen (siehe unter Endokrine Organe)	+++	+++	+++
Leber				
	Hepatozyten	++ (+)	+++	+++
	Sinusendothelzellen	++ (+)	++ (+)	++ (+)
	Endothelzellen der Gefäße	++ (+)	++ (+)	++ (+)
	Gallengangepithel	++	++	++
	Kupffer-Zellen	-	+++	+++
Gallenblase				
	Gallenblasenepithel	++	++	++

Tabelle 10: CKI δ Expression in den Anhangsdrüsen des Verdauungskanals. Die Detektion von CKI δ wurde anhand der Färbeintensität des jeweils verwendeten Antikörpers mit der folgenden Skalierung, die in der Tabelle aufgeführt ist, evaluiert: - negativ, -/+ blass, + schwach, ++ gut, +++ stark

Die Parotis als eine der drei großen Mundspeicheldrüsen zeigt ein unterschiedlich stark ausgeprägtes Markierungsmuster für CKI δ . In einigen Zellen der serösen Azini kann eine zytoplasmatische Markierung nachgewiesen werden, wohingegen andere Azinuszellen nur eine schwache bis kaum erkennbare Markierung aufzeigen. Eine deutlichere, δ -positive Markierung ist hingegen im Zytoplasma der Streifenstücke, wie auch der Schaltstücke der Ohrspeicheldrüse nachweisbar (siehe **Abbildung 16**).

Bei der Glandula sublingualis handelt es sich um eine mukoseröse Drüse mit Überwiegen des mukösen Drüsenanteils. Die Unterzungendrüse zeigt für CKI δ nur eine Markierung im Zytoplasma der serösen Zellen, die als seröse Halbmonde den mukösen Endstücken aufsitzen (Vergleiche **Abbildung 7, B2** und **Abbildung 16, B**). In den nur sehr kurzen Schalt- und Streifenstücken der Glandula sublingualis lässt sich eine zytoplasmatische CKI δ Expression nachweisen.

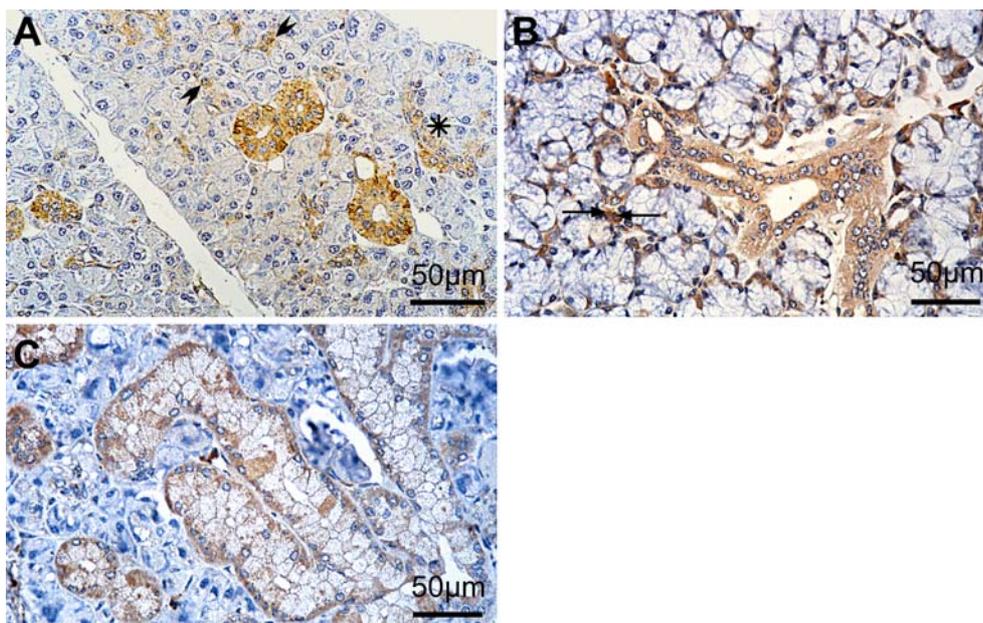


Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ der Speicheldrüsen einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A): Parotis.** Detektion von CKI δ durch den Antikörper NC10. Perfusionsfixation mit Bouin. Das Zytoplasma der Azini zeigt eine unterschiedliche CKI δ Expression mit schwacher bis guter Färbeintensität (Pfeilspitzen). Die Schalt- und Streifenstücke (Stern) weisen hingegen eine stärkere zytoplasmatische Markierung auf. Vergr. 100fach. **(B): Glandula sublingualis.** Detektion von CKI δ durch den Antikörper ab10877(Abcam). Immersionsfixation mit saurem Formalin. Starke zytoplasmatische CKI δ Markierung der serösen Halbmonde der Unterzungendrüse. In der Bildmitte ist ein Streifenstück angeschnitten, dessen Epithel eine CKI δ Expression im Zytoplasma aufweist. Mitabgebildet eine Plasmazelle, die eine sehr gute CKI δ Reaktivität aufweist (Pfeil). Vergr. 100fach. **(C): Glandula submandibularis.** Detektion von CKI δ durch den Antikörper ab10877 (Abcam). Immersionsfixation mit saurem Formalin. Das Zytoplasma der serösen Azini zeigt keine Markierung, wohingegen die muzinösen Drüsenendstücke eine jeweils unterschiedlich stark ausgeprägte zytoplasmatische Markierung für CKI δ aufweisen. Vergr. 100fach.

Die Glandula submandibularis hingegen ist eine gemischte seromuköse Drüse, wobei hier die serösen Drüsenanteile überwiegen. Wie aus **Abbildung 16 (C)** ersichtlich stellen sich die serösen Drüsenstücke hier negativ für CKI δ dar. Die mukösen Tubuli hingegen zeigen in ihrem Zytoplasma eine CKI δ Expression, die in ihrer Färbeintensität zwischen schwach bis gut variiert. Auch in dieser Speicheldrüse weisen die Schalt- und Streifenstücke eine zytoplasmatische Markierung auf (nicht abgebildet).

In den serösen Azinuszellen des exokrinen Pankreas lässt sich eine unterschiedlich stark ausgeprägte zytoplasmatische Markierung für CKI δ nachweisen (siehe **Abbildung 17**, und **Abbildung 10**). Einige Azini zeigen eine deutliche zytoplasmatische CKI δ Markierung, wohingegen andere Azini eine fein-granuläre zytoplasmatische Färbung aufweisen. Diese ist vor allem im apikalen Zelldrittel dieser Azinuszellen zu finden, kommt aber in der Färbeintensität etwas schwächer zur Darstellung. Ebenfalls eine positive CKI δ Färbung des Zytoplasmas zeigen die Ausführungsgänge des Pankreas (nicht abgebildet).

Der endokrine Anteil der Bauchspeicheldrüse zeigt eine sehr starke CKI δ Expression und ist ausführlich im Kapitel Endokrine Organe (**Kapitel 4.2.3.6**) beschrieben.

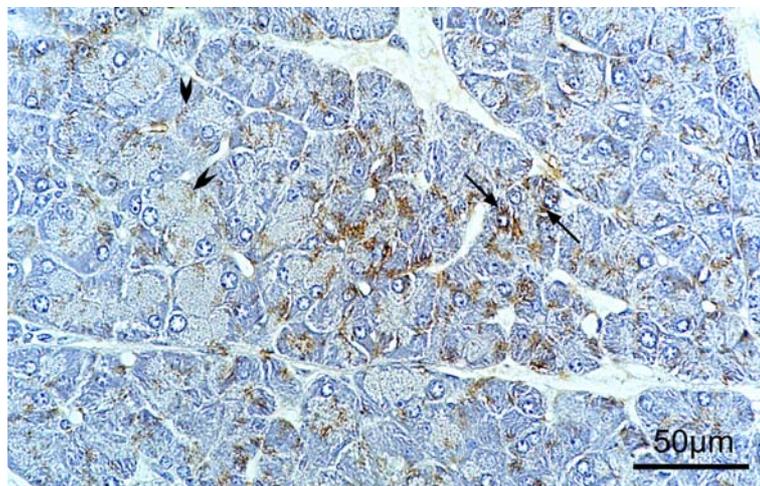


Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ im exokrinen Anteil des Pankreas einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper NC10. Perfusionsfixation mit Bouin. Peroxidase-reaktion, Farbstoff DAB. In den Azinuszellen lassen sich sowohl feine CKI δ -positive Granula (Pfeilspitzen), als auch eine homogene, in der Färbeintensität stärkere zytoplasmatische Markierung (Pfeil) nachweisen.

Die Leber zeigt sich als eines der Organe, bei der sowohl die Art der Fixierung als auch die Zusammensetzung der Fixierungslösung eine entscheidende Rolle zum Nachweis von CKI δ zu spielen scheint. Lebern, die nach der Präparation mit saurem Formalin fixiert wurden,

zeigen eine CKI δ -positive zytoplasmatische Markierung des Gallengangepithels. Ebenfalls gut zur Darstellung kommen bei dieser Fixierung die Lebermakrophagen, die sogenannten Kupffer-Zellen. Eine starke Expression dieser Zellen kann jedoch nur mit den CKI δ spezifischen Antikörper 108 und ab10877 detektiert werden. Wie schon bei den Alveolarmakrophagen beschrieben (siehe **Tabelle 8**), kann mit dem Antikörper NC10 keine CKI δ Markierung der Kupffer-Zellen nachgewiesen werden. Die Hepatozyten stellen sich für alle drei eingesetzten CKI δ spezifischen Antikörper negativ dar. Eine schemenhaft angedeutete CKI δ Färbung weisen die Lebersinusoide auf. Wurden die Lebern nach Entnahme jedoch mit Bouinlösung fixiert, zeigen die Lebersinusoide eine intensive CKI δ Markierung, ebenso deutlich kommt auch das Endothel der Vena centralis dieser Präparate zur Darstellung. Dieses Markierungsmuster ist sowohl für das Endothel der Venen als auch für das der Sinusoide nicht homogen, sondern zeigt sich vor allem im Randereich des Präparates. Die Hepatozyten stellen sich bei dieser Fixierungslösung ebenfalls negativ für CKI δ dar. Bei einer Perfusionsfixation mit saurem Formalin kommt ein CKI δ -positives, homogenes granuläres Markierungsmuster in den Hepatozyten zur Darstellung. Diese homogene Färbung lässt sich jedoch nur durch die CKI δ -spezifischen Antikörper 108 und ab10877 erreichen. Der Antikörper NC10 zeigt hingegen nur in vereinzelt, perivenös gelegenen Hepatozyten eine starke CKI δ Expression. Bei dieser Art der Fixation kann das Endothel der Lebersinusoide und das der Lebervenen nicht mehr von den Hepatozyten abgegrenzt werden. Die Kupffer-Zellen, die im sinusoidalen Lumen liegen und den Endothelzellen anhaften, kommen bei dieser Fixierung ebenfalls nicht mehr zur Darstellung (siehe **Abbildung 18**).

Die Gallenblase zeigt, wie die Gallengänge, eine zytoplasmatische Markierung für CKI δ in dem einschichtigen hochprismatischen Epithel der Tunica mucosa (Abbildung nicht gezeigt).

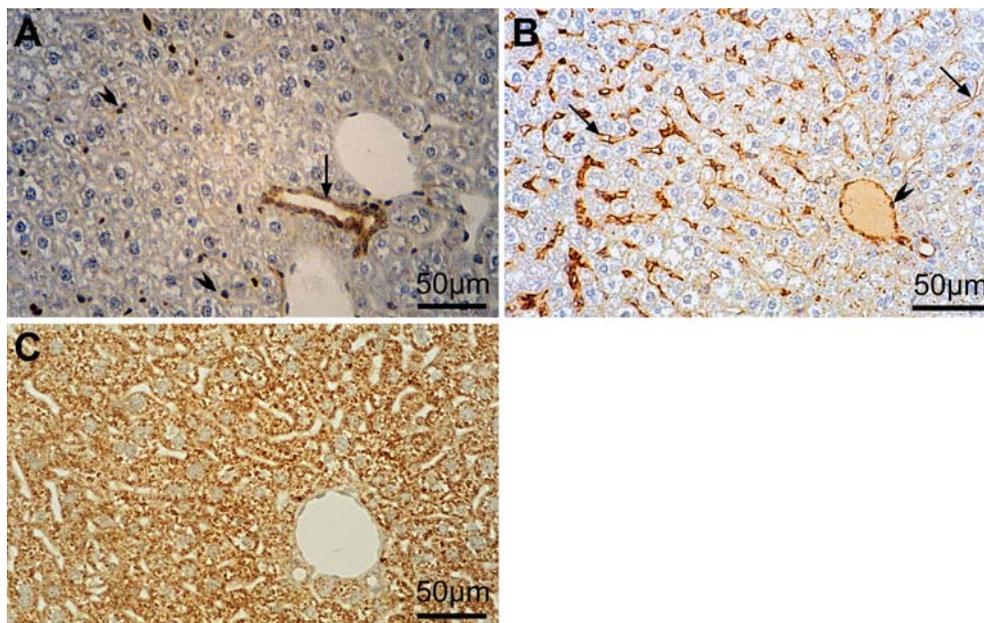


Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von CKIδ in der Leber mit unterschiedlichen Fixierungslösungen und Fixierungsmethoden. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Immersionsfixation mit saurem Formalin. Detektion von CKIδ durch den Antikörper ab10877 (Abcam). CKIδ-positive Markierung des Zytosplasmas des Gallengangepithels (Pfeil) sowie der Kupfer-Zellen (Pfeilspitze). Vergr. 100fach. **(B):** Immersionsfixation mit Bouin. Detektion von CKIδ mit dem Antikörper NC10. CKIδ-positive Markierung der Endothelien der Lebersinusoiden (Pfeile), sowie der mit abgebildeten Vena centralis (Pfeilspitze). Vergr. 100fach. **(C):** Perfusionsfixation mit saurem Formalin. Detektion von CKIδ durch den Antikörper 108. Nachweis von CKIδ-positiven Granula im Zytosplasma der Hepatozyten. Vergr. 100fach.

4.2.3.4 CKIδ Expression des Verdauungsapparates

Entwicklungsgeschichtlich lässt sich der Verdauungsapparat in den Kopfdarm sowie den Rumpfdarm unterteilen. Der Kopfdarm welcher zur Nahrungsaufnahme und –zerkleinerung dient, umfasst die Mundhöhle als auch den Pharynx. Der Rumpfdarm besteht aus der Speiseröhre sowie dem Magen-Darm-Trakt, der sich wiederum morphologisch und funktionell in unterschiedliche Abschnitte unterteilen lässt (Drenckhahn und Zenker, 1994a). In dieser Arbeit wurden die entsprechenden Abschnitte des Rumpfdarms auf eine mögliche CKIδ Expression untersucht und die Ergebnisse in **Tabelle 11** zusammengefasst.

Organ	Gewebe / Zelltypus	NC10	108	ab10877
Ösophagus (Speiseröhre)				
	Epithel der Tunica mucosa	++	++	++
	Glandulae oesophageae	-	-	-
	Tunica muscularis	++	++	++
Magen				
	Oberflächenepithel	+	+	+
	Zellen des Drüsenisthmus	++	++	++
	Zellen des Drüsenhalses	++ (+)	+(+)	+(+)
	Zellen des Drüsengrundes	++	++	++
	Tunica muscularis	++	++	++
Dünndarm				
	Enterozyten (Saumzellen)	++	++	++
	Becherzellen	++	++	++
	Paneth-Körnerzellen	++	++	++
	Enteroendokrine Zellen	+++	+++	+++
	Intraepitheliale Lymphozyten	+++	+++	+++
	Plasmazellen	+++	+++	+++
	Tunica muscularis	++	++	++
Dickdarm				
	Saumepithel	+(+)	+(+)	+(+)
	Becherzellen	+++	+++	+++
	Enteroendokrine Zellen	+++	+++	+++
	Undiff. Stammzellen	+++	+++	+++
	Plasmazellen	+++	+++	+++
	Tunica muscularis	++	++	++

Tabelle 11: CKI δ Expression im Ösophagus sowie in den Organen des Magen-Darm-Traktes. Die Detektion von CKI δ wurde anhand der Färbeintensität des jeweils verwendeten Antikörpers mit der folgenden Skalierung, die in der Tabelle aufgeführt ist, evaluiert: - negativ, -/+ blass, + schwach, ++ gut, +++ stark

Das Epithel des Ösophagus der Maus, weist zum humanen Ösophagusepithel einige Unterschiede auf. So handelt es sich bei der Maus um ein mehrschichtig verhornendes

Plattenepithel, im Gegensatz zum mehrschichtig unverhornenden Plattenepithel des Menschen. Zudem finden sich die Stammzellen des murinen Ösophagus, nicht wie beim Menschen, in der Interpapillar-Region, sondern eher zufällig angeordnet in der basalen Schicht des Plattenepithels (Marques-Pereira und Leblond, 1965), wie aus **Abbildung 19** zu erkennen ist. Diese Stammzellen zeigen ein unterschiedlich stark markiertes CKI δ -positives Zytoplasma. In der nachfolgenden Zellschicht, dem Stratum spinosum, der sogenannten Stachelzellschicht, lässt sich ebenfalls eine zytoplasmatische Expression von CKI δ nachweisen, wie sie auch in den Zellen des Stratum granulosum zu finden ist. Im Zytoplasma dieser granulären Zellen sind feine Keratohyalin granula zu finden, die eine intensive CKI δ Färbung aufzeigen. In Ratten, sowie auch bei Mäusen ist ein allmähliches Verschwinden der Zellkerne und der Zellorganellen in Richtung der oberflächlichen Zellschicht (Leblond et al., 1967) zu beobachten (siehe **Abbildung 19**), bevor diese Epithelzellen in die kernlosen Korneozyten übergehen. Die Muskulatur des murinen Ösophagus setzt sich nicht wie beim Menschen in unterschiedlichen Abschnitten aus quergestreifter und glatter Muskulatur zusammen, sondern besteht ausschließlich aus quergestreifter Muskulatur (Ingelfinger, 1958). Die Myofibrillen dieser quergestreiften Muskulatur weisen ebenfalls eine CKI δ Markierung auf, vergleichbar mit der auf **Abbildung 8** gezeigten Myofibrillen der quergestreiften Skelettmuskulatur.

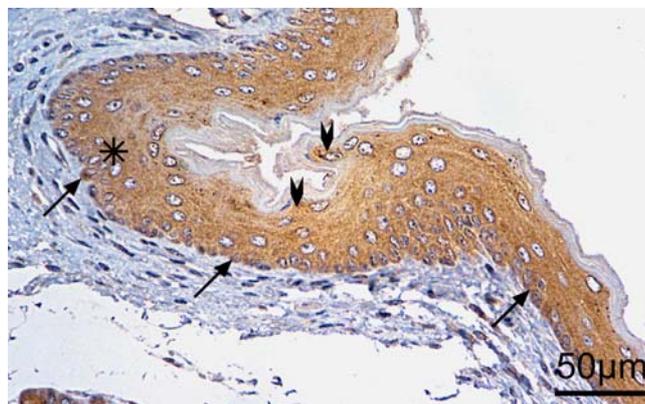


Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ des Ösophagus einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper NC10. Immersionsfixation mit saurem Formalin. Peroxidase-reaktion, Farbstoff DAB. Zytoplasmatische Markierung der Stammzellen des Stratum basale (Pfeile) sowie der Zellen der nachfolgenden Schichten des Stratum spinosum (Stern) und des Stratum granulosum. Mit Pfeilspitze markierte CKI δ -positive Keratohyalin granula im Zytoplasma der sich auflösenden Zellen des Stratum granulosum. Vergr. 100fach.

Die Magenwand ist, wie in den nachfolgenden Teilen des Verdauungstraktes, aus Tunica mucosa, Tela submucosa, Tunica muscularis, Tela subserosa und der Tunica serosa aufgebaut. Die Magenschleimhaut setzt sich aus den Magengrübchen, den sogenannten

Foveolae gastricae, zusammen und wird von einem einschichtigen, schleimbildenden Oberflächenepithel überzogen. Vom Grund dieser Foveolae erstrecken sich die langen und verzweigten tubulösen Magendrüsen, die sogenannten Glandulae gastricae. Diese lassen sich in einen Drüsenisthmus, Drüsenhals und Drüsenkörper unterteilen. In der Maus wird eine Einheit, bestehend aus Foveola, Drüsenisthmus, Drüsenhals und Drüsenkörper, von einer Einzelschicht von ca. 194 Zellen überzogen. Diese Zellen lassen sich wiederum in 3 Gruppen einteilen, bestehend aus 11 verschiedenen Zelltypen (Karam und Leblond, 1992). Diese Zelltypen wurden in dieser Arbeit nicht differenziert und somit nicht explizit auf eine CK1 δ Expression hin untersucht. Ein Nachweis der Expression von CK1 δ kann in unterschiedlich ausgeprägtem Ausmaß im Zytoplasma der Zellen des Drüsenkörpers, des Drüsenhalses, des Drüsenisthmus wie auch im Epithel der Foveolae gefunden werden (siehe **Abbildung 20**). Ebenfalls eine CK1 δ -positive Färbung zeigt die glatte Muskulatur der Tunica muscularis.

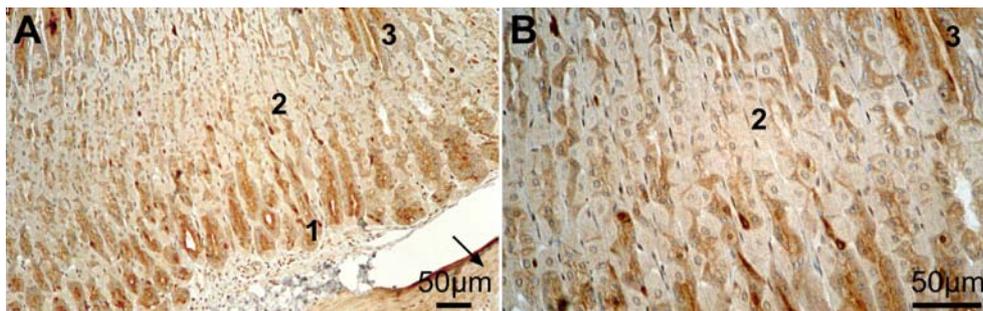


Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von CK1 δ des Magens einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CK1 δ durch den Antikörper 108. Immersionsfixation mit Bouin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Längsschnitt durch die Magendrüsen. **(A):** Vergr. 50fach. Zytoplasmatische Markierung von CK1 δ der Zellen des Drüsengrundes (1), des Drüsenhalses (2) sowie den zum Teil mit angeschnittenen Zellen des Drüsenisthmus (3). Mit abgebildet, die Tunica muscularis, bestehend aus CK1 δ -positiver glatter Muskulatur (Pfeil). **(B):** Vergr. 100fach. Ausschnitt aus dem Drüsenhals, sowie ein Abschnitt aus dem Drüsenisthmus (3). Die Zellen zeigen eine unterschiedlich stark ausgeprägte zytoplasmatische Färbintensität für CK1 δ .

Die Schleimhaut des Dünndarms, welche der Resorption und Sekretion dient, ist im Duodenum und Jejunum zu hohen Falten, den sogenannten Plicae circulares aufgeworfen. Diese weisen fingerförmige Schleimhauerhebungen (Zotten) auf, an deren Basis kurze schlauchförmige Darmdrüsen, die sogenannten Krypten münden (Drenckhahn und Zenker, 1994a). Das Epithel der Zotten und Krypten setzt sich aus unterschiedlichen Zelltypen zusammen, die jedoch alle aus einer Stammzelle hervorgehen (Cheng und Leblond, 1974b). Die Saumzellen (Enterozyten) machen in der Maus mehr als 80% aller epithelialer Zellen des Schleimhautepithels aus (Cheng und Leblond, 1974a) und weisen eine CK1 δ Expression

im Zytoplasma auf. Ebenso zeigt das Zytoplasma der schleimproduzierenden Becherzellen eine CKI δ Färbung, wie aus **Abbildung 21** ersichtlich. Die Anzahl dieser Zellen nimmt vom Duodenum zum Jejunum und zum Ileum zu und macht bis zu 12% aller epithelialer Zellen der Schleimhaut in der Maus aus (Cheng, 1974a). In der Tiefe der Krypten finden sich die Paneth-Zellen, die durch apikale sekretorische Granula gekennzeichnet sind (Cheng, 1974b). Auch dieser Zelltyp zeigt eine zytoplasmatische Markierung für CKI δ . Anzumerken ist jedoch, dass die Paneth-Zellen durch die Fixierung annähernd komplett degranulieren und daher das apikale Zytoplasma ausgewaschen erscheint (siehe **Abbildung 21, B**). Ebenso finden sich in den Krypten teilungsfähige, undifferenzierte Stammzellen, sowie enteroendokrine Zellen, die jedoch auch vereinzelt in den Zotten zu finden sind. Auch in diesen Zelltypen lässt sich eine zytoplasmatische CKI δ Expression nachweisen (siehe **Abbildung 21, B**). Zellen, die dem Immunsystem zugeordnet sind, wie Plasmazellen und Lymphozyten, zeigen eine auffällig starke zytoplasmatische CKI δ Expression (siehe **Abbildung 21, A**). Wie in allen Teilen des Magen-Darm-Traktes lässt sich auch im Dünndarm eine CKI δ -positive Reaktion der glatten Muskulatur der Tunica muscularis nachweisen.

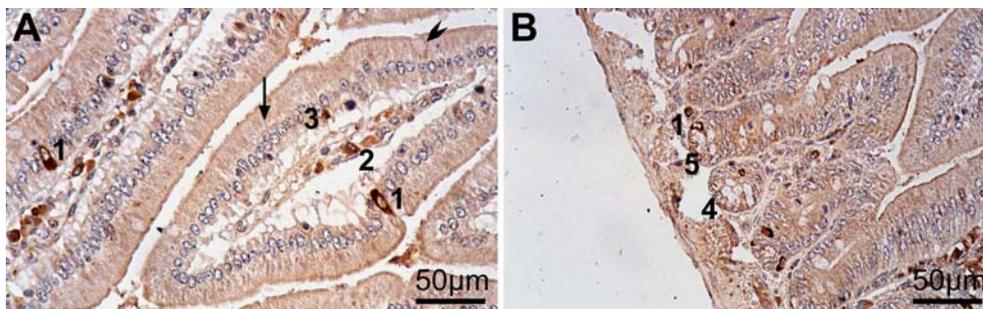


Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ des Dünndarms einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper ab10877 (Abcam). Immersionsfixation mit saurem Formalin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Längsschnitt durch die Zotten- (**A**) und Kryptenregion (**B**). Vergr. jeweils 100fach. CKI δ positives Reaktionsmuster des Zytoplasmas der Enterozyten (Pfeile) sowie der Becherzellen (Pfeilspitzen). Deutliche zytoplasmatische CKI δ Expression der enteroendokrinen Zellen in der Tiefe der Krypten (1,B) sowie in den Zotten (1,A). In den Zotten ebenfalls Nachweis einer CKI δ Expression der Plasmazellen (2,A) und intraepithelialen Lymphozyten (3,A). In der Kryptenregion kommen CKI δ -positive Paneth-Zellen (4,B) als auch Stammzellen (5,B) zur Darstellung.

Die Schleimhaut des Dickdarms, besteht aus Krypten, die Plicae circulares und Zotten fehlen. Das Kryptenepithel, bestehend aus Saumzellen, Becherzellen, enteroendokrinen Zellen sowie undifferenzierten Stammzellen, weist wie die vergleichbaren Zellen des Dünndarms eine zytoplasmatische Markierung für CKI δ auf (siehe **Abbildung 22** und

Abbildung 7, A3-B4). Die glatte Muskulatur der Tunica muscularis weist wie in allen Teilen des Magen-Darm-Traktes auch hier eine positive Markierung für CKI δ auf.

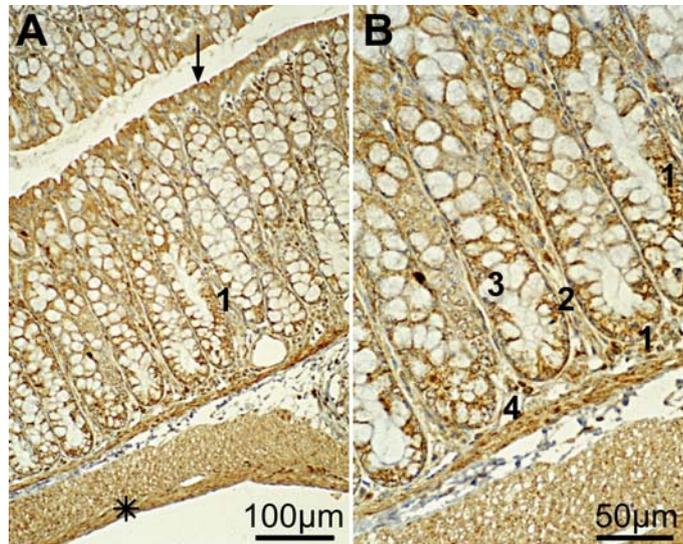


Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ des Dickdarms einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ mit dem Antikörper 108. Perfusionsfixation mit Bouin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Längsschnitt. **(A):** Vergr. 50fach. **(B):** Vergr. 100fach. In der Tiefe der Krypten sowie im unteren Drittel der Kryptenwand, CKI δ -positive zytoplasmatische Markierung der Stammzellen (1). Ebenfalls eine zytoplasmatische CKI δ Markierung findet sich in den Becherzellen (2). Nachweis feiner CKI δ -positiver Granula basal im Zytoplasma der enteroendokrinen Zellen (3) liegend. Die dargestellten Plasmazellen (4) zeigen ein CKI δ -positives zytoplasmatisches Reaktionsmuster, wie auch die Enterozyten (Pfeil in A). Mit abgebildet ist die Tunica muscularis, bestehend aus CKI δ -positiver glatter Muskulatur (Stern in A).

4.2.3.5 CKI δ Expression in den Organen des Urogenital-Traktes

Das Urogenitalsystem ist der Sammelbegriff für die Harn- und Geschlechtsorgane. Diese beiden Systeme, die sich funktionell voneinander unterscheiden, sind jedoch durch die Embryonalentwicklung eng miteinander verbunden und werden daher zusammen in diesem Kapitel abgefasst. In **Tabelle 12** sind die einzelnen Organe, die bezüglich ihrer CKI δ Expression untersucht wurden, aufgeführt.

Organ	Gewebe / Zelltypus	NC10	108	ab10877
Niere				
• Glomerulus (Kapillarknäuel)	Endothelzellen	++	++	++
	Podozyten	++ (+)	++ (+)	++ (+)
• Proximaler Tubulus	Epithelzellen	+	+	+
• Intermediärer Tubulus	Epithelzellen	+	+	+
• Distaler Tubulus	Epithelzellen	+(+)	+(+)	+(+)
• Sammelrohre	Epithelzellen	+	+	+
Vesica urinaria (Harnblase)				
• Tunica mucosa	Basalzellen	++	++	++
	Intermediärzellen	++	++	++
• Tunica muscularis	Glatte Muskulatur	++	++	++
Ovar (Eierstock)				
	Follikel­epithel	+++	+++	+++
	Granulosazellen	+++	+++	+++
	Theca interna Zellen	+	+	+
	Ooplasma	+	+	+
Tuba uterina (Eileiter)				
• Tunica mucosa	Tubenepithel	+	+	+
• Tunica muscularis	Glatte Muskulatur	+	+	+
Uterus (Gebärmutter)				
• Endometrium	Oberflächenepithel	++	++	++
	Drüsenepithel	++	++	++
	Bindegewebszellen	+	+	+
	Plasmazellen	+++	+++	+++
• Myometrium	Glatte Muskulatur	+	+	+
Vagina (Scheide)				
• Tunica mucosa	Plattenepithelzellen	++ (+)	++ (+)	++ (+)
Testis (Hoden)				
	Leydig-Zellen	+++	+++	+++
	Spermatogonien, vereinzelt	++	++	++
	Spermatozyten I	-	++	++

Epidymidis (Nebenhoden)				
	Epithel der Ductuli efferentes	++	++	++
	Epithel des Ductus epididymidis	++ (+)	++ (+)	++ (+)
	Glatte Muskelzellen	+	+	+
Ductus deferens (Samenleiter)				
• Tunica mucosa	Epithel	++	++	++
• Tunica muscularis	Glatte Muskulatur	+	+	+
Vesicula seminalis (Samenblase)				
• Tunica mucosa	Epithel	++	++	++
• Tunica muscularis	Glatte Muskulatur	+	+	+
Prostata (Vorsteherdrüse)				
• Tunica mucosa	Drüsenepithel	++ (+)	++ (+)	++ (+)
• Tunica muscularis	Glatte Muskulatur	+	+	+

Tabelle 12: CKI8 Expression in den Organen des Urogenitalsystems. Die Detektion von CKI8 wurde anhand der Färbeintensität des jeweils verwendeten Antikörpers mit der folgenden Skalierung, die in der Tabelle aufgeführt ist, evaluiert: - negativ, -/+ blass, + schwach, ++ gut, +++ stark

Der Aufbau der Niere der Maus unterscheidet sich zu dem des Menschen dahingehend, dass es sich bei der Maus um eine unipapilläre Niere handelt, wohingegen die Niere des Menschen einen multipapillären Aufbau aufweist. Die Gliederung des Nierenparenchyms in Nierenmark und Nierenrinde ist jedoch bei beiden Spezies identisch. In der Nierenrinde liegen die Nephrone und Sammelrohre. Nephrone setzen sich wiederum zusammen aus einem Nierenkörperchen dem ein langes und kompliziertes Kanälchen angeschlossen ist, um dann in die Sammelrohre zu münden (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Der wichtigste Bestandteil des Nierenkörperchens ist das Kapillarknäuel (Glomerulus) mit einer umgebenden Kapsel (Bowmanschen Kapsel). Die Glomeruluskapillaren unterscheiden sich in ihrem Wandaufbau von anderen Kapillaren, da sie sich aus Endothelzellen, einer Basalmembran, Mesangiumzellen, sowie Podozyten zusammensetzen. Eine CKI8-positive zytoplasmatische Reaktion konnte in den Podozyten, sowie in den Endothelzellen nachgewiesen werden. Jedoch ist dieses Reaktionsmuster nicht homogen in allen Glomeruli zu finden, selbst innerhalb eines Kapillarknäuels erscheint dieses Detektionsmuster nicht homogen (siehe **Abbildung 7, A1 und B1** und **Abbildung 23**). Die Epithelien der Nierentubuli sind in der Regel einschichtig doch variiert der Typ der Epithelzellen aufgrund der Funktionen in den unterschiedlichen Regionen. Die einzelnen Tubulusabschnitte wurden

in dieser Arbeit nicht explizit untersucht und zur Übersichtlichkeit nur in einen proximalen, intermediären und distalen Tubulusteil, ohne erneute Unterteilung, gegliedert. Für die CKI δ Detektion stellen sich die Epithelien der Tubuli in unterschiedlichem Ausmaß positiv dar. So erscheinen die distalen Tubulusepithelien stärker zytoplasmatisch markiert als die der proximalen Abschnitte (siehe **Abbildung 7**, **A1** und **B1**, sowie **Abbildung 23**). Ebenfalls eine CKI δ -positive Markierung weisen die Epithelien der Sammelrohre auf (Abbildung nicht gezeigt).

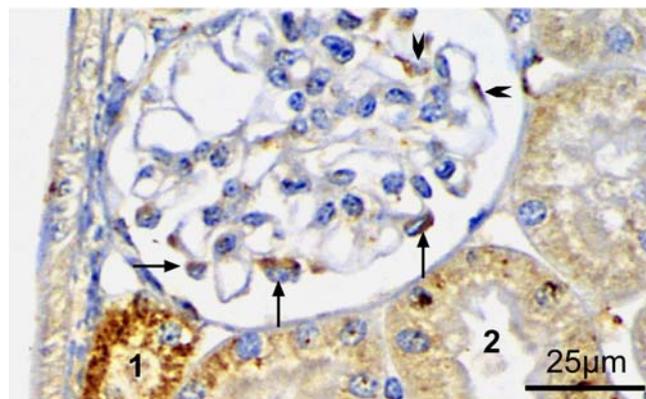


Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in einem Nierenkörperchen einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper 108. Perfusionsfixation mit Bouin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Vergr. 150fach. Zytoplasmatische Markierung der Podozyten (Pfeile) sowie einiger Endothelzellen (Pfeilspitze). Mitangeschnitten ein Anteil eines distalen Tubulus (1), dessen Epithelien eine CKI δ -positive zytoplasmatische Färbung aufweisen. Ebenfalls mit auf der Abbildung zu sehen ist ein Anschnitt durch einen proximalen Tubulus (2) der eine im Vergleich zum distalen Tubulus schwächere zytoplasmatische CKI δ Detektion der Epithelzellen aufweist.

Die Schleimhaut der Harnblase besitzt das für die ableitenden Harnwege typische Übergangsepithel, das sogenannte Urothel, welches sich zusammensetzt aus Basalzellen, Intermediärzellen und den Superfizialzellen (Deckzellen) (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Eine CKI δ -positive Färbung zeigt das Zytoplasma der Basalzellen, sowie der Intermediärzellen. Die Deckzellen erscheinen hingegen negativ (siehe **Abbildung 24**). Eine CKI δ -positive zytoplasmatische Markierung weist die glatte Muskulatur der Tunica mucosa auf.

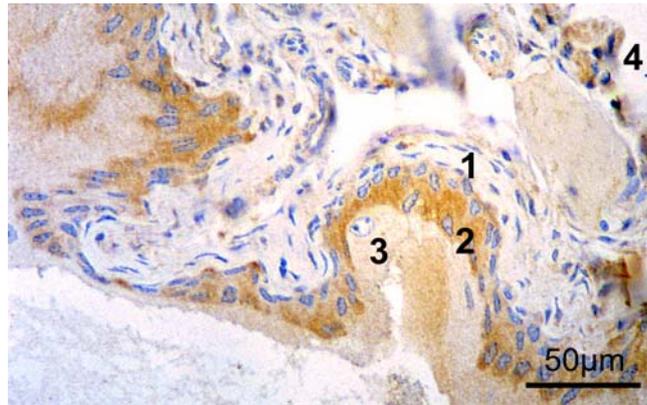


Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in der Harnblase einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper ab10877 (Abcam). Immersionsfixation mit saurem Formalin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Vergr. 100fach. Zytoplasmatische CKI δ Färbung in den Basalzellen (1), sowie in den Intermediärzellen (2). Die Deckzellen (3) hingegen weisen keine Markierung auf. Quergetroffene glatte Muskulatur (4), die ebenfalls eine zyttoplasmatische Markierung für CKI δ aufzeigt.

Die weiblichen Geschlechtsorgane, die in dieser Arbeit untersucht wurden, erfassen nur die des inneren Genitale. Welche wiederum in ihrem Wachstum von den Sexualhormonen gesteuert werden und zyklische Veränderungen in den entsprechenden Organen bewirken. Auf diese zyklischen Veränderungen wurde in dieser Arbeit nicht eingegangen, da nur ein Überblick über die CKI δ Expression in den verschiedenen Organen erfasst werden sollte.

Das Ovar wird unterteilt in eine äußere Rindenzone, in der sich Follikel in verschiedenen Stufen der Entwicklung und Rückbildung befinden mit umgebenden Stroma, sowie in eine innere Markzone, bestehend aus Bindegewebe, glatten Muskelzellen, elastischen Fasern und Gefäßen. Die Primordialfollikel, welche aus einer Eizelle bestehen, die von einer einzigen Lage flacher Follikelepithelzellen umgeben sind, zeigen eine CKI δ -positive zytoplasmatische Markierung. Ebenfalls eine zytoplasmatische Färbung für CKI δ findet sich in den Follikelepithelien der Primärfollikel (siehe **Abbildung 25, A**). Das Follikelepithel wird parallel zum Wachstum der Eizelle höher und mehrschichtig und wird als Stratum granulosum bezeichnet, das aus Granulosazellen besteht (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Auch im Zytoplasma dieser Granulosazellen lässt sich eine CKI δ Expression nachweisen (siehe **Abbildung 25, B**). Schwach positiv für CKI δ stellt sich das Ooplasma der Oozyten sowie das Zytoplasma der Theca interna Zellen, welche die Granulosazellen ummanteln, dar.

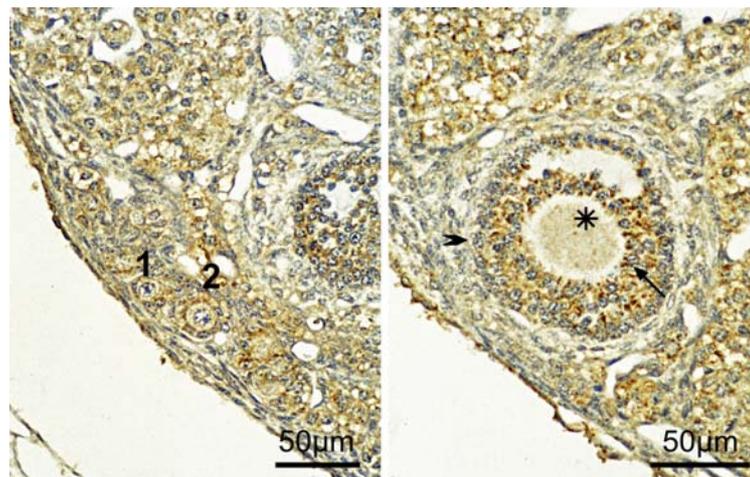


Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in verschiedenen Stadien der Follikelreifung des Ovars einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper 108. Perfusionsexposition mit Bouin. Peroxidase-Reaktion, Farbstoff DAB. **(A):** CKI δ -positives Zytoplasma des Follikel-epithels eines Primordialfollikels (1), sowie eines Primärfollikels (2), **(B):** CKI δ -positive Färbung im Zytoplasma der Granulosazellen eines Tertiärfollikels (Pfeil). Schwache Markierung im Zytoplasma der Theca interna Zellen (Pfeilspitze) sowie im Ooplasm (Stern).

Das Schleimhautepithel der Eileiter setzt sich aus Flimmerzellen und sezernierenden Zellen zusammen. Beide Zelltypen weisen bezüglich der Färbintensität und Lokalisation für CKI δ ein gleiches Detektionsmuster auf, nämlich eine schwache zytoplasmatische Markierung (Abbildung nicht gezeigt). Ebenfalls eine CKI δ -positive zytoplasmatische Markierung ist in der glatten Muskulatur der Tunica muscularis nachweisbar. Zum einen besteht sie aus der autochtonen, tubeneigenen Muskulatur, sowie einer perivaskulären Muskulatur, welche in die autochtone Muskulatur übergeht und in Begleitung der größeren Blutgefäße auftritt und schließlich aus den subperitonealen Muskelbündeln (Drenckhahn und Zenker, 1994b).

Die Wand des Uterus besteht aus drei Schichten, Endometrium (Tunica mucosa), Myometrium (Tunica muscularis) und Perimetrium (Tunica serosa), (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Auch hier kann in jeder dieser Wandschichten eine CKI δ Expression detektiert werden, wobei unterschiedlich starke Färbungen zu sehen sind. Das Endometrium setzt sich aus einem einschichtig, hochprismatischen Oberflächenepithel, tubulösen Drüsen (Glandulae uterinae) sowie dem Stroma zusammen. Im Zytoplasma des Oberflächenepithels lässt sich wie im Zytoplasma des Drüsenepithels eine CKI δ Expression nachweisen. Das Stroma des Endometriums besteht aus einem gefäßreichen, faserarmen und zellreichen, lockeren Bindegewebe. Dieses enthält eine funktions- und zyklusabhängige Zahl von freien Zellen wie Leukozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Eine starke CKI δ Färbung weist wie bisher beschreiben, das Zytoplasma der

Plasmazellen auf. Da es sich um ein sehr gefäßreiches Stroma handelt, sind auch die Endothelien gut zu erkennen, welche in allen untersuchten Geweben eine unterschiedlich stark ausgeprägte Färbung zeigen. In den mesenchymartigen Bindegewebszellen des Stromas lässt sich ebenfalls eine für CKI δ positive zytoplasmatische Markierung nachweisen (siehe **Abbildung 26**). Das Myometrium, bestehend aus einem Geflecht glatter Muskulatur und Gefäßen, zeigt eine zytoplasmatische Reaktion für CKI δ . Es ist jedoch in der Färbeintensität schwächer als das beschriebene Oberflächenepithel des Endometriums, wie aus **Abbildung 26** ersichtlich.

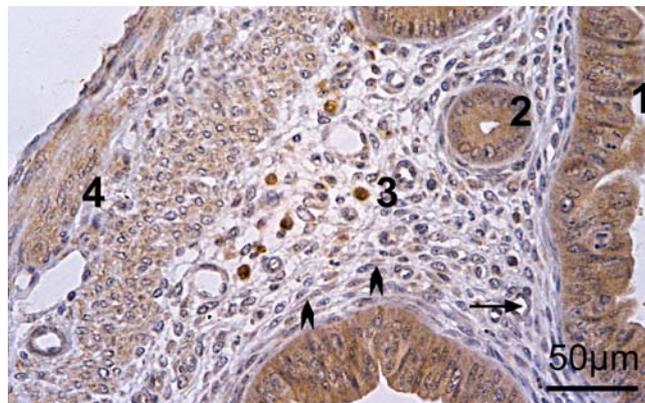


Abbildung 26: Immunhistochemischer Nachweis der CKI δ Expression im Uterus einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ mit dem Antikörper ab10877 (Abcam). Immersionsfixation mit saurem Formalin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. CKI δ -positives Reaktionsmuster im Zytoplasma des Oberflächenepithels (1) und der tubulösen Drüsen (2) des Endometriums. Starke zytoplasmatische CKI δ Expression der Plasmazellen des Stromas (3). Eine schwächere Detektion weist dagegen das Zytoplasma der Bindegewebszellen des Stromas (Pfeilspitzen) sowie der Endothelzellen (Pfeile) der Gefäße auf. In den glatten Muskelzellen (4) des Myometriums, in Quer- und Längsrichtung angeschnitten, lässt sich ebenfalls eine zytoplasmatische Markierung für CKI δ nachweisen.

Im mehrschichtigen, unverhornenden Plattenepithel der Vaginalschleimhaut, kann ebenfalls eine CKI δ Markierung nachgewiesen werden. Das Vaginalepithel, welches sich aus Basal-, Parabasal-, Intermediär- und Superfizialzellen zusammensetzt, steht wie oben aufgeführt unter dem hormonellen Einfluss der Geschlechtsorgane, was sich während der einzelnen Phasen des Zyklus durch charakteristische Veränderungen dieser Zellen bemerkbar macht. So wird während der ersten Zyklushälfte unter steigenden Östrogenspiegeln ein Ausreifen der Superfizialzellen beschrieben (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Diese Zellen sammeln im Zytoplasma Glykogen an, wodurch der Zellkern komprimiert wird, verkleinert erscheint und viel Zytoplasma sichtbar wird. Eine zytoplasmatische CKI δ Markierung ist in allen Schichten des Vaginalepithels anzutreffen, jedoch zeigen sich bezüglich der Färbeintensität vereinzelt stärker markierte Zellen, die überwiegend in der Intermediär- und Superfizialzellschicht lokalisiert sind (siehe **Abbildung 27**).

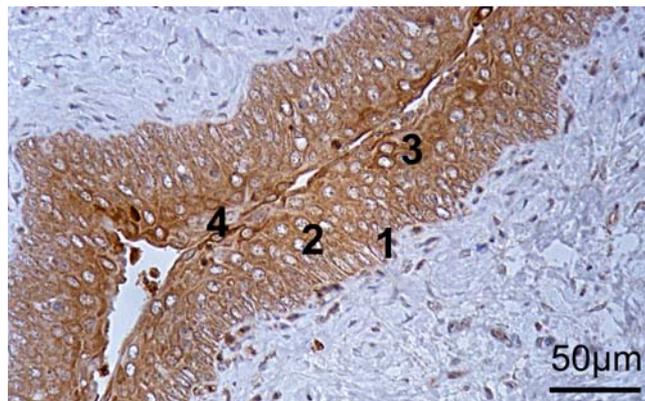


Abbildung 27: Immunhistochemischer Nachweis der CKI δ Expression in der Vagina einer 6 Wochen alten BALB/c Maus (siehe S.87). Detektion von CKI δ durch den Antikörper ab10877 (Abcam). Immersionsfixation mit saurem Formalin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Homogene CKI δ -positive Reaktion im Zytoplasma der Basalzellen (1) und Parabasalzellen (2). Das Zytoplasma der Intermediärzellen (3) sowie der Superfizialzellen (4) zeigt zum Teil eine sehr starke CKI δ Färbung. Vergr. 100fach.

Die Brustdrüsen, bei denen es sich um bilateral angelegte Hautdrüsen handelt, werden ebenfalls in diesem Kapitel abgehandelt, da auch sie unter dem Einfluss der Geschlechtshormone stehen. Brustdrüsen von 4-6 Wochen alten BALB/c Mäusen wurden ebenfalls auf eine CKI δ Expression hin untersucht. Unabhängig vom Alter der untersuchten Mäuse zeigte sich keine erkennbare Markierung. Eine CKI δ Expression lässt sich allerdings im Zytoplasma tubulo-alveolärer Drüsen lactierender Mäuse nachweisen (Abbildung nicht gezeigt, persönliche Kommunikation mit Dr. J. Löhler).

Die Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) des Hodens bestehen aus dem Keimepithel, sowie einer myofibrösen Hülle (Lamina propria). Das Keimepithel selbst, setzt sich aus den Keimzellen und Stützzellen, den sogenannten Sertoli-Zellen, zusammen (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Die Spermatogenese bezeichnet den Vorgang der Keimzellvermehrung, Reifeteilung und Differenzierung der Keimzellen zu Samenzellen, den Spermatozoen (Rossen-Runge, 1962). Die Spermatozoen außer an der Basalmembran der Kanälchen gelegen, werden nochmals unterteilt in Spermatozoen Typ A, die als Stammzellen der Samenbildung gelten und in Spermatozoen Typ B, die einen weiter entwickelten Zelltyp darstellen (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Nach mitotischer Teilung dieser B-Spermatozoen entstehen Spermatozoen I. Nach der ersten meiotischen Teilung entstehen zwei Spermatozoen II. Nach Abschluss der zweiten meiotischen Teilung gehen aus den Spermatozoen II die Spermatozoen hervor, die sich dann zu reifen Spermatozoen differenzieren und im Lumen der Samenkanälchen liegen. Mit dem spezifischen CKI δ Antikörper NC10, lässt sich eine CKI δ Expression in vereinzelt Spermatozoen im Zellkern als auch im

Zytoplasma nachweisen. Die spezifischen CKI δ Antikörper 108 und ab10877 (Abcam) zeigen zudem noch eine Markierung des Zytoplasmas der Spermatozyten I (siehe **Abbildungen 9** und **Abbildung 28**).

Einen hohen Grad der CKI δ Expression weisen die Leydig-Zellen auf, die im interstitiellen Gewebe zwischen den Samenkanälchen des Hodens liegen. Diese Zellen, die Abkömmlinge von Nervenzellen sind (Davidoff et al., 1996) und zu dem neuroendokrinen Zellsystem gehören bilden das männliche Keimdrüsenhormon Testosteron und weitere Substanzen wie z.B. Indolamine, Katecholamine, Wachstumsfaktoren (Holstein, 1999). Die Leydig-Zellen zeigen eine für CKI δ positive Färbereaktion, die sich jedoch in den einzelnen Zellen unterschiedlich darstellt. Einige Zellen zeigen eine für CKI δ starke zytoplasmatische Markierung, andere Zellen weisen lediglich eine Zytoplasmamembran-Markierung auf, wohingegen in einem Teil der Zellen keine Markierung nachgewiesen werden kann (siehe **Abbildung 28**).

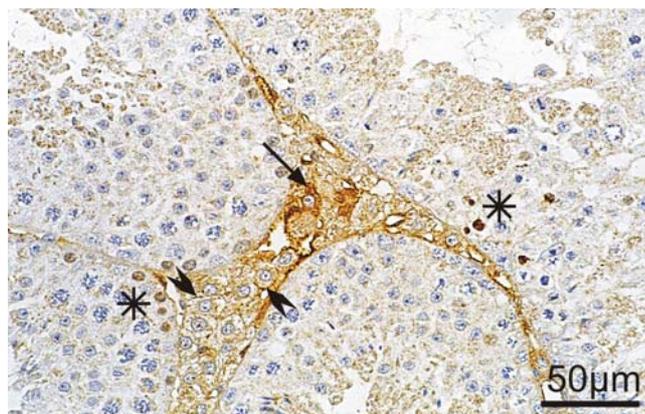


Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis der CKI δ Expression im Hoden einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper NC10. Perfusionsfixation mit Bouin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. CKI δ -positive Reaktion der Spermatozyten (Stern). CKI δ -positive Markierung der Leydig-Zellen, mit Lokalisation im Zytoplasma (Pfeil) als auch in der Zytoplasmamembran (Pfeilspitze). Vergr. 100fach.

Im Nebenhoden findet der Transport der Spermien und ihre Reifung statt. Zudem dient er als Speicher der fertilen und beweglichen Spermien. Durch aktive Sekretions- und Resorptionsprozesse in den einzelnen Abschnitten des Nebenhodens wird ein Milieu für die funktionelle Ausreifung der Spermien geschaffen (Robaire und Viger, 1995). Ebenfalls unterliegt der Nebenhoden, wie die weiblichen Geschlechtsorgane, hormonellen Einflüssen. Makroskopisch wird der Nebenhoden unterteilt in den Nebenhodenkopf (Caput epididymidis), den Nebenhodenkörper (Corpus epididymidis) und den Nebenhodenschwanz

(Cauda epididymidis). Die Ductuli efferentes, die von den Spalträumen des Rete testis ausgehen, bilden einen großen Teil des Nebenhodenkopfes. Die Wand besteht aus einem unterschiedlich hohen, mehrreihigen Epithel aus hochprismatischen Zellen mit einem Bürstensaum sowie Zellen mit Kinozilien und mehreren Lagen gering differenzierter glatter Muskelzellen (Drenckhahn und Zenker, 1994b). In den Ductuli efferentes lässt sich eine für CKI δ -positive Färbung des Zytoplasmas der Epithelzellen nachweisen. Das Epithel des sich anschließenden Nebenhodenkanals (Ductus epididymidis) besteht aus einem gleichmäßig hohen, zweireihigen Epithel, welches sich aus basalen Zellen sowie hochprismatischen Zellen mit Stereozilien zusammensetzt (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Die Höhe sowie der Reichtum an Zellorganellen im Zytoplasma des Epithels nimmt nach distal ab. Die Stärke der glatten Muskelschicht, die den äußeren Wandanteil des Ductus epididymidis bildet, steigt im Verlauf nach distal jedoch deutlich an. CKI δ kann im Zytoplasma der Epithelzellen des Ductus epididymidis detektiert werden. Hier zeigen die einzelnen Zellen jedoch eine heterogene CKI δ Expression. In den basalen Zellen variiert die zytoplasmatische Markierung in der Farbeintensität von gut zu stark, wie auch im Zytoplasma der hochprismatischen Zellen (siehe **Abbildung 29**). Die glatten Muskelzellen zeigen hingegen eine homogene CKI δ Expression, nachweisbar jedoch nur in den distalen Anteilen des Nebenhodens.



Abbildung 29: Immunhistochemischer Nachweis der CKI δ Expression im Nebenhoden (Ausschnitt aus dem Kopfbereich) einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper 108. Perfusionsfixation mit Bouin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. CKI δ -positive Markierung im Zytoplasma der basalen Zellen (Pfeilspitzen), sowie im Zytoplasma der hochprismatischen Zellen (Pfeile). Mitangeschnitten ein Gefäß mit CKI δ -positiven Endothelzellen (Stern). Vergr. 100fach.

Der Samenleiter (Ductus deferens), verbindet den Nebenhoden mit der Harnröhre und setzt sich aus einer kräftigen Tunica muscularis, bestehend aus glatter Muskulatur, sowie einer Tunica mucosa zusammen. Das Epithel des Ductus deferens ist zweireihig, hochprismatisch

und weist eine CKI δ -positive zytoplasmatische Markierung auf. Ebenfalls CKI δ -positiv stellen sich die glatten Muskelzellen dar (nicht abgebildet).

Auf eine mögliche CKI δ Expression wurden auch akzessorische Geschlechtsdrüsen untersucht, diese sind den samenableitenden Wegen angeschlossen. Ihre Funktion ist abhängig von der Testosteronproduktion im Hoden (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Es handelt sich hierbei um die Samenblase (Vesicula seminalis), die Vorsteherdrüse (Prostata) sowie die Cowpersche Drüse (Glandula bulbourethralis, wurde nicht untersucht).

Die Samenblase hat einen irreführenden Namen, da sie normalerweise keine Samenzellen enthält, sondern ein Sekret sezerniert, welches der Samenflüssigkeit beigemischt wird. Das Epithel ist ein- bis zweireihig, hochprismatisch und enthält in der Nähe der Zellkuppen zahlreiche Sekretgranula, die an der Zelloberfläche ins Lumen der Samenblase abgegeben werden (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Das Ausmaß der sekretorischen Aktivität ist jedoch testosteronabhängig und wurde in dieser Arbeit nicht weitergehend untersucht. Es lässt sich eine CKI δ -positive, zytoplasmatische Färbung des Epithels der Samenblase nachweisen. Ebenso weist die Wand der Samenblase, die aus einem Geflecht glatter Muskelzellen besteht, eine CKI δ positive Markierung auf (nicht abgebildet).

Die Prostata besteht aus verzweigten tubuloalveolären Drüsen, deren Epithel uneinheitlich gestaltet ist. Es handelt sich um ein zwei- bis mehrreihiges Epithel, dessen Zellen hochprismatisch, isoprismatisch oder flach sein können. Die Form der Epithelzellen hängt wiederum ab von ihrer sekretorischen Aktivität, von der hormonellen Situation sowie vom Alter (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Die hochprismatischen Zellen werden als eigentliche Drüsenzellen bezeichnet, sie enthalten an ihrer apikalen Zelloberfläche zahlreiche Sekretgranula, die an der Zelloberfläche ins Lumen abgegeben werden. Diese hochprismatischen Zellen der Prostata zeigen eine CKI δ positive Markierung des Zytoplasmas, wobei diese in der apikalen Region eine stärkere Expression als in den basalen Anteilen aufzeigen (siehe **Abbildung 30**). Im Bindegewebe der Prostata befinden sich ebenfalls viele glatte Muskelzellen, in denen eine CKI δ Expression nachweisbar ist.

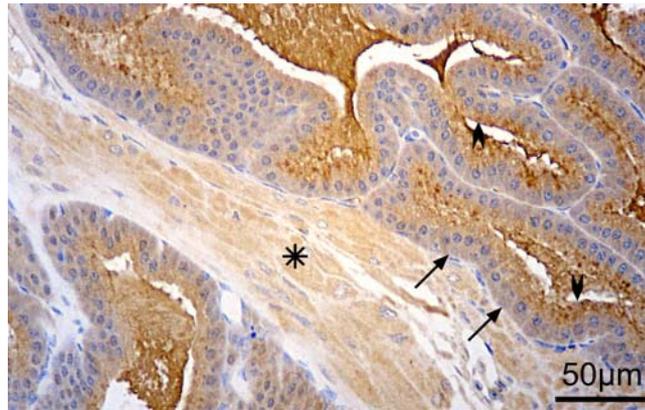


Abbildung 30: Immunhistochemischer Nachweis der CKI δ Expression in der Prostata einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper ab10877 (Abcam). Immersionsfixation mit saurem Formalin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. CKI δ -positive Reaktion in den basalen (Pfeile), sowie in den apikalen (Pfeilspitzen) Anteilen des Zytoplasmas der Epithelzellen. Ebenfalls CKI δ -positive Markierung der glatten Muskelzellen (Stern). Vergr. 100fach.

4.2.3.6 CKI δ Expression in den Endokrinen Drüsen

Als endokrine Drüsen werden solche Drüsen zusammengefasst, die ihr Sekret nicht an eine äußere oder innere Oberfläche des Körpers, sondern in das Gefäßsystem abgeben (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Diese an das Blut oder die Lymphe abgegebenen Stoffe, bezeichnet man als Hormone. Es lassen sich zwei molekulare Wirkmechanismen unterscheiden. Zum einen binden die Hormone an einen zytoplasmatischen Rezeptor der Zielzelle, wie es z.B. für die Steroidhormone typisch ist. Dieser Rezeptor-Ligand-Komplex bewirkt anschließend die Expression eines, oder mehrere Gene im Zellkern. Zum anderen lagern sich die Hormone an einen membranständigen Rezeptor an und induzieren eine Signalübertragung, z.T. mit Hilfe von Second-Messengern. Diese bewirken wiederum eine Aktivierung von Transportmechanismen oder von Enzymen in der Zielzelle (Drenckhahn und Zenker, 1994b).

Da die endokrinen Zellen im Organismus in verschiedenen Organisationsformen vorkommen, werden zur Übersichtlichkeit hier nur die makroskopisch abgrenzbaren endokrinen Organe aufgeführt sowie die Langerhansschen Insel des Pankreas, als „endokrines Mikroorgan“. Die einzelnen endokrinen Drüsen, die bezüglich ihrer CKI δ Expression untersucht wurden, sind in **Tabelle 13** zusammengefasst.

Dennoch sollen hier die disseminierten endokrinen Zellen erwähnt werden, die als Einzelelemente im Epithelverband verschiedener Organe vorkommen. Diese auch als diffuses neuroendokrines System oder APUD-Zellsystem (APUD: amine precursor uptake and decarboxylation) (Pearse, 1977) bezeichneten Zellen werden, im Falle einer nachweisbaren CKI δ Expression, in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

Organ	Gewebe / Zelltypus	NC10	108	ab10877
Hypothalamus				
	Nucleus supraopticus	+++	+++	+++
Hypophyse				
<ul style="list-style-type: none"> • Adenohypophyse • Neurohypophyse 	Drüsenzellen	+++	+++	+++
	Marklose Nervenfaserverendigungen	++ (+)	++ (+)	++ (+)
	Pituizyten	++ (+)	++ (+)	++ (+)
Glandula thyroidea (Schilddrüse)				
	Follikelepithel	++ (+)	++ (+)	++ (+)
Glandula parathyroidea (Nebenschilddrüse)				
	Hauptzellen	++ (+)	++ (+)	++ (+)
Glandula suprarenalis (Nebenniere)				
<ul style="list-style-type: none"> • Nebennierenrinde • Nebennierenmark 	Glomerulosa Zellen	++ (+)	++ (+)	++ (+)
	Fasciculata Zellen	+	+	+
	Reticularis Zellen	+	+	+
	Chromaffine Zellen	++ (+)	++ (+)	++ (+)
Pankreas (Bauchspeicheldrüse)				
• Endokriner Anteil	Inselzellen	++ (+)	++ (+)	++ (+)

Tabelle 13 CKI δ Expression in den Endokrinen Drüsen. Die Detektion von CKI δ wurde anhand der Färbeintensität des jeweils verwendeten Antikörpers mit der folgenden Skalierung, die in der Tabelle aufgeführt ist, evaluiert: - negativ, -/+ blass, + schwach, ++ gut, +++ stark

Die Hypophyse, die aus zwei Anteilen besteht, Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse) und Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse), weist jeweils eine CKI δ Markierung auf. Die Adenohypophyse, welche den größeren Anteil der Drüse bildet, gliedert sich nochmals in eine Pars distalis, eine Pars infundibularis sowie in eine Pars intermedia (Drenckhahn und

Zenker, 1994b). Die Hypophyse synthetisiert mehrere Hormone, von denen bekannt ist, dass sie die Funktion von anderen endokrinen Drüsen steuern. Zu den wichtigsten Hormonen des Hypophysenvorderlappens gehören Corticotropin (ACTH), β - γ -Lipotropin (LPH), α - β -Melanotropin (MSH), β -Endorphin, Follikelstimulierendes Hormon (FSH), Luteinisierendes Hormon (LH), Prolaktin (PRL), Thyreotropin (TSH) sowie das Wachstumshormon (GH, Somatotropin) (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Die sekretorischen Zellen des Hypophysenvorderlappens werden wiederum durch ein breites Spektrum von Faktoren beeinflusst. Primär durch die im Hypothalamus synthetisierten Releasing- bzw. Inhibitorischen-Hormone und durch Feedback-Signale der Zielorgane der hypophysären Hormone. Jedoch besteht ein stetig zunehmender Katalog von Faktoren, von denen bekannt ist, dass sie in der Adenohypophyse gebildet und sezerniert werden sowie innerhalb der Adenohypophyse sekretorische Zellen beeinflussen (Schwartz, 2000). Diese interzellulären Interaktionen innerhalb der Adenohypophyse sind sehr komplex und man geht davon aus, dass diese Interaktionen in der Lage sind, die Reaktionen auf extrahypophysäre Signale zu mäßigen oder zu verstärken (Schwartz, 2000). Zudem wurde in adulten Mäusen ein Unterschied in der geschlechtsspezifischen Verteilung von hormonproduzierenden Zellen beschrieben (Sasaki und Iwama, 1988). Aufgrund der Komplexität der Hypophyse wurde im Rahmen dieser Arbeit keine Rücksicht auf physiologische Prozesse und die damit verbundenen Interaktionen bzw. involvierten Signalwege genommen. Es soll vielmehr nur ein Überblick vermittelt werden, ob sich in Zellen der Hypophyse eine CKI δ Expression immunhistochemisch nachweisen lässt. In der Adenohypophyse zeigt sich in den Zellen der Pars distalis, als auch in der Pars intermedia ein unterschiedlich stark ausgeprägtes, CKI δ -positives zytoplasmatisches Detektionsmuster (siehe **Abbildung 31**). Die Pars infundibularis, liegt als Fortsetzung der Pars distalis, auf dem Hypophysenstiel. Aufgrund der schwierigen Präparations-Bedingungen der Hypophyse der Maus wurde dieser Anteil der Hypophyse nicht dargestellt.

Die Neurohypophyse setzt sich zusammen aus der Pars nervosa und dem Infundibulum. Das Gewebe der Neurohypophyse besteht zum größten Teil aus marklosen Nervenfasern, deren Perikaryen im Hypothalamus liegen sowie aus speziell gestalteten Gliazellen (Pituizyten) und Blutgefäßen. Die meisten Nervenzellen, deren Neuriten im Infundibulum bzw. in der Pars nervosa enden, sind neurosekretorisch tätig. Morphologisch und biochemisch werden zwei große Systeme neurosekretorischer Fasern beschrieben (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Zum einen Nervenfasern, die in der Innenzone des Hypophysenstiels (Zona interna infundibuli) verlaufen und zum anderen die Nervenfortsätze, die in der äußeren Schicht des

Infundibulums (Zona externa infundibuli) verlaufen. Die großzelligen Kerngebiete des Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis bilden die Hormone Oxytocin oder Vasopressin. Die Nervenfasern dieser Kerne ziehen in der Zona interna infundibuli zur Pars nervosa. In den Axonen werden die Hormone, die an ein Trägerprotein (Neurophysin) gebunden sind, in kleinen Vesikeln transportiert. In den in der Pars nervosa liegenden Axonenden werden diese in Form von kleineren oder größeren Sekretvesikeln gespeichert (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Beim Eintreffen von Aktionspotentialen wird der Inhalt dieser neurosekretorischen Granula durch Exozytose an den Axonenden in die Umgebung abgegeben. Bei dieser Sekretabgabe scheinen die Pituizyten eine Rolle zu spielen (Hatton, 1988; Rosso et al., 2002).

CKI δ lässt sich in den Anteilen der Pars nervosa der Neurohypophyse in Form von feinen granulären Strukturen nachweisen, die zum einen in Gefäßnähe liegen, und zum anderen im Zytoplasma der Pituizyten zu finden sind (siehe **Abbildung 31, D**).

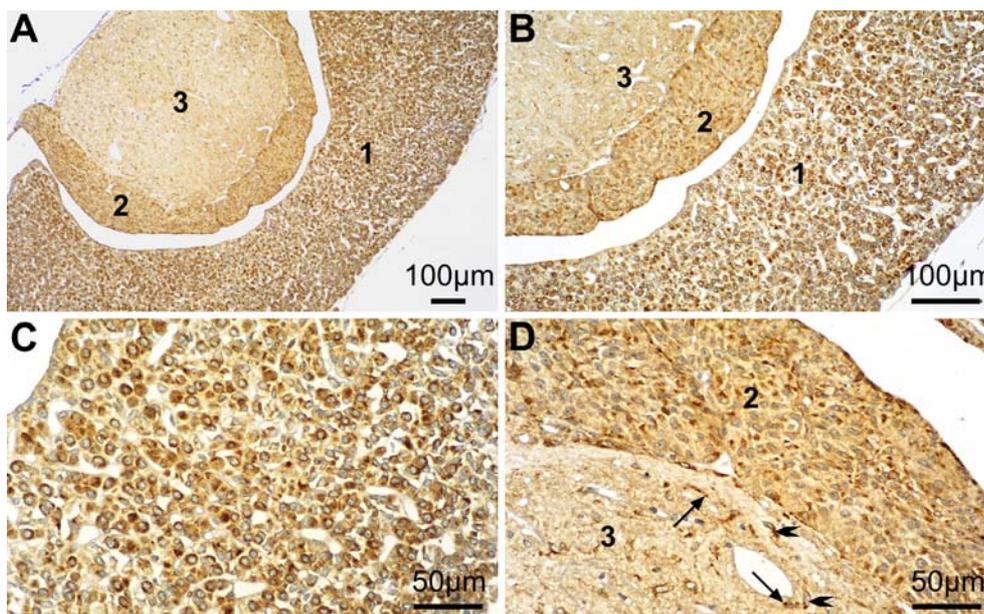


Abbildung 31: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in der Hypophyse einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper 108. Perfusionsfixation mit Bouin. Peroxidase-reaktion, Farbstoff DAB. **(A): Übersicht der Hypophyse.** Adenohypophyse: (1) Pars distalis, (2) Pars intermedia. (3) Neurohypophyse. Vergr. 25fach. **(B): Übersicht der Hypophyse bei größerer Vergrößerung.** Positive Färbereaktion für CKI δ in der Pars distalis (1), wie auch in der Pars intermedia (2) der Adenohypophyse sowie in der Neurohypophyse (3). Vergr. 50fach. **(C): Ausschnitt der Pars distalis der Adenohypophyse.** Überwiegend starke CKI δ Expression im Zytoplasma der sekretorischen Drüsenzellen. Daneben finden sich vereinzelt Drüsenzellen die eine schwache für CKI δ -positive zytoplasmatische Markierung aufweisen. Vergr. 100fach. **(D): Ausschnitt aus der Pars intermedia der Adenohypophyse sowie der Neurohypophyse.** Die Drüsenzellen der Pars intermedia (2) zeigen in einigen Zellen eine starke CKI δ Expression, wohingegen sich im überwiegenden Anteil der Zellen eine von der Färbintensität gute zytoplasmatische Markierung von CKI δ nachweisen lässt. In der Pars nervosa der Neurohypophyse (3) lassen sich feine granuläre CKI δ -positive Strukturen in Gefäßnähe (Pfeile) als auch im Zytoplasma der Pituizyten nachweisen (Pfeilspitzen). Vergr. 100fach.

Wie bereits erwähnt, synthetisieren spezielle Kerngebiete im Hypothalamus Hormone. Zur Vervollständigung seinen zu den bereits genannten großzelligen Kerngebieten auch die kleinzelligen Kerngebiete des Hypothalamus erwähnt, die ebenfalls zur Hormonsynthese befähigt sind. In diesen Kerngebieten werden die Releasing- bzw. Inhibiting-Hormone gebildet, die für die Regulation der Hormonsekretion aus der Hypophyse wichtig sind. Die Nervenendigungen dieser Kerne verlaufen in der Zona externa infundibuli bis zu den Schlingen des Portalsystems, transportieren die Hormone in granulärer Form und geben diese ebenfalls nach entsprechendem Reiz durch Exozytose an den Axonenden in die Umgebung ab. Die Kerngebiete des Hypothalamus wurden nicht explizit auf eine CKI δ Expression untersucht, jedoch ließen sich bei einem Anschnitt durch das ZNS die Nervenzellen des Nucleus supraopticus, der den großzelligen Kerngebieten des Hypothalamus angehört, darstellen. In den Perikaryen dieses Kerngebietes lässt sich eine starke CKI δ Expression nachweisen (siehe **Abbildung 32**).

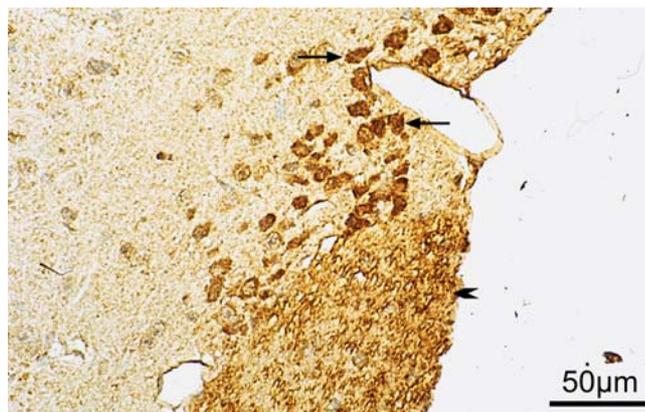


Abbildung 32: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in den Nervenzellen des Nucleus supraopticus einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper NC10. Perusionsfixation mit saurem Formalin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Die Perikaryen (Pfeile) zeigen eine starke CKI δ Reaktivität. Ebenfalls positiv für CKI δ sind die mitangeschnittenen Markscheiden (Pfeilspitze). Vergr. 100fach.

Die Schilddrüse, als weiteres endokrines Organ, wurde ebenfalls auf eine mögliche CKI δ Expression untersucht. Die Schilddrüse besteht aus einer großen Zahl von epithelialen Hohlkörperchen, den sogenannten Follikeln, unterschiedlicher Größe. Das Innere dieser Follikel ist mit Sekret (Kolloid) gefüllt, welches die Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3) und Tetrajodthyronin (T4) in einer an ein Glykoprotein gebundene, inaktiven Form (Thyreoglobulin) enthält (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Die Größe und Gestalt der Follikel sowie die Menge des Kolloids unterscheidet sich in Abhängigkeit vom endokrinen Status, dem Ernährungszustand, dem Geschlecht sowie dem Alter (Fujita et al., 1980; Neve

und Rondeaux, 1991). Die Wand der Schilddrüsenfollikel besteht aus einem einschichtigen Epithel, dessen Höhe vom Funktionszustand abhängig ist. Inaktive Follikel weisen ein flaches Epithel auf, während die aktiven Follikel ein kubisch bis prismatisches Epithel aufweisen. Für CKI δ kann eine Markierung im Zytoplasma des Follikelepithels detektiert werden. Auffällig hierbei ist, dass nur die aktiv sezernierenden Schilddrüsenzellen eine starke und gleichmäßige zytoplasmatische Markierung aufweisen. Die Follikel, in denen das im Kolloid gespeicherte Hormon nicht unmittelbar benötigt oder abgebaut wird, gehen in eine sogenannte Ruhe- oder Stapelform über (Drenckhahn und Zenker, 1994b) und zeigen kleinere und flachere Epithelzellen. In diesen Stadien ist eine CKI δ Markierung nur in abgeschwächter Form darstellbar (siehe **Abbildung 33**). Zur Vervollständigung seien noch die parafollikulären Zellen (C-Zellen), die das Hormon Calcitonin bilden, erwähnt. In der Schilddrüse der Maus erscheinen diese Zellen nicht sehr prominent und können daher nur durch spezielle Färbemethoden für Calcitonin sichtbar gemacht werden. Aus diesem Grund findet diese Zellpopulation keine besondere Berücksichtigung in Bezug auf eine mögliche CKI δ Expression.

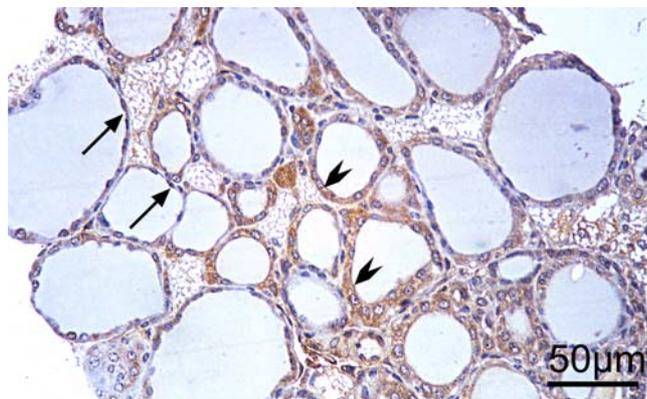


Abbildung 33: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ der Schilddrüse einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper NC10. Immersionsfixation mit saurem Formalin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Zytoplasmatischer Nachweis von CKI δ in den Follikelepithelien. Vergleich zwischen inaktiven Follikeln (Pfeile) und aktiven Follikeln (Pfeilspitze). Vergr. 100fach.

Auch die Nebenschilddrüsen zeigen eine hohe Anzahl CKI δ exprimierender Zellen. Histologisch besteht das Nebenschilddrüsenparenchym aus Strängen und Nestern epithelialer Zellen, die wiederum in unterschiedliche Zelltypen eingeteilt werden. Der vorherrschende Zelltyp sind die Hauptzellen, die einem sekretorischen Zyklus unterliegen, d.h. sie wechseln zwischen aktivem und inaktivem Stadium (Sun et al., 1993) und sind für die Parathormon (PTH)-Synthese zuständig. Beim Menschen werden noch oxyphile Zellen beschrieben, deren

Funktion noch ungenügend geklärt ist (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Diese oxyphilen Zellen sind jedoch bei Ratten und Mäusen in der Nebenschilddrüse nicht vorhanden (Stinson et al., 1990). Wie aus **Abbildung 34** ersichtlich zeigen die Hauptzellen der Nebenschilddrüse eine unterschiedlich stark ausgeprägte CKI δ Expression sowohl im Zytoplasma als auch in der Kernmembran.

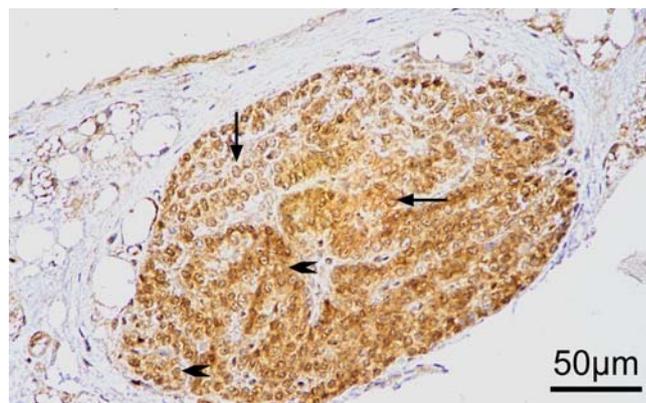


Abbildung 34: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ der Nebenschilddrüse einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper 108. Immersionsfixation mit Bouin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Unterschiedlich starke Färbintensität für CKI δ im Zytoplasma (Pfeilspitze) und der Kernmembran (Pfeil) der Hauptzellen. Vergr. 100fach.

Als weitere hormonproduzierende Drüse ist die Nebenniere zu nennen, die sich aus Nebennierenrinde und Nebennierenmark zusammensetzt. Histologisch lässt sich die Nebennierenrinde nochmals in eine Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis unterteilen. In der Nebennierenrinde werden ca. 100 verschiedene Steroide gebildet, von denen die meisten jedoch nicht sezerniert werden und hormonell inaktiv sind (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Bisher kann keine genaue Korrelation zwischen bestimmten Zelltypen und der Bildung der verschiedenen Nebennierenrindenhormonen getroffen werden. Man geht jedoch davon aus, dass die Mineralokortikoide vorwiegend in der Zona glomerulosa synthetisiert werden. Die Glukocorticoide und Androgene scheinen hingegen in allen Zonen, hauptsächlich jedoch in der Zona fasciculata und reticularis zu entstehen (Drenckhahn und Zenker, 1994b). In der Maus finden sich einige anatomische Besonderheiten. Lichtmikroskopisch ist nur die Zona glomerulosa und die Zona fasciculata unterscheidbar, die Zona reticularis und die Zona fasciculata erscheinen gleich. Weiterhin wurde eine zwischen Rinde und Mark gelegene Zone X beschrieben, die man bei jungen Tieren findet und die aus kleinen Zellen besteht. Bei der männlichen Maus verschwindet diese Zone mit

Erreichen der sexuellen Reife, bei der weiblichen Maus mit der ersten Trächtigkeit (Firth, 1983). Die Histophysiologie dieser Drüse und die Auswirkungen auf die einzelnen Zonen, wurde aufgrund des komplexen Zusammenspiels unterschiedlichster Faktoren in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da nur ein Überblick über eine mögliche CKI δ Expression der einzelnen Zonen gegeben werden sollte.

Wie aus **Abbildung 35** ersichtlich, ist eine CKI δ Expression in den Zonen der Nebennierenrinde unterschiedlich stark ausgeprägt. In der Zona glomerulosa lässt sich eine CKI δ zytoplasmatische Markierung nur in wenigen Zellen nachweisen. Die Zytoplasmamembran ist jedoch in allen Zellen der Zona glomerulosa einheitlich markiert, ebenso die Kernmembran. Die sich anschließende Zona fasciculata und Zona reticularis zeigen hingegen eine in ihrer Färbintensität abgeschwächte, jedoch homogene zytoplasmatische CKI δ Markierung.

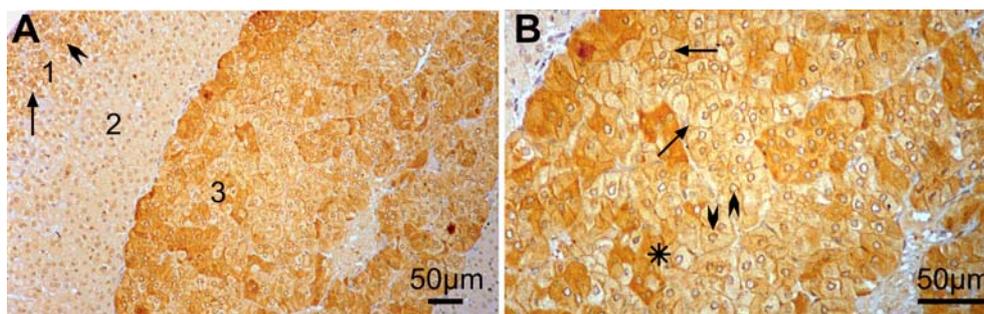


Abbildung 35: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ der Nebenniere einer 6 Wochen alten, männlichen BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper ab10877 (Abcam). Immersionsfixation mit saurem Formalin. Peroxidase-reaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Übersicht der Nebenniere. In der Zona glomerulosa (1) lässt sich eine CKI δ -positive Markierung im Zytoplasma der Zellen sowie der Zytoplasma- (Pfeil) und Kernmembran (Pfeilspitze) nachweisen. Die Zona fasciculata und reticularis (2) zeigen bezüglich der Färbintensität eine deutlich schwächere, jedoch homogene CKI δ -positive Färbung des Zytoplasmas. CKI δ -positives Markierungsmuster für das Nebennierenmark (3). Vergr. 50fach. **(B):** Nebennierenmark. CKI δ -positive Reaktivität der Zytoplasma- (Pfeile), sowie der Kernmembran (Pfeilspitzen) der Zellen des Nebennierenmarks. In vereinzelt Zellen Nachweis einer starken zytoplasmatischen CKI δ Expression (Stern). Vergr. 100fach.

Das Nebennierenmark der meisten Säuger besteht aus zwei unterschiedlichen Zelltypen, die Adrenalin oder Noradrenalin synthetisieren und speichern (Verhofstad et al., 1985). Diese Zellen können durch immunhistochemische Verfahren, durch Einsatz von Antikörpern gegen Noradrenalin oder Adrenalin, voneinander abgegrenzt werden. In dieser Übersichtsarbeit zur Untersuchung einer möglichen CKI δ Expression wurde keine Differenzierung dieser Zelltypen vorgenommen. Auch wurde nicht näher auf die physiologischen Prozesse, die eine Rolle bei der Regulation der Hormonausschüttung spielen, eingegangen. Im Nebennierenmark lässt sich eine unterschiedlich stark ausgeprägte CKI δ Expression

nachweisen. Es zeigen sich Zellen, die eine positive CKI δ Markierung des Zytoplasmas aufweisen, diese variiert in ihrer Färbeintensität von einzelnen Zellen, die eine schwache Markierung zeigen, bis hin zu Zellen, in denen sich eine starke Färbeintensität nachweisen lässt. Zudem zeigt sich eine homogene CKI δ -positive Zytoplasmamembran-Markierung, jedoch eine heterogene Kernmembran-Markierung den Zellen des Nebennierenmarks (siehe **Abbildung 35, A und B**).

In diesem Kapitel wird neben den makroskopisch abgrenzbaren endokrinen Drüsen auch der endokrine Anteil des Pankreas abgehandelt. Die Bauchspeicheldrüse selbst zählt nicht zu den endokrinen Drüsen, da nur die Langerhansschen Inseln, nicht aber die exokrinen Drüsen des Pankreas, zur Hormonproduktion befähigt sind. Im Menschen lassen sich verschiedene endokrine Zelltypen, in den Langerhansschen Inseln nachweisen (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Es handelt sich dabei um A-Zellen, die Insulin produzieren, B-Zellen die zur Glukagon-Synthese befähigt sind sowie D-Zellen, welche Somatostatin synthetisieren und F-Zellen die das pankreatische Polypeptid (PP) produzieren. Des weiteren wurden, zudem Peptid YY-, Neuropeptid YY- (Ali-Rachedi et al., 1984) und Chromogranin-immunoreaktive Zellen (Rindi et al., 1986) im Säugetierpankreas beschrieben. Für BALB/c Mäuse wurde versucht durch immunhistochemische Studien ein regionäres Verteilungsmuster der hormonproduzierenden Zellen innerhalb der Inseln zu finden. Jedoch scheint die regionäre Verteilung von der Größe der Inseln abhängig zu sein (Sae-Kwang et al., 2003). Daher erfolgt für die nachgewiesene CKI δ Expression der Inselzellen nur eine grobe Beschreibung, und es kann nicht auf die einzelnen Zelltypen eingegangen werden. Die Zellen der Langerhansschen Inseln zeigen generell eine für CKI δ positive, jedoch inhomoge, zytoplasmatische Färbung. So lässt sich in einigen Zellen eine von der Färbeintensität starke Markierung nachweisen, wohingegen in anderen Zellen eine schwache Färbeintensität vorherrscht (siehe **Abbildung 9** und **Abbildung 36**). Auch lassen sich im Zytoplasma der Inselzellen mit Hilfe der Perfusionsfixation feine CKI δ -positive Granula nachweisen (siehe **Abbildung 36**).

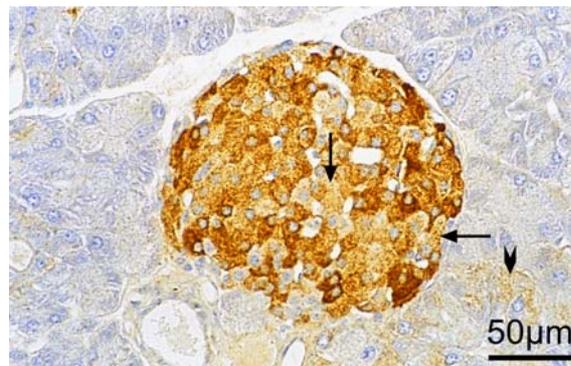


Abbildung 36: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in den Langerhansschen Inseln des Pankreas einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper 108. Perfusionsfixation mit Bouin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Unterschiedlich stark ausgeprägte CKI δ -positive Reaktion des Zytoplasmas der Langerhansschen Inselzellen. Es finden sich Zellen mit einer starken sowie Zellen mit einer schwachen zytoplasmatischen Markierung. Zudem zeigen sich im Zytoplasma feine CKI δ -positive Granula (Pfeile). Mit angeschnitten der exokrine Teil des Pankreas. Hier lassen sich in vereinzelt Azini, ebenfalls feine CKI δ -positive Granula im Zytoplasma nachweisen (Pfeilspitze). Vergr. 100fach.

4.2.3.7 CKI δ Expression in den Zellen des Nervensystems

Insgesamt stellt das Nervensystem ein sehr komplexes Kommunikationsnetzwerk dar. Die Nervenzellen besitzen einen Zellkörper (Perikaryon) und Zellfortsätze (Dentriten und ein Axon), die sie mit anderen Nervenzellen oder mit Körperzellen verbinden.

Das Nervensystem gliedert sich in das Zentralnervensystem (ZNS) und das periphere Nervensystem. Das Zentralnervensystem setzt sich aus dem Rückenmark und dem Gehirn zusammen. Zum peripheren Nervensystem zählt man die außerhalb von Gehirn und Rückenmark liegenden Nervenzellen. Sie bilden Nervenstränge, die aus einer Vielzahl von Nervenfasern (Axone) bestehen und das ZNS mit den Organen verbindet. Des Weiteren werden die Ganglien, die eine Ansammlung von Nervenzellen darstellen, zum peripheren Nervensystem gerechnet (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Die „Nerven“ als solche, werden nur im peripheren Nervensystem angetroffen und bestehen aus Nervenfaserbündel, die durch Bindegewebe zusammengehalten werden. In den für diese Arbeit untersuchten Organen kamen, wenn Organpakete entnommen wurden, auch die peripheren Nerven zur Darstellung. Diese wurden ebenfalls, wie die zu untersuchenden Organe, auf eine mögliche CKI δ Expression untersucht.

Für das Gehirn wurde in dieser Arbeit bezüglich einer CKI δ Expression keine bestimmten Gehirnregionen untersucht, vielmehr wurden beliebig Schnitte durch die Großhirnhemisphären und das Kleinhirn angefertigt. Die Ergebnisse der nachgewiesenen CKI δ Expressionen sind sowohl für das periphere als auch Zentralnervensystem aus **Tabelle 14** zu entnehmen.

Die in den Präparaten angeschnittenen peripheren Nerven zeigen eine CKI δ Expression der überwiegend markhaltigen Nervenfasern, die zu Nervenbündeln zusammengefasst sind (nicht abgebildet). Die unterschiedlichen Bindegewebsscheiden die die Nerven umhüllen zeigen keinerlei Markierung und werden daher nicht näher erläutert.

Organ	Gewebe / Zelltypus	NC10	108	ab10877
Peripheres Nervensystem				
• Spinalganglion	Perikaryen	++ (+)	++ (+)	++ (+)
	Nervenfasern	+ (+)	+ (+)	+ (+)
• Peripherer Nerv	Nervenfasern	++	++	++
Zentralnervensystem				
• Rückenmark ◇ Graue Substanz ◇ Weiße Substanz	Perikaryen	++ (+)	++ (+)	++ (+)
	Nervenfasern	++	++	++
• Kleinhirn ◇ Kleinhirnrinde ◇ weiße Substanz	Molekularschicht	+++	+++	+++
	Purkinje-Zellen	++ (+)	++ (+)	++ (+)
	Körnerschicht	-	-	-
	Gliazellen	++	++	++
	Nervenfasern	++	++	++
• Großhirn ◇ Großhirnrinde ◇ weiße Substanz	Perikaryen	+++	+++	+++
	Gliazellen	++	++	++
	Nervenfasern	++	++	++

Tabelle 14: CKI δ Expression in den Zellen des Nervensystems. Die Detektion von CKI δ wurde anhand der Färbeintensität des jeweils verwendeten Antikörpers mit der folgenden Skalierung, die in der Tabelle aufgeführt ist, evaluiert: - negativ, -/+ blass, + schwach, ++ gut, +++ stark

In der hinteren Rückenmarkswurzel finden sich als spindelförmige Auftreibungen die Spinalganglien, welche die Zellkörper der primär-afferenten Neurone und die Anfangsteile ihrer Fortsätze beherbergen. Die primär-afferenten Neurone sind in der Regel pseudounipolare Nervenzellen, die einen Stammfortsatz entsenden, der sich in einiger Entfernung vom Zelleib in zwei Äste teilt (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Ein Ast steht mit der Peripherie, der andere mit dem ZNS in Verbindung. Die Zellkerne des Spinalganglions sind relativ groß, mit deutlich erkennbaren Nukleolen. Es werden große helle A-Zellen und kleine dunkle B-Zellen unterschieden. Die B-Zellen zeigen eine dichtere Zytoplasmastruktur, bedingt durch das raue endoplasmatische Retikulum, dass im Vergleich zu den A-Zellen in diesen dichter gepackt ist. A-Zellen hingegen zeigen „helle Strassen“ mit Neurotubuli und Neurofilamenten, die Nissl-Schollen deutlich hervortreten lassen (Andres, 1961). Wie auf **Abbildung 37** gut zu erkennen, zeigen sowohl die A-Zellen als auch die B-Zellen eine CKI δ Expression im Zytoplasma. Die B-Zellen zeigen in ihrer Färbeintensität eine deutlich stärkere Markierung als die größeren A-Zellen. Zusätzlich sind feine CKI δ -positive Granula im Zytoplasma der A-Zellen nachweisbar. Bei diesen handelt es sich um Nissl-Schollen, die aus freien Ribosomengruppen und Ergastoplasma bestehen. Eine schwache CKI δ Expression zeigt sich in den Axonen der Spinalganglienzellen.

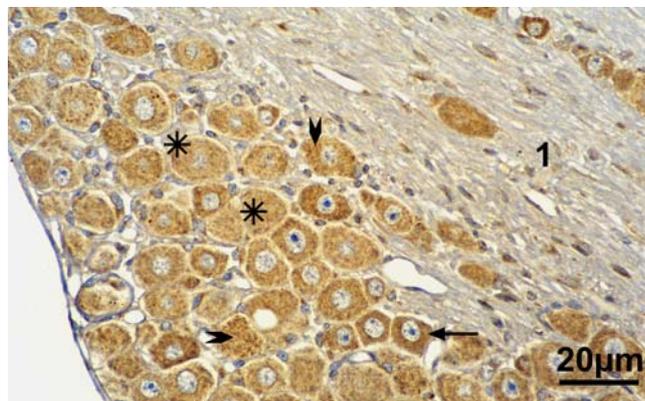


Abbildung 37: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in einem Spinalganglion einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper 108. Perfusionsfixation mit Bouin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Eine CKI δ Expression lässt sich im Zytoplasma der B-Zellen (Pfeil) als auch im Zytoplasma der A-Zellen (Stern) nachweisen. Die Nissl-Schollen (Pfeilspitzen) zeigen ebenfalls eine CKI δ -positive Markierung. Am rechten Bildrand mitangeschnitten die Axone (1) der Nervenzellen, die vereinzelt eine schwache CKI δ -positive Markierung aufweisen.

Das Rückenmark wird in eine graue und weiße Substanz unterteilt. In der grauen Substanz liegen die Zellkörper und die vom Zellkörper ausgehenden Fortsätze (Dentriten sowie das Axon) der Nervenzellen, eingebettet in ein Gliagerüst (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Die weiße Substanz hingegen besteht aus markhaltigen und marklosen Nervenfasern, welche die

Leitungsbahnen bilden. Die Nervenzellen sind häufig in gut abgrenzbaren Gruppen zusammengelagert. In dieser Arbeit jedoch wurden weder die einzelnen Zelltypen dieser Nervenzellen, noch die Zellgruppen, die man als Kerne (Nuclei) bezeichnet, ausführlich analysiert. Die Perikaryen der grauen Substanz zeigen eine CKI δ Markierung in allen dargestellten Zellen. In einzelnen Zellen lassen sich die Nissl-Schollen als feine CKI δ -positive Granula nachweisen. Eine CKI δ Markierung zeigt sich auch in den drei, auf jeder Seite vorhandenen, Nervenfasensträngen der weißen Substanz (Abbildung nicht gezeigt).

Das Gehirn gliedert sich makroskopisch in das Rautenhirn (Rombencephalon), das Mittelhirn (Mesencephalon), das Zwischenhirn (Diencephalon), das Großhirn (Telencephalon) und das Kleinhirn (Cerebellum). Histomorphologisch wird auch das Groß- und Kleinhirn wie das Rückenmark in eine graue und weiße Substanz eingeteilt. Die oberflächliche Schicht, die sogenannte Hirnrinde (Cortex) entspricht der grauen Substanz. Darunter liegt eine breite Schicht aus Nervenfasen, die der weißen Substanz entspricht.

Von den hier aufgeführten Strukturen werden exemplarisch nur die Schnitte durch das Kleinhirn und durch die Großhirnhemisphären besprochen. Alle anderen oben aufgeführten Strukturen, sowie Kerngebiete wurden nicht im Detail auf eine CKI δ Expression hin untersucht.

Die Kleinhirnrinde hat im Gegensatz zur Großhirnrinde einen gleichbleibenden mikroskopischen Aufbau. Sie besteht aus drei Schichten. Die Molekularschicht (Stratum moleculare) bildet die Äußerste Schicht des Kleinhirns, daran angrenzend die Schicht der Purkinje-Zellen (Stratum neurium piriformium) sowie die Körnerschicht (Stratum granulosum) als innerste, dem Mark anliegende Schicht (Drenckhahn und Zenker, 1994b). In diesen Schichten spielen sich komplizierte Integrationsvorgänge ab, in die die einzelnen Nervenfasern und Nervenzellen durch ein komplexes Zusammenspiel auf unterschiedliche Weise involviert sind. Wie auf **Abbildung 38** zu sehen, lässt sich in allen drei Schichten eine CKI δ Expression nachweisen. Die Molekularschicht zeigt eine geringe Nervenzelldichte, da sie überwiegend aus einer Unzahl dünner Axone und Dendritenverzweigungen besteht. Die Hauptmasse dieser Axone wird von den sogenannten Parallelfasern gebildet. Zudem reichen die Dendritenverzweigungen der Purkinjezellen bis an die Kleinhirnoberfläche. An diesen Purkinje-Dendriten finden sich die sogenannten Kletterfasern, die zu den afferenten Nervenfasern der Kleinhirnrinde gezählt werden und an den Dendritenfortsätzen emporklettern. Für CKI δ konnte keine erkennbare Markierung in diesen Axonen sowie den

Dentritenverzweigungen der Molekularschicht nachgewiesen werden. Bei den Nervenzellen der Molekularschicht handelt es sich um die oberflächlich gelegenen Sternzellen und die in den tieferen Abschnitten vorkommenden Korbzellen (Drenckhahn und Zenker, 1994b). In den Perikaryen dieser Korbzellen lässt sich eine starke CKI δ Expression nachweisen (siehe **Abbildung 38, A**). Ebenfalls eine CKI δ -positive Färbung zeigen die Purkinje-Zellen sowie die Somata der Korbzellen, die sich aus der höher gelegenen Molekularschicht in die Reihe der Purkinje-Zellen herabsenken können (siehe **Abbildung 38, B**).

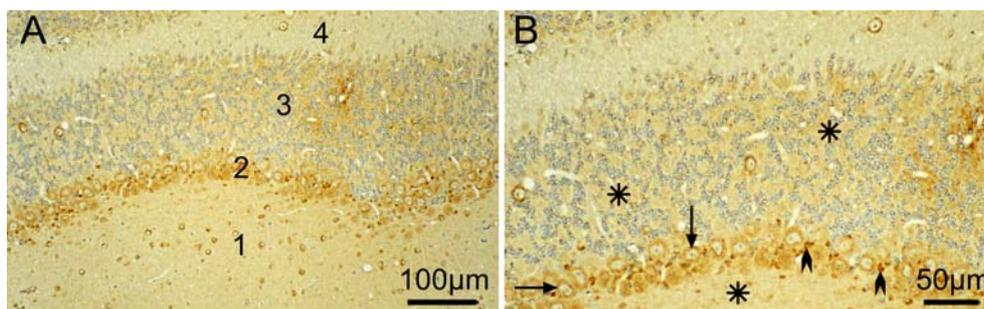


Abbildung 38: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ des Kleinhirns einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper 108. Perfusionsfixation mit Bouin. Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Übersichtsaufnahme durch eine Kleinhirnwindung. Eine CKI δ Expression lässt sich im Zytoplasma der Korbzellen der Molekularschicht (1) sowie der Purkinjezellen (2) nachweisen. Keine Markierung weisen die Zellen der Körnerzellschicht (3) auf, schwach bis kaum markiert erscheint die weiße Substanz (4). Vergr. 50fach. **(B):** Vergrößerung der Purkinjezellschicht. Die Purkinjezellen (Pfeile) zeigen eine CKI δ -positive zytoplasmatische Markierung, sowie die in diese Schicht herabgesenkten Korbzellen (Pfeilspitzen). Die Gliazellen (Sterne) zeigen eine homogene CKI δ Expression. Vergr. 100fach.

In der Körnerzellschicht liegen kleine Nervenzellen, die sogenannten Körnerzellen und die, in geringer Anzahl vorkommenden, Golgi-Zellen. Jedoch zeigt keiner dieser beiden Nervenzellarten eine Markierung für CKI δ . Weiterhin sind in der Kleinhirnrinde alle drei Hauptformen der Glia vertreten, die Makro-, Mikro- (Hortega-) und Oligodendroglia, die in den unterschiedlichen Schichten unterschiedlich stark vertreten sind. Diese Gliazellen füllen den interneuronalen Raum soweit aus, dass zwischen den einzelnen zellulären Elementen des ZNS nur ein spaltförmiger Interzellularraum übrigbleibt. Ihnen wird eine Funktion als Stützgerüst mit isolierender Funktion sowie eine Rolle bei Abwehrvorgängen zugesprochen. Des Weiteren sind sie in der Lage, Ionen und Transmitter zu metabolisieren (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Wie aus **Abbildung 38** ersichtlich kann eine homogene CKI δ -positive Markierung der Glia nachgewiesen werden. Eine einzelne Zuordnung zu den einzelnen Gliazellarten ist allerdings nicht möglich, und müsste weitere Untersuchungen nach sich ziehen, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden soll.

In der weißen Substanz des Kleinhirnmarks verlaufen die afferenten und die efferenten Fasern der Kleinhirnrinde. Diese Fasern weisen ebenfalls eine CKI δ Expression auf.

Die Gliederung des Großhirns in graue und weiße Substanz, unterscheidet sich nicht von den anderen Abschnitten des ZNS. Jedoch ist die Verteilung der grauen Substanz charakteristisch für das Großhirn und unterscheidet sich dadurch von den anderen Abschnitten des ZNS. Die graue Substanz des Großhirns bildet die Endhirnkerne sowie den Cortex cerebri. Diese Großhirnrinde bedeckt die gesamte Oberfläche des Großhirns und kann nach unterschiedlichsten Gesichtspunkten eingeteilt werden. Da hier nur ein Überblick über eine mögliche CKI δ Expression gegeben werden soll, wird in dieser Arbeit nur der prinzipielle Aufbau der Großhirnrinde angesprochen, jedoch nicht der Bau der einzelnen Gebiete des Telencephalons. Die Großhirnrinde des Menschen ist aus verschiedenen Schichten aufgebaut, wobei sich jedoch die Anzahl der Schichten und ihr innerer Aufbau von Region zu Region unterscheiden. Der typische Aufbau zeigt sechs verschiedene Schichten, die verschiedene Nervenzelltypen und Nervenfasern beinhalten. Wie aus **Abbildung 39** zu sehen zeigt sich auch bei der Maus eine typische Schichtung der Rindenzone des Großhirns. Die Perikaryen der dargestellten Nervenzellen weisen, unabhängig welcher Schicht sie zugehörig sind, eine positive CKI δ Expression auf. Auffällig erscheint jedoch aufgrund der starken Färbeintensität die dargestellte Pyramidenzelle. Abgeschwächt in der Färbeintensität der Markierung kommen die Gliazellen sowie die markhaltigen und marklosen Nervenfasern der weißen Substanz zur Darstellung (siehe **Abbildung 39**).

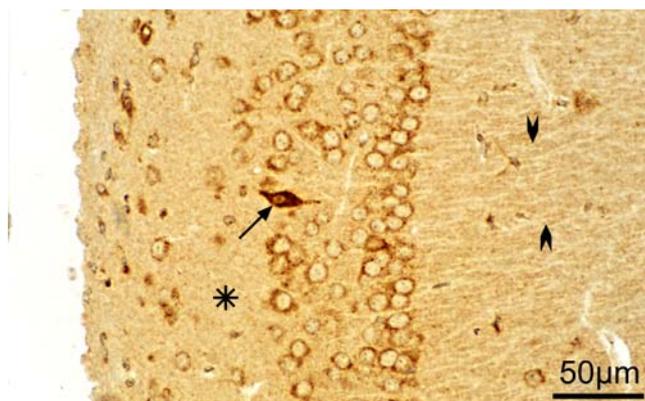


Abbildung 39: Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in den Schichten des Großhirns einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKI δ durch den Antikörper 108. Perfusionsfixation mit Bouin. Peroxidase-reaktion, Farbstoff DAB. Eine CKI δ Expression lässt sich im Zytoplasma aller dargestellten Nervenzellen nachweisen. Auffällig ist die in Bildmitte dargestellte Pyramidenzelle (Pfeil), die eine für CKI δ starke Expression des Zytoplasmas zeigt. Ebenfalls positiv für CKI δ erweist sich die Glia (Stern) sowie etwas abgeschwächt in der Färbeintensität die Nervenfasern (Pfeilspitzen) der weißen Substanz. Vergr. 100fach.

5 Diskussion

Die Isoform CKI δ ist in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert (zur Übersicht: (Gross und Anderson, 1998; Knippschild et al., 2005)). Dafür spricht auch die ubiquitäre Expression der Mitglieder der CKI Familie. Speziell für die Isoform CKI δ konnte eine Gewebe-spezifische Verteilung auf RNA-Ebene mittels Northern Blot-Analysen in verschiedenen Organen gezeigt werden (Graves et al., 1993; Okamura et al., 2004a). Jedoch sind viele physiologische Funktionen die CKI δ *in vivo* wahrnimmt noch weitestgehend unbekannt.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der Lokalisation von CKI δ in Organen junger adulter Mäuse mittels immunohistochemischer Analysen sowie der Nachweis der CKI δ Expression in murinen Organen mit Hilfe von proteinbiochemischen Methoden lieferten neue Hinweise über mögliche Funktionen von CKI δ *in vivo*.

5.1 Expression und Aktivität von CKI δ in unterschiedlichen Organen

Die zu Beginn durchgeführten proteinbiochemischen Untersuchungen, mittels Western Blot-Analysen, belegen eine ubiquitäre Expression von CKI δ . Eine besonders hohe Expression kann dabei in Lunge, Pankreas, Thymus, Gehirn, Milz, Ovar, Nebenhoden und Hoden nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 4**). Der Expressionsgrad lässt jedoch keine Rückschlüsse auf die Aktivität der Kinase zu. Trotz gleicher Proteinexpression könnte CKI δ Unterschiede in der Aktivität aufweisen. Aus diesem Grund wurde die Kinaseaktivität aus den Organlysaten mit gleichem Expressionslevel überprüft.

Diese Untersuchungen ergaben, dass in Organen mit gleicher CKI δ Expressionrate deren Aktivität um den Faktor 2-10 variierte (siehe **Abbildung 5** und **6**). Zudem zeigten sich Unterschiede im Elutionsprofil von CKI δ im Vergleich zu demjenigen aus Lysaten adhärent wachsender Zellen aus Zellkulturen. Während die höchste CKI δ spezifische Aktivität aus Lysaten murinen Gewebes bereits bei einer NaCl Konzentration von 130 mM von der Anionenaustauschsäule eluierte, konnte der Aktivitätspeak von CKI δ aus Lysaten adhärenter Zellen bei einer Konzentration von 270-300 mM NaCl nachgewiesen werden (Knippschild et

al., 1996; Knippschild et al., 1997). Diese Unterschiede im Elutionsprofil sowie die Unterschiede in der Aktivität von CKI δ in den untersuchten Geweben der Maus könnten höchstwahrscheinlich auf postrtranslationale Modifikationen zurückzuführen sein. Da CKI δ ein Phosphoprotein darstellt, ist davon auszugehen, dass die beobachteten Unterschiede auf einen unterschiedlichen Phosphorylierungsgrad von CKI δ zurückzuführen ist. Die reversible Phosphorylierung spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Kinasen (Cohen, 2002; Manning et al., 2002). Auch für CKI δ wurde gezeigt, dass durch Änderungen im Phosphorylierungsmuster die Aktivität beeinflusst werden kann (Rivers et al., 1998). Veränderungen im Phosphorylierungsgrad wirken sich zudem auf die Interaktion von CKI δ mit dem Anionenaustauscher, bei dem geladene Gruppen eine wichtige Rolle spielen, aus. Ein erhöhter Phosphorylierungsgrad führt zu einer stärkeren Bindung von CKI δ an die Anionenaustauschsäule und erfordert daher zur Elution eine höhere Salzkonzentration.

In den Western Blot-Analysen der einzelnen Fraktionen, in denen Kinaseaktivität nachgewiesen wurde, konnten mehrere CKI δ -spezifische Banden unterschiedlicher Wandereigenschaften detektiert werden (siehe **Abbildung 5**). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Autophosphorylierung von CKI δ darstellen, die zur Regulation der CKI δ Aktivität beschrieben wurde (Graves et al., 1993). Im Rahmen einer solchen Autophosphorylierung können bis zu 8 Mol Phosphat pro Mol Enzym umgesetzt werden. Aufgrund der negativen Ladung von CKI δ könnte das Laufverhalten in der SDS-PAGE beeinflusst werden.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die untersuchten Organe als Ganzes betrachtet wurden. Innerhalb der Organe existieren jedoch verschiedene Zellpopulationen, welche unterschiedliche Funktionen ausüben. Durch die Untersuchung der Proteinlysate aus den unterschiedlichen Organen lassen sich jedoch keine Rückschlüsse auf die Lokalisation von CKI δ innerhalb der verschiedenen Zellen ziehen.

5.2 Immunhistologie

5.2.1 Einfluss der Fixierungsart und des Fixierungsmittels auf den Antigenerhalt von CK18

Um Aussagen über die Lokalisation von CK18 in Geweben treffen zu können, wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Da zum Beginn der Arbeit keine Daten über die immunhistochemische Darstellung von CK18 vorlagen, erfolgte zunächst die Etablierung dieser Methode. Um den optimalen Antigenerhalt für CK18 zu gewährleisten, wurden hierfür verschiedene Fixierungslösungen und Arten der Fixierung getestet. Die Perfusionsfixation, bei der die Fixierungslösung direkt intravenös verabreicht wird, wurde der Immersionsfixation gegenübergestellt.

Bei der Immersionsfixierung ist eine gleichzeitige Fixierung des Gesamtpräparates nicht gegeben, was sich auf den Antigenerhalt auswirken könnte und somit zu falsch negativen Interpretationen führt. Der Fixierungsvorgang der Immersionsfixierung resultiert in einer Gewebepenetration der Fixierungslösung von außen nach innen, wobei die Fixierungsstrecke innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls wiederum von der Zusammensetzung der Fixierungslösung abhängig ist. Abhängig von der Zeit kann es zu einer Autolyse kommen, die in den Bezirken, die von der Fixierungslösung noch nicht erreicht worden sind, stattfindet. Daraus könnte ein Antigenverlust resultieren. Dieses Phänomen konnte beim Nachweis der CK18 Expression in den Sinusoiden und Endothelien der Leber festgestellt werden, die nur im Randbereich, d.h. im Bereich der schnellsten Fixierung, eine erkennbare Markierung aufzeigten, wohingegen in den inneren Bezirken keine Detektion von CK18 mehr möglich war (siehe **Abbildung 18**).

Eine Wärmebehandlung kann die Durchdringungsgeschwindigkeit beschleunigen, fördert jedoch damit auch die Autolyse. Daher sollte eine Fixierung von empfindlichem Gewebe bei 0-4°C erfolgen, was wiederum in einer langen Wirkdauer resultiert (Burck, 1988). Von Leong und Gilham (Leong und Gilham, 1989) wurde ein Antigenverlust in formalinfixiertem Gewebe proportional zur Expositionsdauer des Fixans beschrieben. Um dieser Problematik entgegenzuwirken wurde, bewusst auf eine Austestung der Einwirkungszeit der Fixierungslösung für das nachzuweisende Antigen CK18 verzichtet und eine möglichst kurze Fixierungsdauer von 24 Stunden (48 Stunden für saures Formalin, siehe Material und Methoden) gewählt. Zur Kontrolle wurde zusätzlich eine Perfusionsfixation durchgeführt.

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich (siehe **Tabelle 6**), zeigte die Immersionsfixierung und Perfusionsfixierung, unter Verwendung der gleichen Fixierungslösung, keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Antigenerhalts und der Morphologie. Jedoch ist zu bedenken, dass es sich bei dem Untersuchungsmaterial um Organe 4-6 Wochen alter Mäuse handelt, die in ihrer Gesamtheit sehr klein sind. Bei größeren Gewebestücken ist eine längere Fixierungsdauer nötig und könnte somit zu einer Autolyse führen, was in einem Antigenverlust resultieren kann.

Die Perfusionsfixation findet zudem eine Anwendung, wenn labile Antigene nachgewiesen werden sollen. Da zu Beginn dieser Arbeit noch keine immunhistochemischen Daten von CKI δ vorlagen, musste in Betracht gezogen werden, dass es sich bei CKI δ um ein labiles Antigen handeln könnte. Wie aus **Abbildung 18** ersichtlich, kann eine Expression von CKI δ der Hepatozyten nur mittels Perfusionsfixation, jedoch nicht mit einer Immersionsfixation erreicht werden. Für eine physiologische Relevanz dieser Kinase in den Hepatozyten spricht der Nachweis einer CKI δ Expression im Zytoplasma der Hepatozyten der Ratte (Pierre und Loeb, 1982). Zudem lässt sich eine Expression von CKI δ mittels Western Blot-Analysen nachweisen (siehe **Abbildung 4**). Die Leber als größtes Entgiftungs- und Stoffwechselorgan übernimmt zahlreiche unterschiedliche Funktionen, wie Kohlenhydrat-, Lipid- und Aminosäurestoffwechsel, Detoxifikation und Exkretion von metabolischen Endprodukten sowie die Synthese von Plasmaproteinen. Zudem synthetisiert sie Pro-Hormone und Mediatoren und ist in der Lage, zirkulierende Signalsubstanzen bei der Leberpassage abzubauen. Somit ist die Leber auch an der Steuerung des Hormonhaushaltes beteiligt (Jungermann und Katz, 1989). Diese Vielzahl von spezifischen Funktionen bedarf einer genauen Regulation. Inwieweit CKI δ in diese Regulationsprozesse involviert ist, müssten noch genauere Untersuchungen zeigen.

Ein weiterer wichtiger Faktor für den Antigenerhalt von CKI δ scheint die Zusammensetzung der unterschiedlichen Fixierungslösungen zu sein. Die getesteten Fixierungslösungen, mit verschiedenen Wirkmechanismen unterscheiden sich hinsichtlich des Antigenerhalts und dem Erhalt der Morphologie erheblich voneinander (siehe **Tabelle 6**). Mit der sauren Formalinlösung und der Bouin Lösung (ein formalinhaltiges Gemisch), lassen sich sowohl ein optimaler Antigenerhalt als auch gute morphologische Ergebnisse erzielen. Bei diesem Fixierungsvorgang handelt es sich um eine Vernetzung, da Formaldehyd primär mit basischen Aminosäuren reagiert und es dabei zur Bildung vernetzender Methylenbrücken kommt. Dadurch ist die Permeabilität für Makromoleküle relativ gering und die Struktur von

intrazytoplasmatischen Proteinen wird nicht signifikant verändert (Petrusz, 1983). Dieser Vorgang scheint eine Rolle für den Antigenerhalt von CKI δ zu spielen. Dafür spricht zudem, dass weder mit der Zinklösung (Beckstead, 1994) noch mit Carnoy ein Antigenerhalt erzielt werden kann. Bei beiden Lösungen handelt es sich um formalinfreie Gemische, die zu einer präzipitierten Fixierung führen. Bei Carnoy kommt es aufgrund des hohen Alkoholanteils zu einer Proteinfällung, wohingegen die Zinklösung Proteine durch Schwermetallsalzbildung fällt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass sich diese Fixierungsmechanismen negativ auf den Antigenerhalt von CKI δ auszuwirken. Die kommerziellen Fixierungsreagenzien von deren Zusammensetzung im Einzelnen nichts bekannt ist, wiesen alle einen guten morphologischen Erhalt der Präparate auf, waren aber in bezug auf den Antigenerhalt deutlich im Nachteil. Eine Ausnahme stellt das Fixans Zinc Formal Fixx (Shandon) dar, welches sich zum Nachweis von CKI δ in den Myelinscheiden eignet.

Der Vorgang der Vernetzung, der bei formalinhaltigen Fixierungslösungen auftritt, ist hingegen mit dem Nachteil verbunden, dass auch die Antigene durch die Aldehyde vernetzt bzw. maskiert werden. Dies führt dazu, dass sie vom Primärantikörper nicht oder nur schwer zu detektieren sind (Shi et al., 1991). Dieses Problem wurde durch die Austestung unterschiedlicher hitzeinduzierter Demaskierungslösungen für die jeweils verwendeten CKI δ spezifischen Antikörper gelöst (siehe **Tabelle 7**).

5.2.2 Spezifität der CKI δ Antikörper

Die in der Literatur erstmals beschriebene Sequenz von CKI δ stammt aus Untersuchungen des Rattenhodens (Graves et al., 1993). In weiteren Untersuchungen konnte im humanen Gewebe eine CKI δ Sequenz identifiziert werden (Kusuda et al., 1996), die sich jedoch, von der durch Graves beschriebenen, im C-Terminus unterscheidet. Daher wurde zur Generierung des CKI δ -spezifischen Antikörpers NC10 die Sequenz der Ratte herangezogen (siehe **Abbildung 40**), da man davon ausgegangen ist, dass diese eine größere Homologie zur Maussequenz aufweist, als die Humansequenz.

Spätere Untersuchungen führten schließlich zur Identifizierung zweier Transkriptionsvarianten von CKI δ , TV1 und TV2, in Human- sowie in Mausgewebe. Diese zeigen zu der von Graves et al. (Graves et al., 1993) beschriebenen Rattensequenz jeweils

Unterschiede im C-terminalen Bereich. Aus diesem Grund wurden 2 weitere Antikörper zur Detektion von CKI δ eingesetzt. Ein kommerzieller Antikörper gegen CKI δ (ab10877, Abcam) sowie der CKI δ -spezifische Antikörper 108 (Spezifitätsnachweis durch Stöter et al. (Stöter et al., 2005)). Der Antikörper ab10877 (Abcam) ist gegen eine Peptidsequenz gerichtet, die aus der humanen CKI δ Sequenz stammt. Wohingegen der Antikörper 108 gegen eine Peptidsequenz von CKI δ der Ratte generierte wurde. Wie aus **Abbildung 40** zu schlussfolgern ist, sollten beide Antikörper aufgrund der Sequenzhomologie zwischen den Spezies in der Lage sein, CKI δ in Human-, Ratten- und Mausgewebe zu detektieren.

AK 10877					
RN	AS 301	ADDAERERR	DREERLRHSRNPATRGLP	STASGRLRGTQEVAPPTPLTPTS	TV3
HS IF1	AS 301	ADDAERERR	DREERLRHSRNPATRGLP	STASGRLRGTQEVAPPTPLTPTS	TV1
HS IF2	AS 301	ADDAERERR	DREERLRHSRNPATRGLP	STASGRLRGTQEVAPPTPLTPTS	TV2
MM IF1	AS 301	ADDAERERR	DREERLRHSRNPATRGLP	STASGRLRGTQEVAPPTPLTPTS	TV1
MM IF2	AS 301	ADDAERERR	DREERLRHSRNPATRGLP	STASGRLRGTQEVAPPTPLTPTS	TV2
AK 108					
RN	AS 301	ADDAERERRDREERLRH	SRNPATRGLPSTASGR	LRGTQEVAPPTPLTPTS	TV3
HS IF1	AS 301	ADDAERERRDREERLRH	SRNPATRGLPSTASGR	LRGTQEVAPPTPLTPTS	TV1
HS IF2	AS 301	ADDAERERRDREERLRH	SRNPATRGLPSTASGR	LRGTQEVAPPTPLTPTS	TV2
MM IF1	AS 301	ADDAERERRDREERLRH	SRNPATRGLPSTASGR	LRGTQEVAPPTPLTPTS	TV1
MM IF2	AS 301	ADDAERERRDREERLRH	SRNPATRGLPSTASGR	LRGTQEVAPPTPLTPTS	TV2
RN	AS 351	HTANTS	PRPVSGMERERKVS	MRHLHRGAPVNVSSDLTGRQDTSRMSTSQR	TV3
HS IF1	AS 351	HTANTS	PRPVSGMERERKVS	MRHLHRGAPVNISSDLTGRQDTSRMSTSQI	TV1
HS IF2	AS 351	HTANTS	PRPVSGMERERKVS	MRHLHRGAPVNISSDLTGRQDTSRMSTSQN	TV2
MM IF1	AS 351	HTANTS	PRPVSGMERERKVS	MRHLHRGAPVNVSSDLTGRQDTSRMSTSQI	TV1
MM IF2	AS 351	HTANTS	PRPVSGMERERKVS	MRHLHRGAPVNVSSDLTGRQDTSRMSTSQN	TV2
AK NC10					
RN	AS 401	SRD	MASLRHAARQGARC	RPQPRRTTY	TV3
HS IF1	AS 401	PGRVASSGLQSVVHR	-----	-----	TV1
HS IF2	AS 401	SIPFEHHGK	-----	-----	TV2
MM IF1	AS 401	PGRVASSGLQSVVHR	-----	-----	TV1
MM IF2	AS 401	SIPFEHHGK	-----	-----	TV2

■ Erkennungssequenz des CKI δ -spezifischen Antikörpers NC10 in der Ratte (AS 404-418)
■ Erkennungssequenz des CKI δ -spezifischen Antikörpers 10877 (AS 310-327)
■ Erkennungssequenz des CKI δ -spezifischen Antikörpers 108 (AS 317-333)

RN = Rattus norvegicus (gi: 47117787); **HS IF1** = Homo sapiens Isoform 1 (gi: 20149530); **HS IF2** = Homo sapiens Isoform 2 (gi: 20544145); **MM IF1** = Mus musculus Isoform 1 (gi: 20544149); **MM IF2** = Mus musculus Isoform 2 (gi: 20544147); **TV1** = Transkriptionsvariante 1; **TV2** = Transkriptionsvariante 2; **TV3** = Transkriptionsvariante 3

Abbildung 40: Bindungsstellen der Antikörper NC10, 108, ab10877 (Abcam). Alignment der bisher bekannten CKI δ Transkriptionsvarianten und Isoformen. Am Beginn einer Reihe stehen die Spezies und die jeweilige Isoform von CKI δ . Es wurde nur ein Teil der Sequenz abgebildet, beginnend ab Aminosäure 301 (AS 301). Die farblich unterlegten Bereiche in der Aminosäuresequenz entsprechen den einzelnen Peptidsequenzen gegen die die jeweiligen Antikörper hergestellt wurden.

Nach heutigem Kenntnisstand existieren jeweils 3 Transkriptionsvarianten von CKI δ . Die Transkriptionsvariante TV1, TV2, und TV3 kann sowohl in der Maus, als auch im Menschen nachgewiesen werden (persönliche Kommunikation M. Stöter). GST-Fusionsproteine der

Transkriptionsvarianten von CKI δ wurden durch die Antikörper NC10, 108, ab10877 (Abcam) sowie IC128A (ICOS) in Western Blot-Analysen detektiert. Wie aus **Abbildung 41** ersichtlich, detektieren die Antikörper 108, ab10877 (Abcam) und IC128A (ICOS) jeweils alle 3 Transkriptionsvarianten der Maus. Der Antikörper NC10 ist in der Lage ausschließlich die Transkriptionsvariante TV3 nachzuweisen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die CKI δ -spezifischen Antikörper 108 und ab10877 (Abcam) in Bereichen binden, in denen sich die Transkriptionsvarianten nicht voneinander unterscheiden. Wohingegen der Antikörper NC10 CKI δ in einem Bereich bindet, der nur in der Transkriptionsvariante TV3 vorkommt (siehe **Abbildung 40**). Die von Graves beschriebene Rattensequenz, die der Transkriptionsvariante TV3 entspricht, ist identisch zu TV3 der Maus. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass der Antikörper NC10 zum Nachweis von CKI δ im Mausgewebe geeignet ist, jedoch nur die Transkriptionsvariante TV3 detektieren kann.

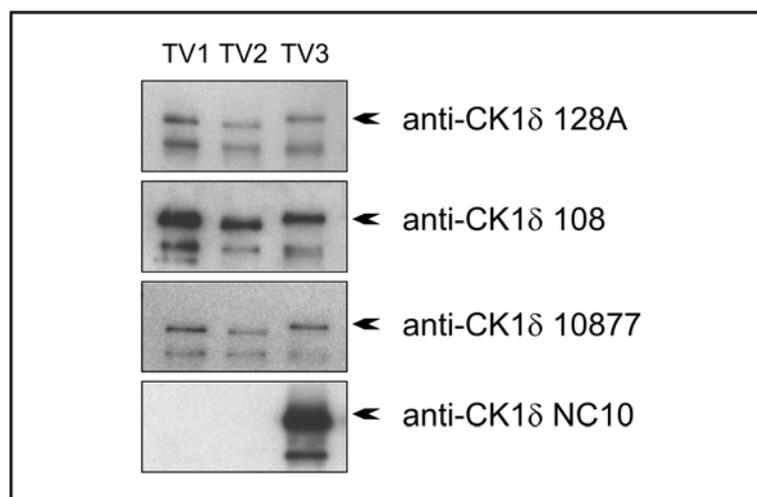


Abbildung 41: Spezifitätsnachweis der CKI δ spezifischen Antikörper. Die GST-Fusionsproteine der 3 Transkriptionsvarianten der Maus wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die immunologische Detektion mit den jeweiligen Antikörpern (NC10, 108, ab10877 und IC128A) und anschließender ECL-Reaktion (aus Dissertation M. Stöter (in Anfertigung)).

Zur Kontrolle der Spezifität des polyklonalen CKI δ -spezifischen Antikörpers NC10 in der Immunhistochemie wurde zudem die Methode der kompetitiven Hemmung angewandt (siehe Material und Methoden). Die Ergebnisse zeigen eine erkennbare Abschwächung der CKI δ Detektion, eine komplette Hemmung war jedoch bei keiner der verwendeten Konzentrationen des spezifischen Peptid-Antikörpergemisches feststellbar (siehe **Abbildung 10**). Eine komplette Inhibition ist jedoch sehr schwierig zu bewerkstelligen, da immer auch eine geringe Dissoziation des Antikörpers vom Peptid erfolgen kann. Dies führt dazu, dass

eine Antikörperbindung an das Antigen des Präparates möglich ist (Burry, 2000). Die Inkubation der Präparate mit dem spezifischen Peptid-Antikörpermisch in aufsteigenden Konzentrationen führt bei hohen Peptidkonzentrationen zu einer stärkeren Detektion. Bei hohen Peptidkonzentrationen könnte aufgrund des Überangebotes des vorliegenden Peptids eine unspezifische Bindung, durch Interaktionen des Peptids mit Proteinen des Gewebeschnittes, erfolgen (Burry, 2000).

Mit den CKI δ -spezifischen Antikörpern NC10, 108 und ab10877 (Abcam) lassen sich fast identische Expressionsmuster in den untersuchten Organen nachweisen. Man kann dieses Ergebnis als weiteren Beleg für die spezifische Detektion von CKI δ durch diese Antikörper in der Maus werten. Da der CKI δ -spezifische Antikörper NC10 jedoch ausschließlich die Transkriptionsvariante TV3 erkennt, könnte dies eine Erklärung für Unterschiede in bestimmten Gewebemarkierungen sein. Beim immunhistochemischen Nachweis von CKI δ durch diesen Antikörper zeigen die Alveolarmakrophagen sowie der Kupffer-Zellen der Leber als auch die Spermatogonien I im Hoden keine Markierung auf. Diese Strukturen lassen sich jedoch durch die CKI δ -spezifischen Antikörper 108 und ab10877 nachweisen. In diesen Zellen könnten Transkriptionsvarianten in Differenzierungs- (Spermatogonien) als auch Aktivierungsprozessen (Makrophagen) von Bedeutung sein, womit eine bestimmte Funktionalität dieser Transkriptionsvarianten in beteiligten Signalkaskaden denkbar wäre. Während die CKI δ -spezifischen Antikörper 108 und ab10877 homologe granuläre Strukturen in den Hepatozyten detektieren, kann durch NC10 nur die Transkriptionsvariante TV3 in einigen Hepatozyten, mit einer perivenösen Lokalisation, nachgewiesen werden. Obwohl die Hepatozyten auf histologischer Ebene gleichmäßig erscheinen, sind sie auf morphometrischer und histochemischer Ebene heterogen. Das Modell der „Metabolischen Zonierung“ (Jungermann und Katz, 1989) besagt, dass die Zellen in der periporatalen Zone sich von denen der perivenösen Zone im Hinblick auf die Verteilung von Schlüsselenzymen und subzellulären Strukturen unterscheiden. Somit wäre eine funktionelle Relevanz dieser Transkriptionsvariante TV3 von CKI δ in den perivenösen Hepatozyten denkbar.

5.3 Mögliche Rolle von CKI δ in der Immunabwehr

Das Immunsystem des menschlichen Körpers setzt sich aus zwei Komponenten, einem angeborenen (unspezifischen) und einem erworbenen (spezifischen) Immunsystem,

zusammen. Beide Komponenten ergänzen sich und bilden einen gemeinsamen Abwehrmechanismus. Aufgaben des angeborenen Immunsystems ist die initiale Erkennung von Krankheitserregern oder entarteter Zellen, deren Beseitigung sowie die Einleitung der spezifischen Immunantwort durch T- und B-Zellen. Dies setzt ein komplexes und fein aufeinander abgestimmtes Regulationsnetzwerk voraus. Die Zellen des mononukleären Phagozytensystems (Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen), die zum angeborenen Immunsystem gerechnet werden, spielen eine besondere Rolle bei der Immunabwehr. Sie sind sowohl für die rasche angeborene Immunantwort als auch für die Induktion einer spezifischen Antwort wichtig. Makrophagen können in Gewebe-spezifische, spezialisierte Subpopulationen unterteilt werden. Die Funktionen dieser Subpopulationen sind wiederum durch die spezifische Expression von Oberflächenproteinen dieser Makrophagen charakterisiert (van den Berg et al., 2001). Wie aus den Ergebnissen der immunhistochemischen Analysen ersichtlich, konnte eine CKI δ Detektion in den spezialisierten Makrophagen der Leber (Kupffer-Zellen) als auch in der Lunge (Alveolarmakrophagen) nachgewiesen werden (siehe **Kapitel 4.2.3.1** und **Kapitel 4.2.3.2**). Dies könnten erste Hinweise dafür sein, dass CKI δ eine mögliche Rolle in der Modulation der physiologischen Funktionen dieser Makrophagen wahrnimmt.

Ein weiterer Hinweis für eine mögliche Relevanz von CKI δ in der Immunabwehr ergibt sich aus den Untersuchungen der lymphatischen Organe. Hier konnte CKI δ in den Lymphozyten aller untersuchten Organe nachgewiesen werden (siehe **Kapitel 4.2.3.2**). Durch Stimulation eines Antigens wird in den Lymphozyten eine Transformation ausgelöst, so dass aus diesen teilungsfähige Lymphoblasten entstehen und es dadurch zu einer Zellvermehrung kommt. Wie aus **Abbildung 15** ersichtlich, scheint CKI δ in diese Proliferationsprozesse involviert zu sein, da die Lymphoblasten der Peyerschen Plaques eine starke Markierung aufweisen.

Lichtmikroskopisch erscheinen Lymphozyten gleichartig in ihrem Aussehen, doch funktionell unterscheiden sie sich durch eine große Heterogenität von Oberflächenproteinen (Drenckhahn und Zenker, 1994a). Die Lymphozyten kann man vereinfachend einteilen in T- und B-Lymphozyten. In der Milz scheinen die Lymphozyten, die eine CKI δ Expression in den Zellen aufweisen, immunmodulatorische Funktionen wahrzunehmen (siehe **Abbildung 13**). Aufgrund des verlangsamten Blutstroms im Bereich der Marginalzone haben die dort lokalisierten, CKI δ -positiven Lymphozyten ausreichende Zeit in Kontakt mit eingeschwemmten Antigenen zu treten, um somit eine spezifische Immunantwort zu induzieren. Eine mögliche Beteiligung von CKI δ an der spezifischen Immunantwort ergibt

sich zudem aus den Untersuchungen der Lymphknoten. Hier finden sich die CKI δ -positiven Lymphozyten in der Corona des Rindenbereichs sowie vereinzelt im Paracortex (siehe **Abbildung 14**). Jedoch sollte bei der Untersuchung von Lymphfollikeln berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Antigene zu einer unterschiedlichen Stimulation der Lymphozyten in den einzelnen Kompartimenten führen (van der Valk und Meijer, 1987). Dies könnte erklären, warum in Lymphfollikeln des Lymphknotens die CKI δ -positiven Lymphozyten in der Corona und im Paracortex zu finden sind, wohingegen in den Lymphfollikeln des Darms die CKI δ -positiven Lymphozyten bzw. Lymphoblasten im Keimzentrum zur Darstellung kommen (vergleiche **Abbildung 14** und **Abbildung 15**). CKI δ scheint zudem in Prozesse der humoralen Immunantwort, die durch Sekretion löslicher Antikörper durch B-Lymphozyten vermittelt wird, involviert zu sein. Dies zeigt sich durch den Nachweis CKI δ -positiver Plasmazellen innerhalb der lymphatischen Organe, aber auch in anderen Geweben, wie zum Beispiel im Uterus (siehe **Abbildung 26**) oder im Zottenstroma des Dünndarms (siehe **Abbildung 21**).

Inwieweit CKI δ Aufgaben sowohl in der spezifischen Abwehr als auch in der unspezifischen Abwehr wahrnimmt, müsste jedoch noch genauere Untersuchungen nach sich ziehen. Das CKI δ eine physiologische Relevanz in diesen Zellen zu haben scheint, kann durch den Nachweis von RNA mittels Northern Blot-Analysen gestützt werden. Hier konnte CKI δ sowohl in Monozyten als auch in Lymphozyten detektiert werden (Okamura et al., 2004a). Zudem wurde eine hohe Kinaseaktivität in isolierten Lymphozyten nachgewiesen (Maritzen et al., 2003), was die Vermutung einer physiologischen Bedeutung von CKI δ in diesen Zellen unterstreicht.

5.4 Mögliche Rolle von CKI δ in sekretorischen Prozessen

Untersuchungen an Säugetierzellen zeigten, dass CKI δ im Zytoplasma in der perinukleären Region mit Membranstrukturen sowie mit Transportvesikeln assoziiert ist (Behrend et al., 2000; Milne et al., 2001), was auf eine Rolle im Vesikeltransport für CKI δ schließen lässt. Interessanterweise konnte eine Expression von CKI δ in allen untersuchten extraepithelialen Drüsenzellen festgestellt werden. Als extraepitheliale Drüsenzellen bezeichnet man die organartig aufgebauten epithelialen Zellverbände, die mit den Oberflächenepithelien durch Ausführungsgänge in offener Verbindung bleiben (Drenckhahn und Zenker, 1994a). Für die

exokrinen Drüsenzellen der einfachen tubulären Drüsen, der Foveolae gastricae des Magens, der Glandulae intestinales des Dünndarms, als auch der Krypten des Kolons konnte eine zytoplasmatische CKI δ Expression nachgewiesen werden (siehe **Kapitel 4.2.3.4**). Auch in den Azini des exokrinen Pankreas, einer einfachen azinösen Drüse, lässt sich diese Kinase im Zytoplasma detektieren (siehe **Kapitel 4.2.3.3**). Die tubuloazinären Drüsen, wie die Speicheldrüsen (siehe **Abbildung 16**) oder die Prostata (siehe **Abbildung 30**), zeigen ebenfalls eine zytoplasmatische CKI δ Expression. Jedoch ist anzumerken, dass je nach nervalen und/oder hormonellen Stimuli dieser Zellen, unterschiedliche Sekretionsvorgänge ablaufen, was zu einer unterschiedlichen Expression von CKI δ führen könnte.

Neben den extraepithelialen Drüsen zeigen auch die intraepithelialen Drüsen, die zwischen den Epithelzellen eines Oberflächenepithels lokalisiert sind, eine CKI δ -positive zytoplasmatische Markierung. Zu diesen Drüsen zählen die Becherzellen im Darmgewebe (siehe **Abbildung 22**), die Paneth-Körnerzellen des Dünndarms (siehe **Abbildung 21**) sowie die Typ 2 Pneumozyten (siehe **Abbildung 11**) des Alveolarepithels. Die endokrinen Zellen des Darm-Epithels zählen ebenfalls zu den intraepithelialen Zellen, werden jedoch im folgenden Kapitel besprochen.

Weitere Untersuchungen müssen jedoch folgen um zu klären, inwieweit CKI δ in Syntheseprozesse, den intrazellulären Transport und die Sekretabgabe dieser Drüsen involviert ist.

5.5 Mögliche Rolle von CKI δ in hormonellen Prozessen

Die endokrinen Drüsen, auch innersekretorische Drüsen genannt, geben ihr Sekret (Hormon) an das umgebende Gewebe oder in das Gefäßsystem ab. In den endokrinen Organen sowie in den disseminierten endokrinen Zellen der Epithelien des Darm-Traktes, lässt sich eine starke CKI δ Expression nachweisen (siehe **Kapitel 4.2.3.4** und **Kapitel 4.2.3.6**). Somit könnte CKI δ in die Regulation hormoneller Prozesse involviert sein, die die Hormonbiosynthese, intrazelluläre Transportmechanismen sowie die Hormonsekretion betreffen könnten. Auffallend ist die homogene Markierung der Zytoplasmamembran in den Zellen der Zona glomerulosa als auch der Leydig-Zellen des Hodens (siehe **Abbildung 34** und **Abbildung 28**). Diesen unterschiedlichen Zelltypen ist gemeinsam, dass sie eine Membranrezeptor-vermittelte Aufnahme von Cholesterin zur Hormonbiosynthese benötigen. Diese Aufnahme

wird wiederum durch die hypophysäre Freisetzung von ACTH (Zona glomerulosa) oder LH (Leydig-Zellen) reguliert und jeweils über einen Membranrezeptor vermittelt. Das von den Leydig-Zellen gebildete Testosteron sowie die Hormone der Nebennierenrinde werden nicht gespeichert, sondern bei Bedarf unter dem Einfluss von LH bzw. ACTH synthetisiert und freigesetzt. Die heterogenen Markierungen des Zytoplasmas der Leydig-Zellen sowie der Zellen der Zona glomerulosa könnte somit auf die unterschiedlichen Phasen der Aktivität von Zellen des gleichen Zelltypus hindeuten.

Die Inselzellen des Pankreas als auch die enteroendokrinen Drüsenzellen des Darm-Traktes sind die endokrinen Drüsen, in deren Zytoplasma sich feine CKI δ -positive Granula nachweisen lassen (siehe **Abbildung 22** und **Abbildung 36**). Dies könnte auf eine mögliche Beteiligung von CKI δ in intrazellulären Transportprozessen hindeuten.

Interessanterweise lässt sich in der Schilddrüse CKI δ in den aktiv sezernierenden Follikel epithelien als homogene zytoplasmatische Markierung nachweisen, während in inaktiven Follikeln eine CKI δ Markierung nur in abgeschwächter Form darstellbar ist (siehe **Abbildung 33**). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass CKI δ möglicherweise eine Rolle in der Sekretabgabe spielt. In Geweben, wie der Hypophyse (siehe **Abbildung 31**), des Nebennierenmarks (siehe **Abbildung 35**) als auch des Pankreas, zeigen die Zellen innerhalb der Organe unterschiedlich stark ausgeprägte Färbeintensitäten. Dies könnte auf die unterschiedlichen Zellen, die verschiedene Hormone produzieren und somit unterschiedliche Funktionen wahrnehmen, zurückzuführen sein. Zudem könnten sich die Zellen in unterschiedlichen Aktivitätszuständen befinden, da die Hormonbiosynthese bzw. Sekretion zum einen der zirkadianen Rhythmik unterliegt und zum anderen durch ein komplexes Wechselspiel regulierender Feedback-Mechanismen gesteuert wird (Gehirn-Hypophyse-Zielorgan-Schleife).

5.6 Mögliche Rolle von CKI δ im neuronalen Informationsaustausch

Erste Hinweise, dass CKI δ eine Rolle in den komplexen Prozessen des neuronalen Informationsaustausches wahrnehmen könnte, ergibt sich aus Untersuchungen in denen gezeigt werden konnte, dass CKI in der Lage ist, DARP-32 *in vitro* als auch *in vivo* zu phosphorylieren (Desdouts et al., 1995). Dieses Signaltransduktionsmolekül nimmt eine obligatorische Rolle in dopaminergen Signalwegen ein. Zudem konnte CKI δ mit Morbus

Alzheimer in Verbindung gebracht werden, einer neurodegenerativen Erkrankung die bestimmte Neurone in verschiedenen Gehirnregionen befällt. Eine Fehlregulation von CKI δ führt zu einer Hyperphosphorylierung von Tau, wodurch es zu einer Aufhebung der Mikrotubulibindung kommt und somit in einer Tau Aggregation resultiert (Ghoshal et al., 1999; Li et al., 2004).

In allen untersuchten Regionen des Nervensystems ließ sich stets eine deutliche Expression von CKI δ in den Perikaryen darstellen (siehe **Kapitel 4.2.3.7**). Neueste Untersuchungen konnten im Gehirn der Ratte eine Gewebe-spezifische Verteilung der drei Splicevarianten von CKI ϵ nachweisen (Takano et al., 2004). Immunhistochemische Analysen zeigten für die Splicevariante CKI ϵ -3 eine Lokalisation im Zytoplasma, in den Axonen und im Zellkern der Neurone, abhängig von der untersuchten Hirnregion. Jedoch ist die physiologische Relevanz von CKI ϵ -3 noch nicht geklärt. In bezug auf das Gehirn wird für diese Splicevariante eine mögliche Phosphorylierung von PER Proteinen diskutiert. Es ist bekannt, dass CKI ϵ und CKI δ eine wichtige Rolle in der Regulation der zirkadianen Periodenlänge durch Kontrolle der subzellulären Lokalisation von PER Proteinen des SCN wahrnehmen (Akashi et al., 2002). Für PER1 konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses Protein nicht nur im SCN (suprachiasmatic nucleus) exprimiert wird sondern in verschiedenen Gehirnregionen nachweisbar war (Abe et al., 2002). Somit könnte CKI δ in diesen Regionen des Gehirns ähnliche Funktion wie sie für CKI ϵ -3 diskutiert werden, bezüglich der Phosphorylierung von PER1 Proteinen, wahrnehmen.

Die Axone der Neuronen zeigen ebenfalls ein positives Markierungsmuster. Für Mitglieder der CKI Familie wurde beschrieben, dass sie möglicherweise mit den Neurofilamenten assoziieren und/oder diese phosphorylieren (Fu et al., 1999). Das Zytoskelett der Neurone setzt sich zusammen aus Neurotubuli, Neurofilamenten sowie Aktinfilamenten. Ihm wird eine Bedeutung für den antero- und retrograden Materialtransport innerhalb des Axons zugesprochen (Drenckhahn und Zenker, 1994b). Für die Neurofilamente, die Intermediärfilamente der Neuronen wurde postuliert, dass eine Phosphorylierung das Axonenkaliber moduliert (de Waegh et al., 1992). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass CKI δ in der Lage ist α/β Tubulin als auch zahlreiche Mikrotubuli-assoziierten Proteine zu phosphorylieren (Behrend et al., 2000; Wolff et al., 2005). Ob sich diese Phosphorylierungen durch CKI δ auf Transportvorgänge innerhalb des Axons auswirken, oder CKI δ andere Funktionen wahrnimmt müsste jedoch noch untersucht werden.

CKI δ scheint zudem eine Rolle in der Informationsübertragung an den Synapsen zu spielen. Hinweise, die diese Vermutung unterstützen, ergeben sich aus der immunhistochemischen Untersuchung der Pars nervosa der Neurohypophyse. Hier können in den Enden der neurosekretorischen Nervenfasern fein granuläre, CKI δ -positive Strukturen in Gefäßnähe als auch im Zytoplasma der Pituizyten nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 31, D**). Die Vermutung, dass CKI δ regulatorische Funktionen in synaptischen Informationsübertragungen wahrnehmen könnte, wird zudem durch die Tatsache bekräftigt, dass für CKI eine physiologische Rolle in der glutaminergen synaptischen Übertragung postuliert wird (Chergui et al., 2005). Auch werden Mitglieder der CKI Familie mit dem SNARE-Komplex in Verbindung gebracht, da diese in der Lage sind, verschiedene Proteine dieses Komplexes in neuronalen Zellen zu phosphorylieren (Dubois et al., 2002). Dieser Komplex spielt eine zentrale Rolle in der Verschmelzung der präsynaptischen Plasmamembran mit der Vesikelmembran. Zudem konnte Snapin als Interaktionspartner von CKI δ identifiziert werden (Dissertation von S. Wolff, 2004), welches eine bedeutende Rolle in der Modulation der Neurosekretion spielt (Tian et al., 2005).

Die immunhistologischen Untersuchungen des Nervengewebes könnten somit auf regulatorische Funktionen von CKI δ im neuronalen Informationsaustausch zwischen Zellen und Gehirnregionen hindeuten. Doch um genauere Aussagen bezüglich der Relevanz, die CKI δ in den unterschiedlichen Regionen wahrnimmt, treffen zu können, müssen detailliertere Untersuchungen erfolgen.

5.7 Mögliche Rolle von CKI δ in Proliferations- und Differenzierungsprozessen

Einer der wenigen Signalwege für den eine direkte Beteiligung von CKI δ beschrieben ist, stellt der Wnt-Signalweg dar (zur Übersicht: (Knippschild et al., 2005; Polakis, 2002)). Diesem Signalweg wird eine bedeutende Rolle in der Regulation von Stammzellen sowie der Tumorentstehung zugeschrieben (zur Übersicht: (Behrens und Lustig, 2004; Reya und Clevers, 2005)).

Die Differenzierung der Prä-T-Lymphozyten findet im Thymus statt unter Ausbildung bestimmter Oberflächenproteine. Die Entwicklung und Proliferation dieser unreifen T-Lymphozyten ist von der Wnt-Signalkaskade abhängig (zur Übersicht: (van de Wetering et al., 2002)). Gounari et al. (Gounari et al., 2001) postulierten, dass diese Kaskade nicht nur

fungiert, um die Anzahl der Lymphozytenvorläuferzellen aufrechtzuerhalten, sondern dass diese Kaskade möglicherweise auch Differenzierungssignale liefert. Da eine CKI δ Expression ausschließlich in den Lymphozyten des Rindenbereiches des Thymus nachweisbar ist (siehe **Abbildung 12**), könnte das auf eine mögliche Funktion von CKI δ im Differenzierungsprozess dieser Zellen hindeuten. Jedoch bedarf es diesbezüglich noch genauerer Untersuchungen. So könnte durch Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenstrukturen die Schritte der T-Lymphozytendifferenzierung charakterisiert und einzelnen Kompartimenten des Thymus zugeordnet werden.

Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen des Magen-Darm-Traktes liefern ebenfalls Hinweise darauf, dass CKI δ in Proliferations- und Differenzierungsprozesse involviert sein könnte. Hier zeigen die Stammzellen, die in der Kryptenregion lokalisiert sind, eine deutliche CKI δ Expression (siehe **Abbildung 21** und **Abbildung 22**). Diese Stammzellen sind in der Lage, sich in bestimmte Vorläuferzellen zu differenzieren. Aus diesen Vorläuferzellen entstehen wiederum Vorläuferzellen oder über Differenzierungsvorgänge die vorherrschenden Zelltypen des Magen-Darm-Traktes. An diesen Prozessen könnte CKI δ möglicherweise beteiligt sein. Dies wird durch Untersuchungen von Korinek und Mitarbeitern (Korinek et al., 1998) gestützt. Diese Arbeitsgruppe postuliert, dass der Wnt-Signalweg unter physiologischen Bedingungen zur Aufrechterhaltung der Vorläuferzellen in den Krypten benötigt wird. Für eine Beteiligung von CKI δ in Differenzierungsprozessen spricht zudem die positive Markierung der Spermatogonien des Hodens. Hier zeigt sich sowohl eine Expression von CKI δ im Zytoplasma der Spermatogonien (siehe **Abbildung 9**) als auch eine nukleäre Expression (siehe **Abbildung 28**). Diese unterschiedlichen Expressionsmuster könnten auf die Testosteronwirkung zurückzuführen sein, die die Spermatogenese stimuliert. Testosteron dringt in die Zielzelle durch passive Diffusion ein und wird im Zytoplasma durch die 5 α -Reduktase in Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. DHT bindet an einen Rezeptor und bewirkt eine Translokation in den Zellkern. Über die Interaktion des Rezeptors mit DNA-enhancern, den AREs (androgen response elements), kommt es zu einer Aktivierung und Bindung von Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren und Korepressoren in dem Transkriptionskomplex. Dieser steuert wiederum die Expression androgen-abhängiger Gene, welche ihrerseits die Zellfunktionen beeinflussen (Keller et al., 1996). In diese Signalkaskade könnte CKI δ involviert sein und auf der Ebene der subzellulären Kompartimentierung reguliert werden, was die unterschiedlichen Expressionsmuster

erklären würde. Eine Kerntransportregulation durch CKI wurde für den Transkriptionsfaktor NFAT1 beschrieben, bei dem CKI die primäre Region, die für den nukleären Import essentiell ist, phosphoryliert (Okamura et al., 2004b). Auch eine Regulation der zirkadianen Rhythmik, durch mPER1 Phosphorylierung und den daraus resultierenden Kerntransport wird für CKI δ postuliert (Vielhaber et al., 2000).

5.8 Zusammenfassende Schlussfolgerung

Die Untersuchungen dieser Arbeit, die einen exemplarischen Überblick über die CKI δ Expression in einem Säugetierorganismus gibt, liefern einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der physiologischen Relevanz von CKI δ .

Durch die Analyse der Expression sowie die genaue Lokalisation von CKI δ in unterschiedlichen Organen und Zelltypen der Maus, konnten mögliche Funktionen dieser Kinase näher charakterisiert werden. Dies könnte als Grundlage für weitere Untersuchungen in den beschriebenen Gewebe- und Zelltypen fungieren, um detailliertere Aussagen über die Regulationsmechanismen in die CKI δ involviert ist, zu gewinnen.

6 Zusammenfassung

CKI δ als Mitglied der ubiquitären CKI Familie ist an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt. Ziel dieser Arbeit war, eine Übersicht über die Expression von CKI δ in einzelnen Organen zu geben. Dadurch sollte die Möglichkeit gegeben werden, Rückschlüsse auf mögliche physiologische Funktionen zu ziehen, die CKI δ in unterschiedlichen Organsystemen wahrnehmen könnte.

Zunächst erfolgte die Etablierung einer Methode, die es ermöglichen sollte die Expression sowie die genaue Lokalisation von CKI δ in unterschiedlichen Zell- und Organsystemen in Mäusen mittels immunhistochemischer Analysen zu bestimmen.

Wie die hier vorgelegten Daten zeigen, ist in allen untersuchten Organen sowohl in den Gefrierschnitten als auch in paraffin-eingebettetem Gewebe CKI δ detektierbar. Der Antigenerhalt von CKI δ in den Paraffinschnitten ist jedoch abhängig von der Fixierungslösung sowie in einigen Organen von der Art der Fixierung. Die formalinhaltigen Fixierungslösungen scheinen für den Antigenerhalt von CKI δ entscheidend zu sein. Für bestimmte Gewebe wie die Milz, jedoch besonders für die Leber scheint zudem die Perfusionsfixation zur Darstellung von CKI δ essentiell zu sein.

Mit der etablierten Methode konnte im Weiteren erstmals die unterschiedliche Expression sowie Lokalisation von CKI δ unter physiologischen Bedingungen, in unterschiedlichen Organen der Maus gezeigt werden. CKI δ konnte in Geweben des Herz-Kreislaufsystems, der unteren Atemwege, des Magen-Darm-Traktes, des Urogenitaltraktes, des lymphatischen Systems, in Teilen des Nervensystems sowie in Drüsenzellen nachgewiesen werden. Innerhalb eines Organs lassen sich bezüglich der CKI δ Expression Unterschiede in der Lokalisation sowie auch in der Färbeintensität der Markierung aufzeigen.

Die CKI δ positiven Lymphozyten der Milz und des Lymphknotens sind in Regionen lokalisiert, in denen der primäre Antigenkontakt stattfindet. Daneben zeigen spezialisierte Makrophagen, wie die Kupfferzellen der Leber und die Alveolarmakrophagen eine starke CKI δ Markierung. Somit könnte CKI δ eine physiologische Relevanz in der Modulation der spezifischen als auch unspezifischen Immunantwort haben. Zudem konnte in allen

untersuchten exokrinen- sowie endokrinen Drüsenzellen CKI δ nachgewiesen werden. Was eine mögliche Beteiligung von CKI δ an Vorgängen der Proteinbiosynthese, intrazellulären Transportprozessen oder der Sekretion von Proteinen andeuten könnte. Eine ausgeprägt positive Markierung findet sich in den Stammzellen unterschiedlicher Organe, wie Magen, Darm, Thymus und Hoden. In diesen Zellpopulationen, scheint CKI δ in Proliferations- als auch Differenzierungsprozesse involviert zu sein.

Die Lokalisation von CKI δ in verschiedenen Organen unter physiologischen Bedingungen gibt somit erste Hinweise für mögliche Zelltyp-spezifische Funktionen von CKI δ .

7 Literaturverzeichnis

Abe, M., Herzog, E. D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M. and Block, G. D. (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci* **22**, 350-6.

Agostinis, P., Pinna, L. A., Meggio, F., Marin, O., Goris, J., Vandenheede, J. R. and Merlevede, W. (1989). A synthetic peptide substrate specific for casein kinase I. *FEBS Lett* **259**, 75-8.

Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T. and Nishida, E. (2002). Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol Cell Biol* **22**, 1693-703.

Alappat, E. C., Feig, C., Boyerinas, B., Volkland, J., Samuels, M., Murmann, A. E., Thorburn, A., Kidd, V. J., Slaughter, C. A., Osborn, S. L. et al. (2005). Phosphorylation of FADD at serine 194 by CKIalpha regulates its nonapoptotic activities. *Mol Cell* **19**, 321-32.

Alappat, E. C., Volkland, J. and Peter, M. E. (2003). Cell cycle effects by C-FADD depend on its C-terminal phosphorylation site. *J Biol Chem* **278**, 41585-8.

Ali-Rachedi, A., Varndell, I. M., Adrian, T. E., Gapp, D. A., Van Noorden, S., Bloom, S. R. and Polak, J. M. (1984). Peptide YY (PYY) immunoreactivity is co-stored with glucagon-related immunoreactants in endocrine cells of the gut and pancreas. *Histochemistry* **80**, 487-491.

Andres, K. H. (1961). Untersuchung über den Feinbau von Spinalganglien. *Z. Zellforsch. u. mikr. Anat.* **55**, 1-48.

Atkins, D., Reiffen, K. A., Tegtmeyer, C. L., Winther, H., Bonato, M. S. and Storkel, S. (2004). Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem* **52**, 893-901.

Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. and Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *Embo J* **12**, 461-8.

Beckstead, J. H. (1994). A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem* **42**, 1127-34.

Behrend, L., Stoter, M., Kurth, M., Rutter, G., Heukeshoven, J., Deppert, W. and Knippschild, U. (2000). Interaction of casein kinase 1 delta (CK1delta) with post-Golgi structures, microtubules and the spindle apparatus. *Eur J Cell Biol* **79**, 240-51.

Behrens, J., Jerchow, B. A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kuhl, M., Wedlich, D. and Birchmeier, W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* **280**, 596-9.

Behrens, J. and Lustig, B. (2004). The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* **48**, 477-87.

Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638-42.

Beyaert, R., Vanhaesebroeck, B., Declercq, W., Van Lint, J., Vandenabele, P., Agostinis, P., Vandenheede, J. R. and Fiers, W. (1995). Casein kinase-1 phosphorylates the p75 tumor necrosis factor receptor and negatively regulates tumor necrosis factor signaling for apoptosis. *J Biol Chem* **270**, 23293-9.

Bienz, M. and Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**, 311-20.

Boenisch, T. (2003). Handbuch Immunchemische Färbemethoden, 3. Auflage: DakoCytomation Corp., Carpinteria, CA, USA und DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland.

Brockman, J. L., Gross, S. D., Sussman, M. R. and Anderson, R. A. (1992). Cell cycle-dependent localization of casein kinase I to mitotic spindles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9454-8.

- Brown, A. M.** (2001). Wnt signaling in breast cancer: have we come full circle? *Breast Cancer Res* **3**, 351-5.
- Brown, R. W. and Chirala, R.** (1995). Utility of microwave-citrate antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol* **8**, 515-20.
- Brunati, A. M., Marin, O., Bisinella, A., Salviati, A. and Pinna, L. A.** (2000). Novel consensus sequence for the Golgi apparatus casein kinase, revealed using proline-rich protein-1 (PRP1)-derived peptide substrates. *Biochem J* **351 Pt 3**, 765-8.
- Burck, H.-C.** (1988). *Histologische Technik: Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis.* Stuttgart; New-York: Thieme-Verlag.
- Burry, R. W.** (2000). Specificity controls for immunocytochemical methods. *J Histochem Cytochem* **48**, 163-6.
- Bustos, V. H., Marin, O., Meggio, F., Cesaro, L., Allende, C. C., Allende, J. E. and Pinna, L. A.** (2005). Generation of protein kinase Ck1alpha mutants which discriminate between canonical and non-canonical substrates. *Biochem J* **391**, 417-24.
- Carmel, G., Leichus, B., Cheng, X., Patterson, S. D., Mirza, U., Chait, B. T. and Kuret, J.** (1994). Expression, purification, crystallization, and preliminary x-ray analysis of casein kinase-1 from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **269**, 7304-9.
- Cattoretti, G., Pileri, S., Parravicini, C., Becker, M. H., Poggi, S., Bifulco, C., Key, G., D'Amato, L., Sabbatini, E., Feudale, E. et al.** (1993). Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* **171**, 83-98.
- Cegielska, A., Gietzen, K. F., Rivers, A. and Virshup, D. M.** (1998). Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis. *J Biol Chem* **273**, 1357-64.
- Chen, L., Li, C., Pan, Y. and Chen, J.** (2005). Regulation of p53-MDMX interaction by casein kinase 1 alpha. *Mol Cell Biol* **25**, 6509-20.
- Chene, P.** (2003). Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 102-9.
- Cheng, H.** (1974a). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. II. Mucous cells. *Am J Anat* **141**, 481-501.
- Cheng, H.** (1974b). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. IV. Paneth cells. *Am J Anat* **141**, 521-35.
- Cheng, H. and Leblond, C. P.** (1974a). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am J Anat* **141**, 461-79.
- Cheng, H. and Leblond, C. P.** (1974b). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* **141**, 537-61.
- Chergui, K., Svenningsson, P. and Greengard, P.** (2005). Physiological role for casein kinase 1 in glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* **25**, 6601-9.
- Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Casenghi, M., Zaira Limongi, M., D'Angelo, M., Soddu, S., Lavia, P. and Cundari, E.** (2001). p53 displacement from centrosomes and p53-mediated G1 arrest following transient inhibition of the mitotic spindle. *J Biol Chem* **276**, 19205-13.
- Cobb, M. H. and Rosen, O. M.** (1983). Description of a protein kinase derived from insulin-treated 3T3-L1 cells that catalyzes the phosphorylation of ribosomal protein S6 and casein. *J Biol Chem* **258**, 12472-81.
- Cohen, P.** (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* **4**, E127-30.
- Conacci-Sorrell, M. E., Ben-Yedidia, T., Shtutman, M., Feinstein, E., Einat, P. and Ben-Ze'ev, A.** (2002). Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev* **16**, 2058-72.

- Cuevas, E. C., Bateman, A. C., Wilkins, B. S., Johnson, P. A., Williams, J. H., Lee, A. H., Jones, D. B. and Wright, D. H. (1994). Microwave antigen retrieval in immunocytochemistry: a study of 80 antibodies. *J Clin Pathol* **47**, 448-52.
- Davidoff, M. S., Middendorff, R. and Holstein, A. F. (1996). Dual nature of Leydig cells of the human testis. *Biomed. Rev.* **6**, 11-41.
- Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stanek, P., Glinka, A. and Niehrs, C. (2005). Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* **438**, 867-72.
- de Waegh, S. M., Lee, V. M. and Brady, S. T. (1992). Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* **68**, 451-63.
- DeMaggio, A. J., Lindberg, R. A., Hunter, T. and Hoekstra, M. F. (1992). The budding yeast HRR25 gene product is a casein kinase I isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7008-12.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B. and Martinou, J. C. (2001). Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell* **8**, 601-11.
- Desdouts, F., Cohen, D., Nairn, A. C., Greengard, P. and Girault, J. A. (1995). Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase I in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **270**, 8772-8.
- Dhillon, N. and Hoekstra, M. F. (1994). Characterization of two protein kinases from *Schizosaccharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair. *Embo J* **13**, 2777-88.
- Drenckhahn, D. and Zenker, W. (1994a). Benninghoff Anatomie, Band 1. München; Wien; Baltimore: Urban und Schwarzenberg.
- Drenckhahn, D. and Zenker, W. (1994b). Benninghoff Anatomie, Band 2. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg.
- Dubois, T., Kerai, P., Learmonth, M., Cronshaw, A. and Aitken, A. (2002). Identification of syntaxin-1A sites of phosphorylation by casein kinase I and casein kinase II. *Eur J Biochem* **269**, 909-14.
- Dubois, T., Kerai, P., Zemlickova, E., Howell, S., Jackson, T. R., Venkateswarlu, K., Cullen, P. J., Theibert, A. B., Larose, L., Roach, P. J. et al. (2001). Casein kinase I associates with members of the centaurin-alpha family of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding proteins. *J Biol Chem* **276**, 18757-64.
- Dumaz, N., Milne, D. M. and Meek, D. W. (1999). Protein kinase CK1 is a p53-threonine 18 kinase which requires prior phosphorylation of serine 15. *FEBS Lett* **463**, 312-6.
- Eastman, Q. and Grosschedl, R. (1999). Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 233-40.
- Ebisawa, T., Uchiyama, M., Kajimura, N., Mishima, K., Kamei, Y., Katoh, M., Watanabe, T., Sekimoto, M., Shibui, K., Kim, K. et al. (2001). Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep* **2**, 342-6.
- Eide, E. J., Vielhaber, E. L., Hinz, W. A. and Virshup, D. M. (2002). The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase epsilon. *J Biol Chem* **277**, 17248-54.
- Elias, L., Li, A. P. and Longmire, J. (1981). Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent and -independent protein kinase in acute myeloblastic leukemia. *Cancer Res* **41**, 2182-8.
- Faundez, V. V. and Kelly, R. B. (2000). The AP-3 complex required for endosomal synaptic vesicle biogenesis is associated with a casein kinase alpha-like isoform. *Mol Biol Cell* **11**, 2591-604.
- Firth, C. H. (1983). Histology, Adrenal Gland, Mouse. In *Endocrine System*, (ed. R. W. Jones U. Mohr and R. D. Hunt). Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer Verlag.

- Fish, K. J., Cegielska, A., Getman, M. E., Landes, G. M. and Virshup, D. M.** (1995). Isolation and characterization of human casein kinase I epsilon (CKI), a novel member of the CKI gene family. *J Biol Chem* **270**, 14875-83.
- Flotow, H. and Roach, P. J.** (1991). Role of acidic residues as substrate determinants for casein kinase I. *J Biol Chem* **266**, 3724-7.
- Frierson, H. F., Jr., El-Naggar, A. K., Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Su, A. I., Cheng, J., Saku, T., Moskaluk, C. A. and Hampton, G. M.** (2002). Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. *Am J Pathol* **161**, 1315-23.
- Fu, Z., Chakraborti, T., Morse, S., Bennett, G. S. and Shaw, G.** (2001). Four casein kinase I isoforms are differentially partitioned between nucleus and cytoplasm. *Exp Cell Res* **269**, 275-86.
- Fu, Z., Green, C. L. and Bennett, G. S.** (1999). Relationship between casein kinase I isoforms and a neurofilament-associated kinase. *J Neurochem* **73**, 830-8.
- Fuja, T. J., Lin, F., Osann, K. E. and Bryant, P. J.** (2004). Somatic mutations and altered expression of the candidate tumor suppressors CSNK1 epsilon, DLG1, and EDD/hHYD in mammary ductal carcinoma. *Cancer Res* **64**, 942-51.
- Fujita, H., Tamura, S., Takano, T., Ishibashi, S. and Tanaka, T.** (1980). Fine structural changes in the aging mouse thyroid. *J Gerontol.* **35**, 3-15.
- Ghoshal, N., Smiley, J. F., DeMaggio, A. J., Hoekstra, M. F., Cochran, E. J., Binder, L. I. and Kuret, J.** (1999). A new molecular link between the fibrillar and granulovacuolar lesions of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **155**, 1163-72.
- Gietzen, K. F. and Virshup, D. M.** (1999). Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase I epsilon. *J Biol Chem* **274**, 32063-70.
- Giorno, R.** (1984). A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn Immunol* **2**, 161-6.
- Gounari, F., Aifantis, I., Khazaie, K., Hoeflinger, S., Harada, N., Taketo, M. M. and von Boehmer, H.** (2001). Somatic activation of beta-catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development. *Nat Immunol* **2**, 863-9.
- Graves, P. R., Haas, D. W., Hagedorn, C. H., DePaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J.** (1993). Molecular cloning, expression, and characterization of a 49-kilodalton casein kinase I isoform from rat testis. *J Biol Chem* **268**, 6394-401.
- Graves, P. R. and Roach, P. J.** (1995). Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta. *J Biol Chem* **270**, 21689-94.
- Green, C. L. and Bennett, G. S.** (1998). Identification of four alternatively spliced isoforms of chicken casein kinase I alpha that are all expressed in diverse cell types. *Gene* **216**, 189-95.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M. et al.** (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**, 589-600.
- Gross, S. D. and Anderson, R. A.** (1998). Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal* **10**, 699-711.
- Gross, S. D., Hoffman, D. P., Fiset, P. L., Baas, P. and Anderson, R. A.** (1995). A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive casein kinase I alpha associates with synaptic vesicles and phosphorylates a subset of vesicle proteins. *J Cell Biol* **130**, 711-24.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Hardingham, G. E. and Bading, H.** (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* **26**, 81-9.
- Hatton, G. I.** (1988). Pituicytes, Glia and control of terminal secretion. *J.exp. Biol.* **139**, 67-79.

- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-9.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**, 1509-12.
- Ho, Y., Mason, S., Kobayashi, R., Hoekstra, M. and Andrews, B. (1997). Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle-regulatory transcription factor, SBF, in the transcriptional response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 581-6.
- Hoekstra, M. F., Liskay, R. M., Ou, A. C., DeMaggio, A. J., Burbee, D. G. and Heffron, F. (1991). HRR25, a putative protein kinase from budding yeast: association with repair of damaged DNA. *Science* **253**, 1031-4.
- Holstein, A. F. (1999). Organisation und Regulation der Gametenreifung. *BIA-Report* **4**, 15-37.
- Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* **29**, 577-80.
- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B. G. and Kemler, R. (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* **59**, 3-10.
- Huelsken, J. and Birchmeier, W. (2001). New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 547-53.
- Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S. and Kikuchi, A. (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *Embo J* **17**, 1371-84.
- Illenberger, S., Zheng-Fischhofer, Q., Preuss, U., Stamer, K., Baumann, K., Trinczek, B., Biernat, J., Godemann, R., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (1998). The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. *Mol Biol Cell* **9**, 1495-512.
- Ingelfinger, F. J. (1958). Esophageal motility. *Physiol Rev* **38**, 533-84.
- Jeffrey, P. (2003). Microscopic structure of the lung. In *Respiratory Medicine, 3rd edn.*, (ed. G. D. Gibson GJ, Costabel V, Stok PJ, Corrin B), pp. 34-50. London: Elsevier Science.
- Johnson, W. D., Lang, C. M. and Johnson, M. T. (1978). Fixatives and methods of fixation in selected tissues of the laboratory rat. *Clin Toxicol* **12**, 583-600.
- Josephsen, K., Smith, C. E. and Nanci, A. (1999). Selective but nonspecific immunolabeling of enamel protein-associated compartments by a monoclonal antibody against vimentin. *J Histochem Cytochem* **47**, 1237-45.
- Jungermann, K. and Katz, N. (1989). Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev* **69**, 708-64.
- Kan, R. K., Pleva, C. M., Hamilton, T. A. and Petrali, J. P. (2005). Immunolocalization of MAP-2 in routinely formalin-fixed, paraffin-embedded guinea pig brain sections using microwave irradiation: a comparison of different combinations of antibody clones and antigen retrieval buffer solutions. *Microsc Microanal* **11**, 175-80.
- Karam, S. M. and Leblond, C. P. (1992). Identifying and counting epithelial cell types in the "corpus" of the mouse stomach. *Anat Rec* **232**, 231-46.
- Kearney, P. H., Ebert, M. and Kuret, J. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of two novel fission yeast casein kinase-1 isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* **203**, 231-6.
- Keller, E. T., Ershler, W. B. and Chang, C. (1996). The androgen receptor: a mediator of diverse responses. *Front Biosci* **1**, d59-71.
- Kim, S. H., Kook, M. C., Shin, Y. K., Park, S. H. and Song, H. G. (2004). Evaluation of antigen retrieval buffer systems. *J Mol Histo* **35**, 409-16.

- Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Su, L. K., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, A. C., Hedge, P., McKechnie, D. et al. (1991). Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* **253**, 661-5.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Lohler, J. and Stoter, M. (2005). The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* **17**, 675-89.
- Knippschild, U., Milne, D., Campbell, L. and Meek, D. (1996). p53 N-terminus-targeted protein kinase activity is stimulated in response to wild type p53 and DNA damage. *Oncogene* **13**, 1387-93.
- Knippschild, U., Milne, D. M., Campbell, L. E., DeMaggio, A. J., Christenson, E., Hoekstra, M. F. and Meek, D. W. (1997). p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs. *Oncogene* **15**, 1727-36.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J. and Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* **19**, 379-83.
- Kraehenbuhl, J.-P. and Neutra, M. (2000). Epithelial M Cells: Differentiation and Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 301-332.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N. and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303.
- Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V. and Kastan, M. B. (1992). Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7491-5.
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H. and Reppert, S. M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193-205.
- Kusuda, J., Hidari, N., Hirai, M. and Hashimoto, K. (1996). Sequence analysis of the cDNA for the human casein kinase I delta (CSNK1D) gene and its chromosomal localization. *Genomics* **32**, 140-3.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W. et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-6.
- Leblond, C. P., Clermont, Y. and Nadler, N. J. (1967). The pattern of stem cell renewal in three epithelia: (esophagus, intestine and testis). *Proc Can Cancer Conf* **7**, 3-30.
- Lee, E., Salic, A. and Kirschner, M. W. (2001). Physiological regulation of [beta]-catenin stability by Tcf3 and CK1epsilon. *J Cell Biol* **154**, 983-93.
- Leong, A. S. (1996). Microwaves in diagnostic immunohistochemistry. *Eur J Morphol* **34**, 381-3.
- Leong, A. S. (2004). Pitfalls in diagnostic immunohistology. *Adv Anat Pathol* **11**, 86-93.
- Leong, A. S. and Gilham, P. N. (1989). The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathology* **21**, 266-8.
- Leong, A. S.-Y. L. a. F. J. W.-M. (2002). Microwave-Stimulated Antigen Retrieval - An Update. *Acta Histochem. Cytochem.* **35**, 367-374.
- Levina, E., Oren, M. and Ben-Ze'ev, A. (2004). Downregulation of beta-catenin by p53 involves changes in the rate of beta-catenin phosphorylation and Axin dynamics. *Oncogene* **23**, 4444-53.
- Li, G., Yin, H. and Kuret, J. (2004). Casein kinase 1 delta phosphorylates tau and disrupts its binding to microtubules. *J Biol Chem* **279**, 15938-45.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.

- Lin, R. C. and Scheller, R. H. (2000). Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 19-49.
- Lin, S. Y., Xia, W., Wang, J. C., Kwong, K. Y., Spohn, B., Wen, Y., Pestell, R. G. and Hung, M. C. (2000). Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4262-6.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. and He, X. (2002a). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**, 837-47.
- Liu, F., Ma, X. H., Ule, J., Bibb, J. A., Nishi, A., DeMaggio, A. J., Yan, Z., Nairn, A. C. and Greengard, P. (2001). Regulation of cyclin-dependent kinase 5 and casein kinase 1 by metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11062-8.
- Liu, F., Virshup, D. M., Nairn, A. C. and Greengard, P. (2002b). Mechanism of regulation of casein kinase I activity by group I metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* **277**, 45393-9.
- Longenecker, K. L., Roach, P. J. and Hurley, T. D. (1996). Three-dimensional structure of mammalian casein kinase I: molecular basis for phosphate recognition. *J Mol Biol* **257**, 618-31.
- Longenecker, K. L., Roach, P. J. and Hurley, T. D. (1998). Crystallographic studies of casein kinase I delta toward a structural understanding of auto-inhibition. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54 (Pt 3)**, 473-5.
- Lowrey, P. L., Shimomura, K., Antoch, M. P., Yamazaki, S., Zemenides, P. D., Ralph, M. R., Menaker, M. and Takahashi, J. S. (2000). Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* **288**, 483-92.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-90.
- MacIntyre, N. (2001). Unmasking antigens for immunohistochemistry. *Br J Biomed Sci* **58**, 190-6.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-34.
- Marin, O., Bustos, V. H., Cesaro, L., Meggio, F., Pagano, M. A., Antonelli, M., Allende, C. C., Pinna, L. A. and Allende, J. E. (2003). A noncanonical sequence phosphorylated by casein kinase 1 in beta-catenin may play a role in casein kinase 1 targeting of important signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10193-200.
- Marin, O., Meggio, F., Sarno, S., Andretta, M. and Pinna, L. A. (1994). Phosphorylation of synthetic fragments of inhibitor-2 of protein phosphatase-1 by casein kinase-1 and -2. Evidence that phosphorylated residues are not strictly required for efficient targeting by casein kinase-1. *Eur J Biochem* **223**, 647-53.
- Maritzen, T., Lohler, J., Deppert, W. and Knippschild, U. (2003). Casein kinase I delta (CKIdelta) is involved in lymphocyte physiology. *Eur J Cell Biol* **82**, 369-78.
- Marques-Pereira, J. P. and Leblond, C. P. (1965). Mitosis and Differentiation in the Stratified Squamous Epithelium of the Rat Esophagus. *Am J Anat* **117**, 73-87.
- Mashhoon, N., DeMaggio, A. J., Tereshko, V., Bergmeier, S. C., Egli, M., Hoekstra, M. F. and Kuret, J. (2000). Crystal structure of a conformation-selective casein kinase-1 inhibitor. *J Biol Chem* **275**, 20052-60.
- Masuda, K., Ono, M., Okamoto, M., Morikawa, W., Otsubo, M., Migita, T., Tsuneyoshi, M., Okuda, H., Shuin, T., Naito, S. et al. (2003). Downregulation of Cap43 gene by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein in human renal cancer cells. *Int J Cancer* **105**, 803-10.
- McKay, R. M., Peters, J. M. and Graff, J. M. (2001a). The casein kinase I family in Wnt signaling. *Dev Biol* **235**, 388-96.
- McKay, R. M., Peters, J. M. and Graff, J. M. (2001b). The casein kinase I family: roles in morphogenesis. *Dev Biol* **235**, 378-87.

- Miller, R. T., Swanson, P. E. and Wick, M. R. (2000). Fixation and epitope retrieval in diagnostic immunohistochemistry: a concise review with practical considerations. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **8**, 228-35.
- Milne, D. M., Looby, P. and Meek, D. W. (2001). Catalytic activity of protein kinase CK1 delta (casein kinase 1delta) is essential for its normal subcellular localization. *Exp Cell Res* **263**, 43-54.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O. and Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **86**, 391-9.
- Morgan, J. M., Navabi, H., Schmid, K. W. and Jasani, B. (1994). Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate-mediated high-temperature antigen retrieval. *J Pathol* **174**, 301-7.
- Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275**, 1787-90.
- Murakami, A., Kimura, K. and Nakano, A. (1999). The inactive form of a yeast casein kinase I suppresses the secretory defect of the sec12 mutant. Implication of negative regulation by the Hrr25 kinase in the vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **274**, 3804-10.
- Neve, P. and Rondeaux, P. (1991). Age-related accumulation of lysosomes and other cytological features in active thyroid follicles of the CBA mouse. *Cell Tissue Res*. **265**, 275-85.
- Nusse, R. (2005). Cell biology: relays at the membrane. *Nature* **438**, 747-9.
- Okamura, A., Iwata, N., Nagata, A., Tamekane, A., Shimoyama, M., Gomyo, H., Yakushijin, K., Urahama, N., Hamaguchi, M., Fukui, C. et al. (2004a). Involvement of casein kinase Iepsilon in cytokine-induced granulocytic differentiation. *Blood* **103**, 2997-3004.
- Okamura, H., Garcia-Rodriguez, C., Martinson, H., Qin, J., Virshup, D. M. and Rao, A. (2004b). A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol Cell Biol* **24**, 4184-95.
- Oren, M. (1994). Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death. *Semin Cancer Biol* **5**, 221-7.
- Panek, H. R., Stepp, J. D., Engle, H. M., Marks, K. M., Tan, P. K., Lemmon, S. K. and Robinson, L. C. (1997). Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *Embo J* **16**, 4194-204.
- Pearse, A. G. E. (1977). The diffuse neuroendocrine system and the APUD concept: related "endocrine" peptides in brain, intestine, pituitary, placenta, and anuran cutaneous glands. *Med. Biol.* **55**, 115-125.
- Peifer, M. and Polakis, P. (2000). Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus. *Science* **287**, 1606-9.
- Peters, J. M., McKay, R. M., McKay, J. P. and Graff, J. M. (1999). Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature* **401**, 345-50.
- Petrusz, P. (1983). Essential requirements for the validity of immunocytochemical staining procedures. *J Histochem Cytochem* **31**, 177-9.
- Pierre, M. and Loeb, J. E. (1982). Purification and characterization of the cytoplasmic casein kinase I from rat liver. *Biochim Biophys Acta* **700**, 221-8.
- Pileri, S. A., Roncador, G., Ceccarelli, C., Piccioli, M., Briskomatis, A., Sabbatini, E., Ascani, S., Santini, D., Piccaluga, P. P., Leone, O. et al. (1997). Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol* **183**, 116-23.
- Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**, 1837-51.
- Polakis, P. (2002). Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect. *Curr Biol* **12**, R499-R501.

- Pulgar, V., Marin, O., Meggio, F., Allende, C. C., Allende, J. E. and Pinna, L. A.** (1999). Optimal sequences for non-phosphate-directed phosphorylation by protein kinase CK1 (casein kinase-1)—a re-evaluation. *Eur J Biochem* **260**, 520-6.
- Pyle, R. A., Schivell, A. E., Hidaka, H. and Bajjalieh, S. M.** (2000). Phosphorylation of synaptic vesicle protein 2 modulates binding to synaptotagmin. *J Biol Chem* **275**, 17195-200.
- Reya, T. and Clevers, H.** (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**, 843-50.
- Rindi, G., Buffa, R., Sessa, F., Tortora, O. and Solcia, E.** (1986). Chromogranin A, B and C immunoreactivities of mammalian endocrine cells. Distribution, distinction from costored hormones/prohormones and relationship with the argyrophil component of secretory granules. *Histochemistry* **85**, 19-28.
- Rivers, A., Gietzen, K. F., Vielhaber, E. and Virshup, D. M.** (1998). Regulation of casein kinase I epsilon and casein kinase I delta by an in vivo futile phosphorylation cycle. *J Biol Chem* **273**, 15980-4.
- Robaire, B. and Viger, R. S.** (1995). Regulation of Epididymal Epithelial Cell Functions. *Biology of Reproduction* **52**, 226-236.
- Robinson, L. C., Hubbard, E. J., Graves, P. R., DePaoli-Roach, A. A., Roach, P. J., Kung, C., Haas, D. W., Hagedorn, C. H., Goebel, M., Culbertson, M. R. et al.** (1992). Yeast casein kinase I homologues: an essential gene pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 28-32.
- Robinson, L. C., Menold, M. M., Garrett, S. and Culbertson, M. R.** (1993). Casein kinase I-like protein kinases encoded by YCK1 and YCK2 are required for yeast morphogenesis. *Mol Cell Biol* **13**, 2870-81.
- Roof, D. M., Meluh, P. B. and Rose, M. D.** (1992). Kinesin-related proteins required for assembly of the mitotic spindle. *J Cell Biol* **118**, 95-108.
- Rossen-Runge, E. C.** (1962). The process of spermatogenesis in mammals. *Biol. Rev.* **37**, 343-377.
- Rosso, L., Peteri-Brunback, B., Vouret-Craviari, V., Deroanne, C., Troadec, J. D., Van Obberghen-Schilling, E. and Mienville, J. M.** (2002). RhoA inhibition is a key step in pituicyte stellation induced by A(1)-type adenosine receptor activation. *Glia* **38**, 351.
- Rowles, J., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J. and Cobb, M. H.** (1991). Purification of casein kinase I and isolation of cDNAs encoding multiple casein kinase I-like enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9548-52.
- Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E. and Polakis, P.** (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* **275**, 1790-2.
- Rubinfeld, B., Tice, D. A. and Polakis, P.** (2001). Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase I epsilon. *J Biol Chem* **276**, 39037-45.
- Sadot, E., Geiger, B., Oren, M. and Ben-Ze'ev, A.** (2001). Down-regulation of beta-catenin by activated p53. *Mol Cell Biol* **21**, 6768-81.
- Sae-Kwang, K., Hyeung-Sik, I. and Jae-Hyun, L.** (2003). Immunohistochemical study of the pancreatic endocrine cells in the BALB/c mice: An unique distributional pattern of Glucagon. *J. Vet. Sci.* **3**, 167-173.
- Sakanaka, C.** (2002). Phosphorylation and regulation of beta-catenin by casein kinase I epsilon. *J Biochem (Tokyo)* **132**, 697-703.
- Sakanaka, C., Weiss, J. B. and Williams, L. T.** (1998). Bridging of beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta by axin and inhibition of beta-catenin-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3020-3.
- Sasaki, F. and Iwama, Y.** (1988). Sex difference in prolactin and growth hormone cells in mouse adenohypophysis: stereological, morphometric, and immunohistochemical studies by light and electron microscopy. *endocrinology* **123**, 905-12.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H. and Peter, M. E.** (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* **17**, 1675-87.

- Schuler, M. and Green, D. R.** (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* **29**, 684-8.
- Schwartz, J.** (2000). Intercellular Communication in the Anterior Pituitary. *Endocrine Reviews* **21**, 488-513.
- Shi, S. R., Cote, R. J. and Taylor, C. R.** (1997). Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem* **45**, 327-43.
- Shi, S. R., Cote, R. J. and Taylor, C. R.** (2001). Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem* **49**, 931-7.
- Shi, S. R., Key, M. E. and Kalra, K. L.** (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* **39**, 741-8.
- Shiloh, Y.** (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**, 155-68.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. and Ben-Ze'ev, A.** (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5522-7.
- Shuang, R., Zhang, L., Fletcher, A., Groblewski, G. E., Pevsner, J. and Stuenkel, E. L.** (1998). Regulation of Munc-18/syntaxin 1A interaction by cyclin-dependent kinase 5 in nerve endings. *J Biol Chem* **273**, 4957-66.
- Sillibourne, J. E., Milne, D. M., Takahashi, M., Ono, Y. and Meek, D. W.** (2002). Centrosomal anchoring of the protein kinase CK1delta mediated by attachment to the large, coiled-coil scaffolding protein CG-NAP/AKAP450. *J Mol Biol* **322**, 785-97.
- Singh, T. J., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K.** (1995). Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal Alzheimer-like state. *J Neurochem* **64**, 1420-3.
- Snyder, M. A., Bishop, J. M., McGrath, J. P. and Levinson, A. D.** (1985). A mutation at the ATP-binding site of pp60v-src abolishes kinase activity, transformation, and tumorigenicity. *Mol Cell Biol* **5**, 1772-9.
- Songyang, Z., Lu, K. P., Kwon, Y. T., Tsai, L. H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D. A., Soderling, T. R., Bartleson, C., Graves, D. J. et al.** (1996). A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol* **16**, 6486-93.
- Sparks, A. B., Morin, P. J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W.** (1998). Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**, 1130-4.
- Stinson, S. F., Schuller, H. M., Reznik, G. and Mackeras, D.** (1990). Atlas of Tumor Pathology of the Fischer Rat. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Stöter, M., Bamberger, A. M., Aslan, B., Kurth, M., Speidel, D., Loning, T., Frank, H. G., Kaufmann, P., Lohler, J., Henne-Bruns, D. et al.** (2005). Inhibition of casein kinase I delta alters mitotic spindle formation and induces apoptosis in trophoblast cells. *Oncogene*.
- Sun, F., Ritchie, K., Hassager, C., Maercklein, P. and Fitzpatrick, L. A.** (1993). Heterogeneous Response to Calcium by Individual Parathyroid Cells. *J.Clin. Invest.* **91**, 595-601.
- Takano, A., Hoe, H. S., Isojima, Y. and Nagai, K.** (2004). Analysis of the expression, localization and activity of rat casein kinase 1epsilon-3. *Neuroreport* **15**, 1461-4.
- Tapia, C., Featherstone, T., Gomez, C., Taillon-Miller, P., Allende, C. C. and Allende, J. E.** (1994). Cloning and chromosomal localization of the gene coding for human protein kinase CK1. *FEBS Lett* **349**, 307-12.
- Tarapore, P., Tokuyama, Y., Horn, H. F. and Fukasawa, K.** (2001). Difference in the centrosome duplication regulatory activity among p53 'hot spot' mutants: potential role of Ser 315 phosphorylation-dependent centrosome binding of p53. *Oncogene* **20**, 6851-63.

- Tetsu, O. and McCormick, F.** (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**, 422-6.
- Tian, J. H., Wu, Z. X., Unzicker, M., Lu, L., Cai, Q., Li, C., Schirra, C., Matti, U., Stevens, D., Deng, C. et al.** (2005). The role of Snapin in neurosecretion: snapin knock-out mice exhibit impaired calcium-dependent exocytosis of large dense-core vesicles in chromaffin cells. *J Neurosci* **25**, 10546-55.
- Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptacek, L. J. and Fu, Y. H.** (2001). An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* **291**, 1040-3.
- Tuazon, P. T. and Traugh, J. A.** (1991). Casein kinase I and II—multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **23**, 123-64.
- Turner, K. M., Burgoyne, R. D. and Morgan, A.** (1999). Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. *Trends Neurosci* **22**, 459-64.
- van de Wetering, M., de Lau, W. and Clevers, H.** (2002). WNT signaling and lymphocyte development. *Cell* **109 Suppl**, S13-9.
- van den Berg, T. K., Dopp, E. A. and Dijkstra, C. D.** (2001). Rat macrophages: membrane glycoproteins in differentiation and function. *Immunol Rev* **184**, 45-57.
- van der Valk, P. and Meijer, C. J.** (1987). The histology of reactive lymph nodes. *Am J Surg Pathol* **11**, 866-82.
- Vancura, A., Sessler, A., Leichus, B. and Kuret, J.** (1994). A prenylation motif is required for plasma membrane localization and biochemical function of casein kinase I in budding yeast. *J Biol Chem* **269**, 19271-8.
- Verhofstad, A. A. J., Coupland, R. E., Parker, T. and Goldstein, M.** (1985). Immunohistochemical and biochemical study on the development of the noradrenaline- and adrenaline-storing cells of the adrenal medulla of the rat. *Cell Tissue Res* **242:233**.
- Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z. H. and Virshup, D. M.** (2000). Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol Cell Biol* **20**, 4888-99.
- Walter, J., Grunberg, J., Schindzielorz, A. and Haass, C.** (1998). Proteolytic fragments of the Alzheimer's disease associated presenilins-1 and -2 are phosphorylated in vivo by distinct cellular mechanisms. *Biochemistry* **37**, 5961-7.
- Walter, J., Schindzielorz, A., Hartung, B. and Haass, C.** (2000). Phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein at the cell surface by ectocasein kinases 1 and 2. *J Biol Chem* **275**, 23523-9.
- Wang, P. C., Vancura, A., Mitcheson, T. G. and Kuret, J.** (1992). Two genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode a membrane-bound form of casein kinase-1. *Mol Biol Cell* **3**, 275-86.
- Wang, X., Hoekstra, M. F., DeMaggio, A. J., Dhillon, N., Vancura, A., Kuret, J., Johnston, G. C. and Singer, R. A.** (1996). Prenylated isoforms of yeast casein kinase I, including the novel Yck3p, suppress the *gcs1* blockage of cell proliferation from stationary phase. *Mol Cell Biol* **16**, 5375-85.
- Werner, M., Von Wasielewski, R. and Komminoth, P.** (1996). Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol* **105**, 253-60.
- Winter, M., Milne, D., Dias, S., Kulikov, R., Knippschild, U., Blattner, C. and Meek, D.** (2004). Protein kinase CK1delta phosphorylates key sites in the acidic domain of murine double-minute clone 2 protein (MDM2) that regulate p53 turnover. *Biochemistry* **43**, 16356-64.
- Wodarz, A. and Nusse, R.** (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 59-88.
- Wolff, S., Xiao, Z., Wittau, M., Sussner, N., Stoter, M. and Knippschild, U.** (2005). Interaction of casein kinase 1 delta (CK1 delta) with the light chain LC2 of microtubule associated protein 1A (MAP1A). *Biochim Biophys Acta* **1745**, 196-206.

- Wong, S. C., Lo, S. F., Lee, K. C., Yam, J. W., Chan, J. K. and Wendy Hsiao, W. L.** (2002). Expression of frizzled-related protein and Wnt-signalling molecules in invasive human breast tumours. *J Pathol* **196**, 145-53.
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D. and Levine, A. J.** (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* **7**, 1126-32.
- Xu, R. M., Carmel, G., Sweet, R. M., Kuret, J. and Cheng, X.** (1995). Crystal structure of casein kinase-1, a phosphate-directed protein kinase. *Embo J* **14**, 1015-23.
- Xu, Y., Padiath, Q. S., Shapiro, R. E., Jones, C. R., Wu, S. C., Saigoh, N., Saigoh, K., Ptacek, L. J. and Fu, Y. H.** (2005). Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* **434**, 640-4.
- Yamamoto, H., Kishida, S., Uochi, T., Ikeda, S., Koyama, S., Asashima, M. and Kikuchi, A.** (1998). Axin, a member of the Axin family, interacts with both glycogen synthase kinase 3beta and beta-catenin and inhibits axis formation of *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol* **18**, 2867-75.
- Yamashita, S. and Okada, Y.** (2005). Mechanisms of heat-induced antigen retrieval: analyses in vitro employing SDS-PAGE and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* **53**, 13-21.
- Yasojima, K., Kuret, J., DeMaggio, A. J., McGeer, E. and McGeer, P. L.** (2000). Casein kinase 1 delta mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain. *Brain Res* **865**, 116-20.
- Yu, S. and Roth, M. G.** (2002). Casein kinase I regulates membrane binding by ARF GAP1. *Mol Biol Cell* **13**, 2559-70.
- Zeng, L., Fagotto, F., Zhang, T., Hsu, W., Vasicek, T. J., Perry, W. L., 3rd, Lee, J. J., Tilghman, S. M., Gumbiner, B. M. and Costantini, F.** (1997). The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell* **90**, 181-92.
- Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J. and He, X.** (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* **438**, 873-7.
- Zhai, L., Graves, P. R., Robinson, L. C., Italiano, M., Culbertson, M. R., Rowles, J., Cobb, M. H., DePaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J.** (1995). Casein kinase I gamma subfamily. Molecular cloning, expression, and characterization of three mammalian isoforms and complementation of defects in the *Saccharomyces cerevisiae* YCK genes. *J Biol Chem* **270**, 12717-24.
- Zhang, J., Gross, S. D., Schroeder, M. D. and Anderson, R. A.** (1996). Casein kinase I alpha and alpha L: alternative splicing-generated kinases exhibit different catalytic properties. *Biochemistry* **35**, 16319-27.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Pylogenetische Beziehung der CKI Isoformen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und Mammalia und deren Beziehung zu anderen humanen Casein Kinasen.	9
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der CK1 Isoformen der Säuger. Die grauen Boxen kennzeichnen die variablen N- bzw. C-Termini. Die Kinasedomäne ist blau dargestellt (nach: (Gross and Anderson, 1998)).	10
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur von CKI δ (<i>Rattus Norvegicus</i>).	11
Abbildung 4:	Detektion von CKI δ in Proteinlysaten unterschiedlicher Organe einer 5 Wochen alten BALB/c Maus.	52
Abbildung 5:	Charakterisierung der CKI δ Aktivität unterschiedlicher Organe einer 5 Wochen alten BALB/c Maus.	53
Abbildung 6:	Darstellung der CKI δ Aktivität unterschiedlicher Organe einer 5 Wochen alten BALB/c Maus im Balkendiagramm.	53
Abbildung 7:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in Gefrierschnitten (A) und in paraffineingebettetem Gewebe (B).	56
Abbildung 8:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ der quergestreiften Skelettmuskulatur einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.	61
Abbildung 9:	Nachweis der Spezifität der CKI δ Immunoreaktivität im Hoden einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.	62
Abbildung 10:	Reduktion der CKI δ Immunoreaktivität durch kompetitive Hemmung im Pankreasgewebe einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. (A):	64
Abbildung 11:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ der Lunge einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.	67
Abbildung 12:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ im Thymus einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	69
Abbildung 13:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in der Milz einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	70
Abbildung 14:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in einem regionären Lymphknoten der Speicheldrüse einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.	71
Abbildung 15:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in einem Peyerschen Plaque des Dünndarms einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	71
Abbildung 16:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ der Speicheldrüsen einer 5 Wochen alten BALB/c Maus.	73
Abbildung 17:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ im exokrinen Anteil des Pankreas einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	74
Abbildung 18:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in der Leber mit unterschiedlichen Fixierungslösungen und Fixierungsmethoden.	76
Abbildung 19:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ des Ösophagus einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.	78
Abbildung 20:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ des Magens einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.	79

Abbildung 21:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ des Dünndarms einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.	80
Abbildung 22:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ des Dickdarms einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	81
Abbildung 23:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in einem Nierenkörperchen einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	84
Abbildung 24:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in der Harnblase einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.	85
Abbildung 25:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in verschiedenen Stadien der Follikelreifung des Ovars einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	86
Abbildung 26:	Immunhistochemischer Nachweis der CKI δ Expression im Uterus einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.	87
Abbildung 27:	Immunhistochemischer Nachweis der CKI δ Expression in der Vagina einer 6 Wochen alten BALB/c Maus (siehe S.87)..	88
Abbildung 28:	Immunhistochemischer Nachweis der CKI δ Expression im Hoden einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	89
Abbildung 29:	Immunhistochemischer Nachweis der CKI δ Expression im Nebenhoden (Ausschnitt aus dem Kopfbereich) einer 5 Wochen alten BALB/c Maus.	90
Abbildung 30:	Immunhistochemischer Nachweis der CKI δ Expression in der Prostata einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.	92
Abbildung 31:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in der Hypophyse einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	95
Abbildung 32:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in den Nervenzellen des Nucleus supraopticus einer 5 Wochen alten BALB/c Maus.	96
Abbildung 33:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ der Schilddrüse einer 5 Wochen alten BALB/c Maus.	97
Abbildung 34:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ der Nebenschilddrüse einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.	98
Abbildung 35:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ der Nebenniere einer 6 Wochen alten, männlichen BALB/c Maus.	99
Abbildung 36:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in den Langerhansschen Inseln des Pankreas einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	101
Abbildung 37:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in einem Spinalganglion einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	103
Abbildung 38:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ des Kleinhirns einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	105
Abbildung 39:	Immunhistochemischer Nachweis von CKI δ in den Schichten des Großhirns einer 4 Wochen alten BALB/c Maus..	106
Abbildung 40:	Bindungsstellen der Antikörper NC10, 108, ab10877 (Abcam).	112
Abbildung 41:	Spezifitätsnachweis der CKI δ spezifischen Antikörper.	113

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	In der Literatur beschriebene <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Substrate der CKI-Familie (aus:(Knippschild et al., 2005))	13
Tabelle 2:	Reagenzien der maschinellen Einbettung, sowie deren Einwirkdauer und Temperatur	42
Tabelle 3:	Verwendete Blockierungslösungen und deren Handhabung	46
Tabelle 4:	Unterschiedliche Demaskierungslösungen und deren Handhabung.	48
Tabelle 5:	Reduktion der Hintergrundreaktivität an Gefrierschnitten durch unterschiedliche Blockierungsreagenzien.	55
Tabelle 6:	Gewebefixation: Vergleich verschiedener Fixierungslösungen, sowie verschiedener Fixierungsmethoden.	58
Tabelle 7:	Hitzeinduzierte Demaskierung in der Mikrowelle mit verschiedenen Demaskierungslösungen.	60
Tabelle 8:	CKI δ Expression in Geweben des Herz-Kreislauf-Systems, sowie in den unteren Atemwegen.	66
Tabelle 9:	CKI δ Expression in den lymphatischen Organen sowie im darmassoziierten lymphatischen Gewebe.	68
Tabelle 10:	CKI δ Expression in den Anhangsdrüsen des Verdauungskanal.	72
Tabelle 11:	CKI δ Expression im Ösophagus sowie in den Organen des Magen-Darm-Traktes.	77
Tabelle 12:	CKI δ Expression in den Organen des Urogenitalsystems.	83
Tabelle 13:	CKI δ Expression in den Endokrinen Drüsen.	93
Tabelle 14:	CKI δ Expression in den Zellen des Nervensystems.	102

10 Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten

- Name: Nadine Huber
- Anschrift: Waldstr. 25
64750 Lützelbach
Tel.: 06165 / 3600
- Geburtstag: 29. Januar 1973
- Geburtsort: Erbach im Odw.
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Familienstand: ledig

Schulausbildung:

- 1979 – 1983 Grundschole Lützelbach
- 1983 – 1990 Hermann-Staudinger Gymnasium, Erlenbach a. M.
- 1990 – 1991 Highschool, Neapawa, Canada
- 1991 – 1993 Hermann-Staudinger Gymnasium, Erlenbach a. M.
Abschluss: Abitur

Studium:

- April 1994 – Sept. 1994 Ökotoophologie an der Justus-Liebig Universität, Gießen
- Okt. 1994 – Nov. 2003 Humanmedizin an der Universität in Hamburg
Frühjahr 1998 ärztliche Vorprüfung
Frühjahr 2000 1ster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Frühjahr 2002 2ter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Herbst 2003 3ter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Praktisches Jahr Aug. 2002 bis Jul. 2003

Beruf

- seit Dez. 2003: Angestellt am Universitätskrankenhaus Ulm, in der Abteilung für Viszeral und Transplantationschirurgie bei Fr. Prof. Dr. D. Henne-Bruns als Assistenzärztin
- ab Feb. 2006 Angestellt an der University of Cincinnati, Department of Surgery, Director of Laboratory Research: A.B. Lentsch, Ph.D. Associate Professor

Ulm, den

(Nadine Huber)

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Prüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ulm, den 25.01.2006

(Nadine Huber)

Danksagung

Mein erster Dank geht an Frau Prof. Dr. Doris Henne-Bruns sowie an Prof. Dr. Wolfgang Deppert, die mir die Möglichkeit geschaffen haben diese Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Uwe Knippschild für die Überlassung des Dissertationsthemas. Sein stetes Interesse am Vorankommen der Arbeit, die anregenden Diskussionen sowie das unglaublich zügige Korrekturlesen, haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Einen Dank möchte ich auch an Dr. J. Löhler richten, für die kompetente Betreuung in immunhistochemischen Angelegenheiten. So konnte ich in dieser Zeit nicht nur von seinem unschätzbaren Wissen profitieren, er verstand es auch mich für die Histopathologie zu begeistern. Eine Begeisterung die bis heute geblieben ist.

Karin Heigl, die mir nicht nur all die technischen Handgriffe und Tricks beigebracht hat, sondern in allen Lebenslagen ein wertvoller Ansprechpartner war, möchte ich herzlich danken. Nadine Süßner danke ich nicht nur für den technischen Support, sondern auch für die schöne Zeit die wir miteinander hatten.

Allen Mitarbeitern des Heinrich-Pette-Instituts sowie der Forschungsabteilung Chir.I, die mir ein freundliches und fruchtbares Arbeitsumfeld geschaffen und aufrechterhalten haben, danke ich herzlich.

Herzlich gedankt sei auch allen, die die letzten Wochen vor Abgabe mit mir durchgestanden haben. Georgios Giamas *who gave me shelter and a home and showed me what the word friendship means*. Milena Koleva, die mir geholfen hat schwierige Situationen zu meistern und dennoch den Spaß an der Wissenschaft und dem ganzen Rest nicht zu verlieren. Martin Stöter für unzählige nächtliche Diskussionen, wertvolle Anregungen und Kritiken, die kleinen sowie die **GROSSEN** Denkanstöße und den unermüdlichen Einsatz. Thorsten Eismann, der mir tatkräftig zur Seite stand, mich immer wieder anspornte und mich nicht nur mit ständig neuen Ideen überraschte, sondern auch eine unglaubliche Geduld in dieser Zeit bewiesen hat. Und dafür, dass er da war als es am Nötigsten war. Danke für diese enorme Hilfestellung und für Eure Freundschaft!

Ein Dankeschön an meine Familie für die Unterstützung, das Verständnis und dass sie immer für mich da sind.