Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Chirurgie

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universität Ulm

(Ärztliche Direktorin: Prof. Dr. med. Doris Henne-Bruns)

Expression und Lokalisation der Casein Kinase Iε (CKIε) in Organen der Maus sowie Nachweis von Expressionsveränderungen der Casein Kinase Iε in Tumoren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Anja Christina Utz

geboren in Ellwangen/Jagst

2009

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Knippschild
2. Berichterstatter:	PD Dr. Leithäuser
Tag der Promotion:	07.05.2010

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III
1 EINLEITUNG 1
1.1 Signaltransduktion 1
1.2 Das humane Kinom 2
1.3 Die CKI-Familie 3
1.3.1 Konsensussequenz und Substratspezifität 5
1.3.2 Regulation der Expression und Aktivität von CKI 8
1.3.3 Funktionen von CKI 10
1.3.4 Beteiligung von CKI an der Entstehung von Krankheiten 14
2 FRAGESTELLUNG 18
3 MATERIAL UND METHODEN 20
3.1 Mausstämme 20
3.2 Patientenkollektiv 20
3.3 Antikörper 21
3.4 Chromogen-Substrate 22
3.5 Chemikalien und Reagenzien 22
3.6 Kits und Verbrauchsmaterialien 24
3.7 Geräte 25
3.8 Immunhistochemische Methoden 28
3.8.1 Silanisierung der Objektträger 28
3.8.2 Fixierung des Gewebes und Herstellung der Schnittpräparate 28
3.8.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) 31
3.8.4 Immunhistochemische Färbungen 32
3.9 Proteinbiochemische Methoden 36
3.9.1 Herstellung von Proteinlysaten 36
3.9.2 Konzentrationsbestimmung und Angleich der Protein-konzentration in den Lysaten 37
3.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 37
3.9.4 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue 38
3.9.5 Transfer von Proteinen auf Membranen 39

3.9.6 Immundetektion (Western Blot-Analyse) 39
3.9.7 Visualisierung durch Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Reaktion 40
4 ERGEBNISSE 42
4.1 Charakterisierung der Expression von CKIε in verschiedenen Mausorganen durch Western Blot-Analyse 42
4.2 Nachweis von CKIε in Gewebeschnitten der Maus 43
4.2.1 Nachweis von CKIε in Gefrier- und Paraffinschnitten 43
4.2.2 Nachweis der Expression von CKIε in Paraffinschnitten 46
4.2.3 Lokalisation von CKIε in den Organen der Maus 49
4.2.4 Expressionsunterschiede zwischen CKIδ und CKIε 99
4.3 Expression von CKIε in Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe 101
4.3.1 Expression von CKIε im duktalen Mammakarzinom in Mäusen 101
4.3.2 Expression von CKIε im humanen kolorektalen Karzinom 104
5 DISKUSSION 108
5.1 Expression von CKIε in unterschiedlichen Organen 108
5.2 Mögliche Rolle von CKIε im Muskelgewebe 109
5.3 Mögliche Rolle von CKIε im Immunsystem 110
5.4 Mögliche Rolle von CKIε in sekretorischen Prozessen 112
5.5 Mögliche Rolle von CKIε in hormonellen Prozessen 114
5.6 Mögliche Rolle von CKIε im neuronalen Informationsaustausch 116
5.7 Mögliche Rolle von CKIε in Zellumsatzprozessen 117
5.8 Mögliche Ursachen für Expressionsunterschiede zwischen CKIδ und CKIε 119
5.9 Mögliche Rolle von CKIε in der Entstehung des Mammakarzinoms 121
5.10 Mögliche Rolle von CKIε in der kolorektalen Karzinogenese 123
5.11 Zusammenfassende Schlussfolgerung 124
6 ZUSAMMENFASSUNG 125
7 LITERATURVERZEICHNIS 127
8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 142
9 TABELLENVERZEICHNIS 146
10 ANHANG 148

Abkürzungsverzeichnis

µ	Mikro
°C	Grad Celsius
A	Alanin
ACC	Adenoid Cystic Carcinoma
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AGC	PKA-, PKG-, PKC-Familie enthaltende Kinasegruppe
AP	Adapter-related protein complex
APC	Adenomatous polyposis coli
APP	Amyloid precursor protein
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	2,2'-Bichinolon-4,4'-dicarbonsäure
Bid	BH3 Domäne – only death agonist protein
BMAL	Brain and Muscle Arnt-like protein
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cystein
C-	Carboxy-
CAMK	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
Caspase	Cysteinprotease mit Aspartatspezifität
CDK	Cyklin-abhängige Kinase
CK	Casein Kinase

CKI	Casein Kinase 1
CKII	Casein Kinase 2
CLK	Cdc2-like Kinase
CMGC	CDK-, MAPK-, GSK3-, CLK-Familie enthaltende Kinasegruppe
c-myc	zelluläres Homolog vom Avian myelocytomatosis Virus Onkogen
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CPI-17	Protein-kinase C-potentiated myosin phosphatase inhibitor of 17kDa
CREM	cAMP responsive element modulator
CRY	Cryptochrome 1
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DARPP-32	Dopamine-and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa
DCC	Deleted in colorectal carcinoma
DCIS	Duktales in situ Karzinom (duktales Carcinoma in Situ)
dH_2O/ddH_2O	destilliertes Wasser/bidestilliertes Wasser
DISC	Death inducible signaling complex
DMCK1	*Drosophila melanogaster* Casein Kinase 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNES	Diffuses neuroendokrines System
DR	Death receptor
Dsh	Dishevelled-Protein
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure

ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis2(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ENS	Enterisches Nervensystem
F	Phenylalanin
FADD	Fas-associated protein with death domain
Fas	TNF receptor superfamily member 6
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
G	Grad (Tumorstadium)
GH	Growth hormone (Wachstumshormon)
GS	Gefrierschnitt
GSK	Glykogensynthasekinase
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEV	Hohe endotheliale Venolen
His	Histidin
h-prune	humanes Homolog des *Drosophila* prune protein
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICC	Interstitielle Zellen von Cajal
IF	Initiation factor
IgG	Immunglobulin G

IHC	Immunhistochemie
IHC-G	Immunhistochemie an Gefrierschnitten
IHC-P	Immunhistochemie an Paraffinschnitten
IκBα	NF-kappa B Inhibitorprotein
k	Kilo
K	Lysin
K/R	Lysin/Arginin-Rest
K-ras	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
l	Liter
L	Leucin
Lef	Lymphoid enhancer-binding factor
LH	Luteinisierendes Hormon
LRP6	Low Density Lipoprotein related receptor protein 6
m	Milli
m	Meter
M	Molar (mol/l)
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mdm2	Murine doule minute 2
Mdm4	Murine doule minute 4
mPER	Mammalian period circadian protein
mt	Mutante
MTA1s	Metastatic Tumor Antigen 1, short form
n	nano

N-	Amino-
N_2	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm23-H1	Nonmetastatic Protein 23, Homolog 1
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP-40	Nonidet P40
OD	Optische Dichte
OREBP	Osmotic response element-binding protein
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDGF	Plateled-derived growth factor
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration der Wasserstoffionen
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PML	Promyeloisches Leukämieprotien
PNS	Peripheres Nervensystem
PP	Phosphoproteinphosphatase
PPA	Proteinphosphatase A

pRb	Retinoblastom-Suppressorprotein
PS	Paraffinschnitt
Q	Glutamin
R	Arginin
RGC	Rezeptorguanylatzyklasekinase
RIP1	Receptor interacting protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Serin
S/T	Serin/Threonin-Rest
S/T(P)	phosphorylierter Serin/Threonin-Rest
SCS	Sufatid und Cholesterol-3-Sulfat
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
Smad	Contraction of Sma and Mad
SNARE	Soluble N-ethylmaleimid attachment protein receptor
STE	Homologe der Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 Kinasen der Hefen
Str.	Stratum
SV	Simian Virus
T	Threonin
T-Ag	großes Tumorantigen von Simian Virus 40
t-AG	kleines Tumorantigen von Simian Virus 40
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
Tcf	T-Zell-Faktor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Thr	Threonin
TK	Tyrosinkinase
TKL	Tyrosinkinase-like Kinase
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
V	Valin
V	Volt
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
Vergr.	Vergrößerung
w/v	Masse pro Volumen
WAP	Whey acidic protein
WB	Western Blot
WHO	World Health Organisation
Wnt	wingless-type mouse mammary tumour virus intergration site family
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin
YCK	Yeast Casein Kinase
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Signaltransduktion

Die zelluläre Signaltransduktion ist ein komplexes Kommunikationssystem, über die zelluläre Basisaktivitäten und Zellfunktionen reguliert und koordiniert werden. Die Fähigkeit der Zellen, Signale aus ihrer Umwelt zu empfangen und auf diese durch spezifische Reaktionen zu antworten, ist Grundlage für die Embryonalentwicklung und für einen gesunden adulten Organismus.

Die Zellen können über direkten Kontakt (juxtakrin), über kurze Entfernungen (parakrin) und auch über weite Entfernungen (endokrin) durch Botenstoffe miteinander kommunizieren.

Am Informationsaustausch ist eine Vielzahl verschiedener Signalkomponenten beteiligt. Der größte Teil davon sind Proteine, wie Zelloberflächenrezeptoren, intrazelluläre Rezeptoren, Proteinkinasen- und Phosphatasen, GTP-bindende Proteine und eine Menge mit diesen Komponenten wechselwirkende intrazelluläre Proteine. Die in den Zielzellen aktivierten Signalübertragungskaskaden sind häufig ähnlich oder gar identisch. Der Botenstoff bindet an der Zielzelle an ein spezifisches Rezeptorprotein, was wiederum eine Kaskade molekularer Veränderungen und letztlich eine spezifische Antwort in der Zielzelle auslöst (Cohen 2002; Hunter 1995).

In den vergangenen Jahrzehnten wurden zahlreiche Signaltransduktionswege genau charakterisiert und viele daran beteiligte Signalkomponenten identifiziert. Für eine problemlose Funktion dieses komplexen Signalnetzwerks muss es möglich sein, die Signaltransduktionskaskaden über ihre diversen Komponenten rasch zu regulieren.

Eine wichtige Rolle in diesem zellulären Informationsaustauschsystem kommt deshalb den Proteinkinasen und Proteinphosphatasen zu. Sie sind in der Lage, durch reversible Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen diese kurzfristig in ihrer Stabilität, Aktivität, ihrer Interaktionsfähigkeit und ihrer subzellulären Lokalisation zu verändern, was eine besonders rasche intrazelluläre Signaltransduktion möglich macht (Cohen 2002; Hunter 1995).

1.2 Das humane Kinom

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen durch Proteinkinasen spielt eine wesentliche Rolle bei fast allen zellulären Abläufen und Funktionen. Dies wird auch dadurch verdeutlicht, dass ungefähr 30% der vom menschlichen Genom kodierten Proteine phopshoryliert vorliegen (Cohen 2002).
Das gesamte menschliche Genom enthält 518 mutmaßliche Proteinkinasegene. Von all diesen humanen Proteinkinasen wurden 40 als atypisch identifiziert. Von den eukaryoten Proteinkinasen sind nur 90 Tyrosinkinasen (TK), während der größte Teil zu den Serin/Threonin-Kinasen gehört (Manning et al. 2002).

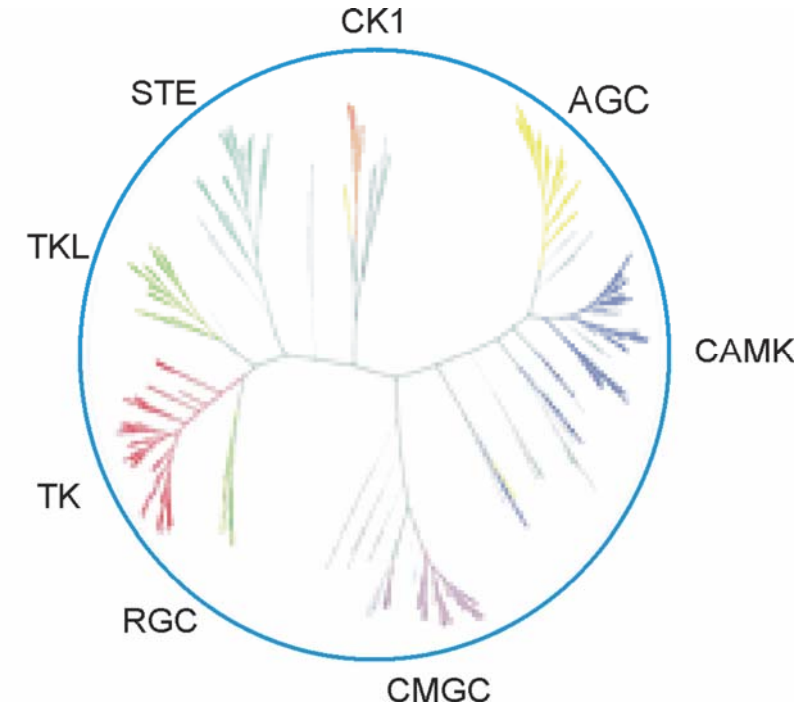


Abbildung 1: Das humane Kinom. Dendrogramm von 491 eukaryotischen Proteinkinasedomänen aus 478 Genen, eingeteilt in 8 Hauptgruppen: CK1 (Casein Kinasen I), AGC (PKA-, PKG-, PKC-Familie enthaltende Kinasegruppe), CAMK (Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen), CMGC (CDK-, MAPK-, GSK3-, CLK-Familie enthaltende Kinasegruppe), RGC (Rezeptorguanylatzyklasekinasen), TK (Tyrosinkinasen), TKL (Tyrosinkinasen-like Kinasen), STE (Homologe der Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 Kinasen der Hefen) (aus: (Manning et al. 2002)).

Die Casein Kinasen (CK) gehören zu den ersten in der Literatur beschriebenen Kinasen. Es handelt sich dabei um Serin/Threonin-Kinasen, die *in vitro* das Phosphoprotein Casein als Substrat bevorzugen, was ansonsten für Serin/Threonin-Kinasen nicht üblich ist. Casein ist kein physiologisches Substrat der Casein Kinasen, sondern diese spezifische Eigenschaft erklärt sich aus der

Fähigkeit dieser Kinasen, saure und/oder phopsphorylierte Seitenketten eher zu erkennen, als basische Seitenketten oder Prolylseitenketten. Die meisten Casein Kinasen lassen sich entweder den Casein Kinasen I (CKI) oder den Casein Kinasen II (CKII) zuordnen. Die CKI-Familie bildet eine eigene phylogenetische Proteinkinasefamilie, die CKII-Kinasen gehören zur Gruppe der CMGC- Proteinkinasen (Brunati et al. 2000).

1.3 Die CKI-Familie

Die CKI-Familie ist von der Hefe bis hin zum Menschen hochkonserviert. Zu dieser Familie gehörende Kinasen kommen in allen eukaryotischen Zellen vor (Gross and Anderson 1998). Für Säugetiere wurden bisher sieben verschiedene CKI-Isoformen charakterisiert (α, β, γ1, γ2, γ3, δ und ε), die voneinander unabhängig genetisch kodiert werden (Fish et al. 1995; Graves et al. 1993; Rowles et al. 1991; Wang et al. 1996; Zhai et al. 1995). Zudem wurden von den Isoformen CKIα, CKIγ3 und CKIε Varianten beschrieben, welche durch alternatives Spleißen entstehen (Green and Bennett 1998; Rowles et al. 1991; Takano et al. 2004; Tapia et al. 1994; Wang et al. 1996; Zhang et al. 1996).
In anderen Spezies wurden weitere Proteinkinasen, die Homologie zu CKI aufweisen, identifiziert. So wurden beispielsweise in Hefen Kinasen beschrieben, die in der katalytischen Domäne eine Homologie von über 50% zu den CKI-Isoformen der Säuger aufweisen. Diese sind die in *Saccharomyces cervisiae* gefundenen HRR25, YCK1, YCK2 und YCK3, sowie die in *Saccharomyces pombe* entdeckten Cki1, Cki2, Hhp1 und Hhp2 (DeMaggio et al. 1992; Dhillon and Hoekstra 1994; Hoekstra et al. 1991; Kearney et al. 1994; Robinson et al. 1992; Wang et al. 1992; Wang et al. 1996). Weitere Beispiele für CKI-Homologe in anderen Spezies sind die in *Drosophila melanogaster* identifizierte, zu CKIα homologe Proteinkinase DMCKI (Santos et al. 1996) oder die im Zebrafisch nachgewiesenen Homologe zu CKIε (genannt csnk1e), CKIδ (genannt csnk1d-a und csnk1d-b) und CKIγ2 (genannt csnk1g2) (Albornoz et al. 2007).

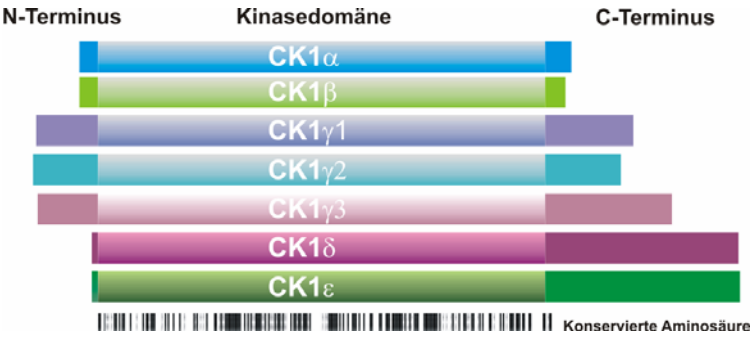


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Casein Kinase I (CKI)-Isoformen der Säuger. Die zentral gelegene Kinasedomäne wird von den variablen N- und C-Termini umfasst.

Die CKI-Isoformen besitzen alle eine zentral gelegene Kinasedomäne, welche in ihrer Aminosäuresequenz konserviert ist und von einem kurzen, variablen N-Terminus und einem längeren, variablen C-Terminus flankiert wird.

In ihrer Aminosäuresequenz innerhalb der katalytischen Domäne sind die einzelnen CKI-Isoformen untereinander zwischen 52% und 98% homolog, während sie mit anderen Serin/ Threonin-Kinasen in ihrer Sequenz zu weniger als 21% identisch sind. Die engste Verwandtschaft besteht zwischen den beiden CKI-Isoformen CKIδ und CKIε, die in der katalytischen Domäne eine Homologie von 98% aufweisen (Graves et al. 1993; Gross and Anderson 1998; Zhai et al. 1995).

Die Länge des N-Terminus der CKI-Isoformen beträgt 9–76 Aminosäuren. Der C-Terminus variiert wesentlich stärker und ist zwischen 24 und mehr als 200 Aminosäuren lang (Cegielska et al. 1998). Auf diese hohe Variabilität sind auch die stark unterschiedlichen Molekulargewichte der CKI-Isoformen zurückzuführen, die bei den Isoformen der Säuger zwischen 37kDa (CKIα) und 51kDa (CKIγ3) liegen. Bei den etwas größeren CKI-Homologen der Hefen divergieren die Molekulargewichte von 42kDa (Hhp1, Hhp2) bis 62kDa (HRR25).

1.3.1 Konsensussequenz und Substratspezifität

Die CKI-Isoformen bevorzugen saure oder bereits phosphorylierte Proteine als Substrate. Diese Substratspezifität ist auf die Konzentration positiver Ladungen um die Substratbindungsstelle in der dreidimensionalen CKI-Kinasedomäne zurückzuführen (Longenecker et al. 1996; Roach and Wang 1991). Das Motiv S/T(P)-X-X-S/T bildet die kanonische Konsensussequenz für CKI. Dabei steht S/T(P) für einen phosphorylierten Serin- oder Threoninrest, X steht für eine beliebige Aminosäure. Indem der erste Serinrest phosphoryliert wird, kann eine Erkennungssequenz für die nächste Phosphorylierungsstelle geschaffen werden. In der sich wiederholenden Sequenz wird somit eine fortschreitende Phosphorylierung möglich (dargestellt in Abbildung 3). Die Konsensussequenz mit den phosphorylierten Resten wird jedoch nicht immer für eine effiziente Phosphorylierung durch CKI benötigt. Es wurde gezeigt, dass das Phosphoserin oder Phosphothreonin in diesem Motiv durch eine Ansammlung negativ geladener Aminosäurereste an der -3 Position ersetzt werden kann (Agostinis et al. 1989; Flotow et al. 1990; Graves et al. 1993). Ansammlungen von Aspartat- und/ oder Glutamatresten können bei der Phosphorylierung des Protein-Phosphatase 1 Inhibitors-2 (Marin et al. 1994) und von DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa) (Desdouits et al. 1995) durch CKI als spezifische Determinanten agieren.

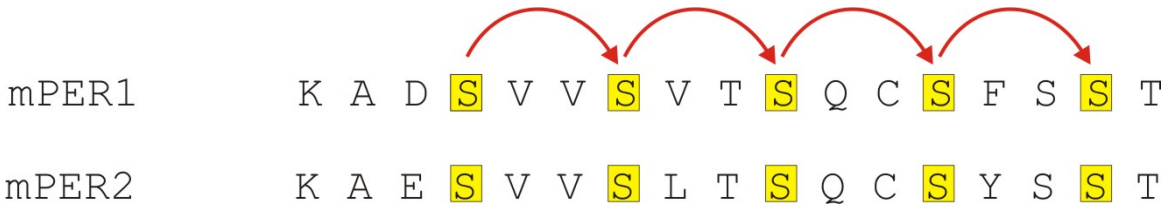


Abbildung 3: Kanonische Konsensussequenz für Casein Kinase I (CKI). Kanonische Konsensussequenzen für CKI werden gebildet durch das sich wiederholende S/T(P)-X-X-**S/T** Motiv. In der Abbildung ist exemplarisch die Konsensussequenz der Proteine Mammalian period circadian protein (mPER) 1 und mPER2 angegeben, welche den zirkadianen Rhythmus regulieren (Okamura et al. 2004b).

CKI ist auch in der Lage, *in vivo* Substrate zu erkennen, die eine nicht-kanonische Konsensussequenz enthalten. So wird das SLS-Motiv, das auch die CKI-Substrate ß-Catenin und Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT) enthalten, in Kombination mit einer Anhäufung saurer Aminosäurereste, die C-terminal der

Phosphoakzeptorstelle liegen, durch CKI erkannt (Marin et al. 2003). Es wurde zudem nachgewiesen, dass die Substratphosphorylierung durch CKI und dessen Substratspezifität neben der kanonischen Konsensussequenz und der lokalen Struktur der Phosphoakzeptorstelle auch von der dreidimensionalen Struktur des Substrats beeinflusst wird (Cegielska et al. 1998). Außerdem wurde kürzlich in einigen Sulfatid und Cholesterol-3-Sulfat (SCS)-bindenden Proteinen, sowie in drei CKI-Isoformen (ε, δ, γ) eine neue Konsensussequenz für CKI (K/R-X-K/R-X-X-S/T) entdeckt. Es wird vermutet, dass SCS-bindende Proteine bei einer starken Akkumulation von SCS bevorzugt durch die drei Isoformen CKIα, CKIδ und CKIε phosphoryliert werden (Kawakami et al. 2008).

In den vergangenen Jahren konnte eine große Anzahl von Proteinen als CKI-Substrate identifiziert werden und ihre Zahl steigt immer weiter an. Der Tabelle 1 ist zu entnehmen, dass es sich bei diesen Proteinen um verschiedene, vor allem auch intrazelluläre Proteine mit unterschiedlichen Funktionen handelt, was für eine Beteiligung von CKI an einer Vielzahl zellulärer Prozesse spricht. Die Mehrheit der in der Tabelle dargestellten Proteine sind *in vitro* Substrate. Die physiologische Relevanz der meisten Substrate konnte bisher nicht genau geklärt und charakterisiert werden.

Tabelle 1: In der Literatur beschriebene *in vitro* und *in vivo* Substrate der Casein Kinase I (CKI)-Familie (zur Übersicht: (Knippschild et al. 2005)).

Funktionelle Gruppen	CKI-Substrate
Proteine des Cytoskeletts und Interaktionsproteine	Myosin, Troponin, Ankyrin, Spektrin 3, Filamin, Vinculin, neurofilamentäre Proteine, Dynein, α-/β-Tubulin, Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) 4, Stathmin, Tau, Keratin 17, Desmolein, Annexin II, Centaurin-α
Adhäsionsfaktoren	NCAM (Neural cell adhesion molecule)
Membrantransporter	Erythrozyten-Anionen-Transporter, Uracil-Permease (*S. cerevisiae*)
DNA-assoziierte Faktoren und Enzyme	Non-Histon Chromatin-Proteine, Topoisomerase IIα (Grozav et al. 2008)
Ribosomale Proteine	15 kDa, 20 kDa, 35 kDa, L4, L8, L13

Rezeptoren	β-Untereinheit des Tubulin-Rezeptors, Tumornekrosefaktor (TNF) α-Rezeptor, Muscarin M3-Rezeptor, Ste2p (α-Faktor-Rezeptor), Ste3p (α-Faktor-Rezeptor), Plateled-derived growth factor (PDGF)-Rezeptor, Retinoid X Rezeptor Low Density Lipoprotein related receptor protein (LRP) 6 (Davidson et al. 2005; Zeng et al. 2005)
Transkriptions- und Splicefaktoren	RNA-Polymerase I und II, p53, CREM (cAMP responsive element modulator), NFAT (Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen), T-Zell-Faktor (Tcf) 3, BMAL1 (Brain and Muscle Arnt-like protein 1), CRY (Cryptochrome 1), β-Catenin, Armadillo (Bustos et al. 2006), OREBP (Osmotic response element-binding protein) (Xu et al. 2008)
Translationsfaktoren	Initiation factor (IF) 4B, 4E, 5
virale Proteine	Simian Virus (SV) 40 T-Ag (großes Tumorantigen), SV40 t-Ag (kleines Tumorantigen)
Kinasen	Cyklin-abhängige Kinase (CDK) 5, Proteinkinase C (PKC)
Metabolische Enzyme	Acetyl-CoA Carboxylase, Glycogen-Synthase
Vesikel-assoziierte Proteine	SV2, β3A- und β3B-Untereinheit des AP-3 Komplexes, Snapin (Wolff et al. 2006)
Rezeptor-assoziierte Proteine	FADD (Fas-associated protein with death domain) (Alappat et al. 2005)
Signaltransduktionsmoleküle	Smad 1-3 und 5

Inhibitoren und Modulatoren	Inhibitor 2 von Proteinphosphatase A (PPA) 1, DARPP-32 (Dopamine-and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa), IκBα (NF-kappa B Inhibitor-protein); Dishevelled, 14-3-3 Proteine, mPER (Mammalian period circadian protein), APC (Adenomatous polyposis coli), Bid (BH3 Domäne–only death agonist protein), CPI-17 (Protein-kinase C-potentiated myosin phosphatase inhibitor of 17kDa), RIP1 (Receptor interacting protein 1) (Wang et al. 2008)
Regulatorproteine	Murine doule minute (Mdm) 2 (Winter et al. 2004), Mdmx (Chen and Deng 2005)
Faktoren der Alzheimer Erkrankung	Presenilin-2, Tau, β-APP (β-Amyloid precursor protein), β-Sekretase, γ-Sekretase (Flajolet et al. 2007)
Metastatische Tumor-Antigene	MTA1s (Metastatic Tumor Antigen 1, short form)

1.3.2 Regulation der Expression und Aktivität von CKI

Die Mitglieder der CKI-Familie sind konstitutiv aktiv. Sie können als aktive Enzyme aus diversen Organismen, Geweben und Zelllinien isoliert werden (Tuazon and Traugh 1991). Dessen ungeachtet konnten verschiedene Effektoren identifiziert werden, die in der Lage sind, die Aktivität von CKI *in vivo* und *in vitro* zu beeinflussen. So führt die Stimulation von Zellen durch Insulin (Cobb and Rosen 1983) oder durch virale Transformation (Elias et al. 1981) ebenso zu einer gesteigerten CKI-Aktivität, wie die Behandlung von Zellen mit

Topoisomerase-Inhibitoren (Knippschild et al. 1997) oder deren Bestrahlung mit γ-Strahlung (Santos et al. 1996).

Für die Regulation der Interaktion zwischen Kinase und Substrat spielt die subzelluläre Lokalisation und Kompartimentierung der CKI-Isoformen eine entscheidende Rolle. So konnte in Hefen gezeigt werden, dass CKI durch die subzelluläre Lokalisation in Substratnähe gebracht wird, wodurch die Funktion von CKI reguliert wird (Ho et al. 1997; Vancura et al. 1994; Wang et al. 1992).

Eine andere Möglichkeit, CKI mit Modulatoren oder Substraten zusammenzubringen, ist die Sequestrierung der Kinasen an intrazelluläre Strukturen oder Proteinkomplexe (Sillibourne et al. 2002).

Darüber hinaus ergaben Studien zum zirkadianen Rhythmus in Mäusen, dass die nukleäre Lokalisation von CKIδ und CKIε tageszeitlich reguliert wird (Lee et al. 2001a).

Ein weiterer Mechanismus, über den die Aktivität von CKI verändert wird, erfolgt über posttranslationale Modifikation und zwar in erster Linie durch Phosphorylierung. Insbesondere wurde für CKIδ, CKIε und CKIα Autophosphorylierung nachgewiesen, die mit einer Abschwächung der Aktivität einhergeht (Budini et al. 2008; Cegielska et al. 1998; Graves and Roach 1995). Für CKIδ und CKIε wurde gezeigt, dass diese inhibitorische Autophosphorylierung vor allem im Bereich des C-Terminus stattfindet. Der inhibitorische Effekt der Autophosphorylierung kann jedoch überwunden werden. So wurde beschrieben, dass die proteolytische Abspaltung des C-Terminus und somit der autoinhibitorischen Domäne *in vitro* zu einer bis zu zwanzigfachen Aktivitätssteigerung führt (Gietzen and Virshup 1999). Auch *in vivo* findet eine Autophosphorylierung dieser Kinasen statt. Diese wird allerdings relativ rasch wieder rückgängig gemacht, da es durch endogene Proteinphosphatasen zu einer raschen Dephosphorylierung kommt, wodurch die Aktivität von CKIδ und CKIε aufrechterhalten wird (Carmel et al. 1994; Rivers et al. 1998).

Röntgenkristallographische Untersuchungen lieferten einen Hinweis darauf, dass die dreidimensionale Struktur von CKIδ ebenfalls eine Rolle in der Aktivitätsregulation spielt. So wurde aus den Untersuchungsergebnissen abgeleitet, dass CKIδ als Dimer kristallisiert und dass diese Dimerisierung zu einer

Hemmung der Kinaseaktivität führt (Longenecker et al. 1998). Dieses Modell konnte bisher jedoch durch keine biochemische Studie bestätigt werden.
Eine konzentrationsabhängige Inhibition von CKI konnte aber für die Interaktion von CKI mit zellulären Proteinen wie Dysbindin nachgewiesen werden (Yin et al. 2006).

1.3.3 Funktionen von CKI

Das große Spektrum der CKI-Substrate, die eine Vielzahl an Funktionen in zellulären Prozessen haben, zeigt die Bedeutung und die Beteiligung der CKI-Isoformen an zahlreichen physiologischen Prozessen.
Studien an Hefen haben gezeigt, dass die CKI-Homologen der Hefen sowohl bei der Regulation von Membrantransportprozessen (Murakami et al. 1999; Panek et al. 1997), als auch bei vegetativem Wachstum, bei der Zytokinese (Robinson et al. 1993), beim Vesikeltransport (Vancura et al. 1994; Wang et al. 1996) und bei DNA-Reparatur-Signalwegen (Hoekstra et al. 1994) beteiligt sind.
In den Zellen höherer Eukaryoten wurde die subzelluläre Lokalisation von CKIα und CKIδ gut charakterisiert. Die beiden CKI-Isoformen interagieren hier mit Membranstrukturen des endoplasmatischen Retikulums, des Golgi-Apparats und des Trans-Golgi-Netzwerks, sowie mit verschiedenen Transportvesikeln (Behrend et al. 2000; Gross et al. 1995; Milne et al. 2001; Yu and Roth 2002). Ihre genaue Funktion in Membrantransportprozessen ist hingegen noch nicht im Detail geklärt.
Die Mitglieder der CKI-Familie konnten außerdem mit dem Soluble N-ethylmaleimid attachment protein receptor (SNARE)-Komplex in Verbindung gebracht werden. Indem sie Proteine dieses Komplexes in neuronalen Zellen phosphorylieren, beeinflussen sie die Regulation von Protein-Protein-Interaktionen und der synaptischen Vesikel-Exozytose (Dubois et al. 2002; Lin and Scheller 2000; Pyle et al. 2000). So wird beispielsweise das Protein Snapin von CKIδ phosphoryliert. Diese Phosphorylierung wiederum scheint auf die Interaktion von Snapin mit Proteinen des SNARE-Komplexes und auch auf die Ausschüttung von Neurotransmittern einen regulierenden Effekt zu haben (Wolff et al. 2006).

Im Striatum und im cerebralen Cortex werden alle CKI-Isoformen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass CKI die über N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren vermittelte glutamaterge synaptische Signalübertragung im Gehirn reguliert. So führt eine Inhibition von CKI zu einer Steigerung der NMDA-Rezeptoraktivität. Daraus ist zu schließen, dass CKI in der durch Glutamat induzierten neuronalen Erregung als negativer Regulator fungiert. In Betracht der zentralen Rolle der NMDA-Rezeptoren in mehreren physiologischen, wie auch pathologischen Prozessen im Striatum und im gesamten zentralen Nervensystem (ZNS), könnte CKI somit ein wichtiges regulatorisches Enzym des neurologischen Normalzustands darstellen, beispielsweise in Bereichen des Bewegungs- und motivationsabhängigen Verhaltens. Eine weitere Funktion von CKI könnte in der Verhinderung einer übermäßigen Aktivierung von NMDA-Rezeptoren durch exzessive glutamaterge Aktivität bestehen (Chergui et al. 2005).

Des Weiteren konnte eine Beteiligung der beiden Isoformen CKIδ und CKIε an Signaltransduktionswegen der zirkadianen Rhythmik nachgewiesen werden. So sind diese beiden Proteine in der Lage, Period-Proteine (mPER1, mPER2, mPER3) zu phosphorylieren (Ebisawa 2007). Dadurch wird die Degradation dieser Proteine und deren Retention im Zytoplasma stimuliert (Vielhaber et al. 2000). Die Phosphorylierung führt letztlich zu einer Kontrolle der Stabilität der Period-Proteine, was wiederum eine Regulation der zirkadianen Periodenlänge bewirkt (Miyazaki et al. 2001). Diese Theorie wird durch die Tatsache gestärkt, dass es beim Hamster durch eine homozygote Defektmutation in CKIε, die eine erhöhte Stabilität der Period-Proteine verursacht, zu einer verkürzten zirkadianen Periode kommen kann (Lowrey et al. 2000). Der übergeordnete Regulator der Aktivität von CKIε ist die Proteinphosphatase 5 (PP5), welche über Dephosphorylierung die CKIε-Aktivität und somit die Phosphorylierung und den Abbau von Period-Proteinen steigern kann (Partch et al. 2006).

Es wird immer deutlicher, dass CKI auch in der Krebsentstehung eine Schlüsselrolle einnimmt. So sind die beiden Isoformen CKIδ und CKIε in der Lage, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo,* das Tumorsuppressorprotein p53 N-terminal zu phosphorylieren (Dumaz et al. 1999; Knippschild et al. 1997). p53 wird durch zellulären Stress, wie zum Beispiel Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schädigung, aktiviert und setzt Signalwege in Gang, die zu Zellzyklusarrest oder Apoptose

führen und letztlich Tumorwachstum verhindern. Auβerdem konnte gezeigt werden, dass es nach genotoxischem Stress zu einer transkriptionellen Aktivierung von CKIδ durch p53 kommt. Man kann somit von einem autoregulatorischen Loop zwischen diesen beiden Proteinen sprechen (Dumaz et al. 1999; Knippschild et al. 1997). Die zellulären Gegenspieler von p53 sind Murine doule minute (Mdm) 2 und Mdm4 (Marine et al. 2006). Die Interaktion mit Mdm2 führt zur Deaktivierung von p53 durch proteasomalen Abbau. Es konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von p53 diese Interaktion schwächt. Die Phosphorylierung kann durch verschiedene Proteine, darunter auch CKI, erfolgen. So führt insbesondere die Phosphorylierung des Threonin18 (Thr18) durch CKI zu einer verminderten Affinität von p53 zu Mdm2 und somit zu einer Stabilisierung von p53. Bei DNA-Schädigung wird diese Stabilisierung von p53 zusätzlich durch das promyeloische Leukämieprotein (PML) positiv beeinflusst. PML unterstützt die Phosphorylierung des Thr18 von endogenem p53 durch CKI (Alsheich-Bartok et al. 2008).

Die CKI-Isoformen sind an verschiedenen, die Apoptose beeinflussenden Signalwegen beteiligt. Im Fall der p75-vermittelten Apoptose wirkt CKI durch die Phosphorylierung des Tumornekrosefaktors p75 negativ regulierend (Beyaert et al. 1995). Insbesondere für CKIα wurde beschrieben, dass sie durch Phosphorylierung von Proteinen des death inducing signaling complex (DISC) eine ausgeprägte Inhibition der Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induzierten Apoptose bewirkt (Izeradjene et al. 2004).

Bei der Fas-vermittelten Apoptose, welche zu einer Aktivierung der Caspase 8 führt, sind vor allem die CKI-Isoformen CKIα, CKIδ und CKIε beteiligt. Hier kommt es durch die Phosphorylierung des proapoptotischen Proteins Bid durch CKI zu einer Apoptosehemmung. Die Phosphorylierung verhindert die proteolytische Prozessierung von Bid, wodurch es nicht zur Aktivierung des Mitochondrien-abhängigen Signalweges kommt (Desagher et al. 2001).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CKIα in der Lage ist, Fas associated protein with death domain (FADD) *in vitro* und auch *in vivo* an Serin (Ser)^{194} C-terminal zu phosphorylieren (Alappat et al. 2005). FADD ist essentiell für die death receptor (DR)-induzierte Apoptose und ist zudem ein wichtiger Faktor in der Zellzyklusprogression, sowie –proliferation, was wiederum

durch die Ser^{194}-Phosphorylierung reguliert wird (Alappat et al. 2003). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass durch die Assoziation von CKIα mit FADD auch die subzelluläre Lokalisation von FADD beeinflusst wird und es ist wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung von FADD durch CKIα große Bedeutung bei der Mitose hat (Alappat et al. 2005).

Neben der Beteiligung an apoptotischen Signaltransduktionswegen haben die CKI-Isoformen, insbesondere CKIα, CKIδ und CKIε, auch diverse Funktionen bei Differenzierungssignalwegen im Rahmen der Wnt-Signalkaskade. Der wingless-type mouse mammary tumour virus intergration site family (Wnt)-Signalweg, der im Zusammenhang mit der Entwicklung der Körperachse bei *Drosophila* entdeckt wurde, gilt als essentieller Regulator in der tierischen Entwicklung und reguliert einige bedeutende zelluläre Prozesse, wie Wachstum, Differenzierung und Positionsbestimmung von embryonalen Zellen oder Proliferations- und Differenzierungsprozesse im ausgereiften Organismus (Huelsken and Birchmeier 2001; McKay et al. 2001; Peifer and Polakis 2000). Durch die Bindung von Wnt-Liganden an die jeweiligen Frizzled-Rezeptoren kommt es zu einer Aktivierung der Wnt-Signalwege. Dadurch wird das zytoplasmatische Multiadaptorprotein Dishevelled (Dsh) phosphoryliert und es kommt zu einer Aufteilung in den kanonischen und den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg (Boutros and Mlodzik 1999).

ß-Catenin nimmt in der Wnt-Signalkaskade eine zentrale Rolle ein. Die Stabilität von ß-Catenin wird durch einen Multiprotein-Komplex reguliert, in dem unter anderem die Proteine ß-Catenin, Glycogen-Synthase-Kinase-3ß (GSK-3ß), das Tumorsuppressor-Protein APC, Dsh und CKIε an das Matrixprotein Axin oder an dessen Homolog Axin/Conductin gebunden sind. Bei Abwesenheit des Wnt-Liganden und somit keiner Aktivierung des Wnt-Signalweges, wird ß-Catenin kontinuierlich N-terminal durch GSK-3ß phosphoryliert, was zur Degradation von ß-Catenin am Proteasom führt (Aberle et al. 1997; Ikeda et al. 1998).

Im kanonischen Wnt-Signalweg inhibiert das aktivierte Dsh den Abbaukomplex und sorgt für eine Stabilisierung und Akkumulation von ß-Catenin im Zytoplasma (Kimelman and Xu 2006). Das zytoplasmatische ß-Catenin wandert schließlich in den Zellkern, wo es durch Bindung an Transkriptionsfaktoren der T-Zell-Faktor/ Lymphoid enhancer-binding factor (Tcf/Lef)-Familie zu einer transkriptionellen

Aktivierung von Zielgenen, wie zum Beispiel c-myc kommt (Behrens et al. 1996; Molenaar et al. 1996).

In nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen sind vor allem die CKI-Isoformen δ und ε für die Phosphorylierung von Dsh von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass dies ein wichtiger Schritt im Wnt-5a-Signalweg ist, der die Differenzierung dopaminerger Neurone induziert (Bryja et al. 2007).

CKI werden sowohl positiv, als auch negativ regulierende Mechanismen in der Wnt-Signalkaskade zugeschrieben. So kann CKIε mit dem Multiprotein-Komplex assoziieren und Dsh durch dessen Phosphorylierung aktivieren. Dadurch wird GSK-3ß inhibiert und ß-Catenin folglich stabilisiert (Peters et al. 1999). Darüber hinaus erfolgt durch CKIε die Aktivierung von Tcf3 und dessen Bindung an ß-Catenin, was wiederum die Bildung eines aktiven Transkriptionskomplexes induziert (Lee et al. 2001b). Andererseits kann CKIε negativ regulierend wirken, indem es ß-Catenin an Ser^{45} phosphoryliert und dadurch die Phosphorylierung durch GSK-3ß und somit den proteasomalen Abbau von ß-Catenin einleitet (Umar et al. 2006). Hierbei ist der erste Armadillo Repeat im N-terminalen Bereich von ß-Catenin entscheidend, da dieser für die hochaffine Phosphorylierung durch CKI in Abwesenheit einer kanonischen Konsensussequenz essentiell ist (Bustos et al. 2006).

1.3.4 Beteiligung von CKI an der Entstehung von Krankheiten

Mutationen und Deregulationen der Expression und der Aktivität der CKI-Isoformen stehen mit verschiedenen Krankheiten in Zusammenhang, wie den neurodegenerativen Erkrankungen Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, Schlafstörungen und malignen Tumorerkrankungen (Knippschild et al. 2005).

In Nierenzellkarzinomen wurde eine Steigerung der Expression von CKIγ3 beobachtet (Masuda et al. 2003) und eine erhöhte Expression von CKIδ konnte in Choriokarzinomen nachgewiesen werden (Stoter et al. 2005). In duktalen Adenokarzinomen des Pankreas wurde eine Expressionssteigerung von CKIδ und CKIε (Brockschmidt et al. 2008) gezeigt. Daneben wird eine Beteiligung von CKIε

bei der Entstehung des Adenoid Cystic Carinoma (ACC) der Speicheldrüsen diskutiert (Frierson et al. 2002).

Eine weitere maligne Erkrankung, die in dieser Hinsicht von Interesse ist, ist das Mammakarzinom. Beim Mammakarzinom handelt es sich um eine maligne Entartung der Drüsenepithelien, ausgehend von den Epithelien der Drüsengänge (duktale Karzinome) oder der Läppchen (lobuläre Karzinome). Die morphologischen Veränderungen bei der Karzinomentstehung sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

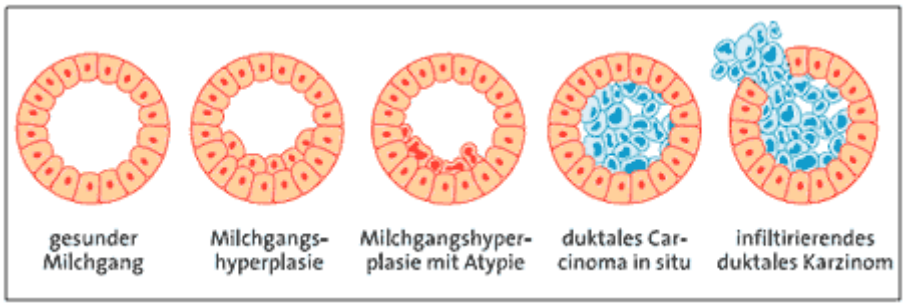


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Entwicklung zum duktalen Carcinoma in Situ (DCIS) und zum infiltrierenden Karzinom (Abbildung von (Regierer and Possinger 2005)).

Man muss unterscheiden zwischen sporadisch auftretendem Brustkrebs (etwa 95%), der wahrscheinlich auf hormonellen Einfluss zurückzuführen ist, und hereditärem Brustkrebs, der verbunden ist mit einer positiven Familienanamnese oder Keimbahnmutationen.

Die bösartigen Tumore der Brust, die zu über 95% Adenokarzinome sind, werden unterteilt in in situ Karzinome und invasive Karzinome. Das sogenannte Carcinoma in Situ (in situ Karzinom) ist eine neoplastische Zellpopulation, die durch die Basalmembran auf Gänge und Läppchen begrenzt ist und als Vorstufe des invasiven Karzinoms gilt. Das invasive Karzinom hat die Basalmembran überschritten und infiltriert das Stroma. Es kann in Blut- und Lymphgefäße einbrechen und metastasieren (Lester 2004).

In immunhistochemischen Untersuchungen von Mammakarzinomen wurde eine verminderte Expression von CKIδ sowohl in in situ Karzinomen, als auch in schlecht differenzierten invasiven Karzinomen nachgewiesen (Knippschild et al. 2005). Außerdem zeigten immunhistochemische Untersuchungen eine verminderte Expression von CKIε in schlecht differenzierten humanen

Mammakarzinomen und es wurde eine positive Assoziation zwischen verminderter Proteinreaktivität, Verlust der Heterozygotie und somatischen Mutationen festgestellt. Zusätzlich wurde beim humanen Mammakarzinom wiederholt eine erhöhte Frequenz somatischer Mutationen im CKIε kodierenden Gen nachgewiesen, die meist hoch konservierte Regionen dieses Gens betreffen. Auf Grund dieser Tatsache werden auch Veränderungen in der Aktivität der Wnt-Signalkaskade bei der Entstehung des humanen Mammakarzinoms diskutiert (Fuja et al. 2004).

Die bereits erbrachten Nachweise, dass Deregulationen und genetische Veränderungen von CKI, insbesondere CKIε und CKIδ, zur Entstehung von Mammakarzinomen beitragen können (Fuja et al. 2004; Knippschild et al. 2005) zeigen, dass es von großer Bedeutung ist, die genauen Funktionen der CKI-Isoformen in der Krankheitsentstehung aufzuklären, um so in Zukunft neue Therapieformen und Medikamente gegen diese möglichen Zielmoleküle entwickeln zu können.

Ein anderer Tumor, der aufgrund seiner Häufigkeit auch besondere Aufmerksamkeit bezüglich einer möglichen Beteiligung von CKI verdient, ist das kolorektale Karzinom.

Intestinale epitheliale Tumore stellen weltweit einen Hauptgrund für Morbidität und Mortalität dar. In den westlichen Ländern ist das kolorektale Karzinom einer der häufigsten bösartigen Tumore (Liu and Crawford 2004).

Als Risikofaktoren gelten Übergewicht und körperliche Inaktivität (Wei et al. 2004). Außerdem scheinen bestimmte Ernährungsgewohnheiten, wie übermäßige hochkalorische Nahrungsaufnahme, fettreiche Nahrung, ein niedriger Ballaststoffgehalt bei gleichzeitigem hohen Gehalt kurzkettiger Kohlenhydrate, Alkoholkonsum, der Verzehr von rotem Fleisch und eine verminderte Aufnahme protektiver Spurenelemente, entscheidende Risikofaktoren darzustellen (Divisi et al. 2006; Wei et al. 2004).

Die meisten kolorektalen Karzinome, die zu fast 98% Adenokarzinome sind, entstehen sporadisch. Abgesehen von äußeren Einflüssen und Risikofaktoren ist es eine ganze Reihe genetischer Veränderungen, die letztlich zu einem malignen kolorektalen Karzinom führt. Die Basis für diese Karzinogenese ist in den meisten

Fällen die sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz, ein Modell, das von Fearon und Vogelstein entwickelt wurde (Vogelstein et al. 1988). Die genetischen Veränderungen und die entsprechenden morphologischen Stadien der Karzinomentwicklung sind in Abbildung 5 dargestellt.

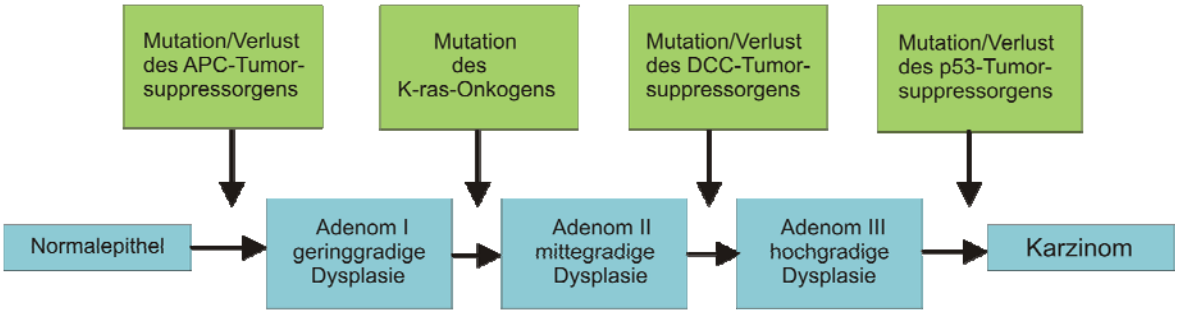


Abbildung 5: Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz (Abbildung nach (Herold 2006)). Bereits früh kommt es zu einem Verlust eines der beiden Allele des Adenomatous polyposis coli (APC)-Tumorsuppressorgens (sog. „first hit"). Menschen, die bereits mit einem defekten APC-Allel geboren werden, haben ein erhöhtes Risiko, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln. Im weiteren Verlauf erfolgt der Verlust des zweiten APC-Allels (sog. „second hit"). Es folgen Mutationen im K-ras-Onkogen. Des Weiteren kommt es zu Mutationen oder zum Verlust der Tumorsuppressorgene Deleted in colorectal carcinoma (DCC) und p53, was letztlich zur Entstehung eines kolorektalen Karzinoms führt. Es ist anzumerken, dass die Akkumulation der genetischen Veränderungen dabei von größerer Bedeutung ist, als die hier aufgeführte zeitliche Abfolge dieser Ereignisse. Die Entartung eines Darmpolypen zum Karzinom kann sich über mehrere Jahre erstrecken (Liu and Crawford 2004).

Das kolorektale Karzinom ist Folge einer Vielzahl von Deregulationen und Veränderungen in diversen zellulären und apoptotischen Signaltransduktionswegen, wie der Wnt- und p53-Signalwege. Dies trägt zu Apoptoseresistenz und einem hohen Metastasierungspotenzial bei und erklärt die immer noch hohe Mortalität dieser Karzinome (Clevers 2004; Ilyas 2005; Rupnarain et al. 2004)

Inzwischen wurde in hyperproliferierendem Kolonepithel eine veränderte CKIε-Expression nachgewiesen (Umar et al. 2006).

Eine weitere Veränderung, die den Einfluss der CKI-Isoformen auf die Tumorentstehung unterstreicht, ist eine Punktmutation (R342H) in der C-terminalen regulatorischen Domäne von CKIδ. Sie fördert Wnt-/ß-Catenin-unabhängig die Entstehung kolorektaler Adenome und erhöht nachweislich das Risiko für kolorektale Karzinome (Tsai et al. 2007).

Die genannten Ergebnisse zeigen, dass die CKI-Isoformen neue, potentielle Zielmoleküle für die Entwicklung von Inhibitoren und Medikamenten darstellen. Daher ist es wichtig, ihre genauen Funktionen in den genannten Signalwegen und ihre mögliche Rolle in der kolorektalen Karzinogenese aufzuklären.

2. Fragestellung

CKIε gehört zur CKI-Familie, deren Mitglieder ubiquitär exprimiert sind. Sie spielen in der Regulation vieler zellulärer Prozesse, wie Zellzyklusprogression, Zelldifferenzierung, DNA-Reperaturmechanismen und Apoptose eine essentielle Rolle (Knippschild et al. 2005).

Deregulationen und Mutationen von CKIε können Regulationsstörungen dieser Prozesse hervorrufen. CKIε wird daher mit diversen Krankheiten, insbesondere mit Tumorerkrankungen, in Verbindung gebracht.

Insgesamt sind die physiologischen Funktionen von CKIε in Mammalia wenig erforscht. Ziel dieser Arbeit ist es daher, zunächst detaillierte Informationen über die physiologische gewebespezifische Verteilung von CKIε zu gewinnen, um daraus mögliche Funktionen von CKIε ableiten zu können.

Zunächst sollen Western Blot-Analysen von verschiedenen Organen gesunder, junger adulter BALB/c Mäuse durchgeführt werden, um Aussagen über die Expression von CKIε in den unterschiedlichen Organen treffen zu können. Zur genauen Charakterisierung der Expression und Lokalisation von CKIε in den unterschiedlichen Zell- und Gewebearten sollen dann immunhistochemische Analysen der Organe und Gewebe folgen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit ist auf den Nachweis von Expressionsänderungen von CKIε in Tumorgewebe gerichtet.

Dazu soll zunächst die Expression von CKIε im Mammakarzinom untersucht werden. Hierfür werden immunhistochemische Analysen von Normalgewebe und Tumorgewebe aus Brustdrüsen Simian Virus 40 (SV40) T-Ag transgener, induzierter Mäuse des Stammes NP8 (Schulze-Garg et al. 2000) durchgeführt. Das Mammakarzinom wurde aus dem Grund ausgewählt, da in anderen Studien bereits Hinweise für eine Beteiligung von CKIε in der Entstehung dieser Tumorart erbracht wurden (Fuja et al. 2004).

Die zweite Tumorart, die für diese Arbeit auf Expressionsveränderungen von CKIε untersucht werden soll, ist das kolorektale Karzinom. Diese Tumorart wurde für die Analysen ausgewählt, da hier häufig Veränderungen im Wnt-Signalweg zu finden sind, in dem unter anderem auch CKIε positiv und negativ regulatorische Aufgaben wahrnimmt (Aberle et al. 1997; Bryja et al. 2007; Ikeda et al. 1998;

Umar et al. 2006). Sowohl Normalgewebe, als auch Tumorgewebe von insgesamt 30 Patienten soll immunhistochemisch untersucht werden.

Wir erhoffen von den Untersuchungen dieser Arbeit zum einen, Anhaltspunkte über mögliche physiologische Funktionen von CKIε in verschiedenen Organen zu erhalten und zum anderen, Aussagen treffen zu können, inwieweit Änderungen der Expression von CKIε in Mammakarzinomen und kolorektalen Karzinomen auftreten.

3. Material und Methoden

Material

3.1 Mausstämme

Für die Versuche zur Untersuchung der Expression und Lokalisation von CKIε in Organen und Gewebe unter normalen physiologischen Bedingungen wurden gesunden 4-6 Wochen alten Mäusen des Stammes BALB/c Organe entnommen.
Für die Untersuchung der Expression von CKIε in murinen Mammakarzinomen wurden Gewebeproben aus Brustdrüsen von SV40 T-Ag transgenen Mäusen des Stammes NP8 (Schulze-Garg et al. 2000) herangezogen. Diese Tiere tragen die frühe Genregion von SV40 als Transgen, die für die Onkogene T-Ag und t-Ag kodiert. Diese Genregion steht unter der Kontrolle des Whey acidic protein (WAP)-Promotors. Am Schwangerschaftsende und während der Laktation kommt es zur Induktion des WAP-Promotors und so zur Expression des T-Ag, was letztlich nach etwa 6 Monaten zur Entstehung eines Mammakarzinoms führt (Schulze-Garg et al. 2000).
Die Versuche wurden von der Tierschutzbeauftragten genehmigt (Tierversuchsnr. 752 und 904) und an der Außenstelle Safranberg des Tierforschungszentrums Ulm durchgeführt.

3.2 Patientenkollektiv

Für die Versuche zur Untersuchung der Expression und Lokalisation von CKIε in humanen kolorektalen Karzinomen wurden von 30 Patienten im Alter von 29 bis 92 Jahren Gewebeproben jeweils aus Normal- und aus Karzinomgewebe entnommen. Die Versuche wurden vor Beginn von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Antrag Nr. 268/08). Zudem lag von jedem Patienten eine unterzeichnete Einverständniserklärung vor.

3.3 Antikörper

Mit den Antikörpern sind jeweils ihre Verwendung auf Immunhistochemie (IHC) oder Western Blot (WB) und die dabei verwendeten Verdünnungen angegeben.

Primärantikörper

712	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen CKIε (Brockschmidt et al. 2008). (IHC-P: 1: 1000; IHC-G: 1: 200).
Anti-Casein Kinase Iε	Monoklonaler Antikörper aus humaner Gewebekultur gegen CKIε. BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland (WB: 1: 125).
sc-25423 (H 60)	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen CKIε. Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA (IHC-P: 1: 150).
R 15	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen T-Ag (Deppert and Pates 1979). (IHC-P: 1: 5000).

Enzymgekoppelte Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen	N-Histofine® Simple Stain MAX PO (R), Nichirei Biosciences Inc., Tokio, Japan (für IHC).
Anti-Maus	ECL™ Anti-Mouse IgG Horseradisch Peroxidase (HRP) linked whole antibody, Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, England (für WB).

Anti-Kaninchen	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/ HRP, Dako, Glostrup, Dänemark (für WB).

3.4 Chromogen-Substrate

Liquid DAB+	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark

3.5 Chemikalien und Reagenzien

3-Aminopropyltriethoxy-Silane	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
4-Coumarinsäure (p-Hydroxyzimtsäure)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Aceton	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Benzamidin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
b-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Cedukol (Kollodiumwolle + ca. 30 % Ethanol)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Citratpuffer (10x)	BioGenex, San Ramon, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Waldeck/ Chroma, Münster, Deutschland
Diethylether reinst	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethylenglykol-bis2(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Entellan®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin Y Lösung mit Phloxin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Essigsäure	Fluka, Buchs, Schweiz
Ethanol absolut puriss.	Fluka, Buchs, Schweiz
Formaldehyd	J.T. Baker, Deventer, Holland
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Hämatoxylinlösung Gill Nr.3	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Leupeptin	Biomol, Hamburg, Deutschland
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Fluka, Buchs, Schweiz
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methylbenzoat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff (N_2), flüssig	mti®, Neu-Ulm, Deutschland

Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka, Buchs, Schweiz
Peroxidase Blocking Reagent	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
Protein-Marker 7B, vorgefärbt	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Toluol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trasylol (Wirkstoff: Aprotinin)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	USB, Cleveland, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tween-20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	VWR® International, Darmstadt, Deutschland

3.6 Kits und Verbrauchsmaterialien

Röntgenfilm Amersham Hyperfilm™ MP	GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, England
Röntgenfilm Agfa Cronex5	Agfa-Gevaert N. V., Mortsel, Belgien
96-well Mikrotiterplatte	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Barrierestift Mini PAP Pen Plus	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA

Deckgläser 24x60mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
DermaClean® Non-Sterile Examination Gloves S	Ansell, Kulim, Malaysia
epT.I.P.S. Standard 0,1-10 µl, 2-200 µl, 50-1 000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
High Recovery™ Aerosol Pipet Tips 1-100 µl,	VWR® International, Darmstadt, Deutschland
Laborwischtücher Kimtech Science™	Kimberly-Clark®, Dallas, Texas, USA
Nitra-Tex® Non-Sterile Examination Gloves S	Ansell, Tamworth, Großbritannien
Objektträger Superfrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Paraffin	Vogel GmbH&CoKG, Gießen, Deutschland
Safe-Lock Tubes 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf®, Hamburg, Deutschland
Skalpelle	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen Falcon (15ml, 50ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

3.7 Geräte

Pipetten

Research®	(Eppendorf®, Hamburg, Deutschland) 0,1-2,5 µl, 0,5-10°µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl

Zentrifugen

Zentrifuge 5417 R, Rotor FA-45-30-11	Eppendorf®, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5430,	Eppendorf®, Hamburg, Deutschland

Rotor FA-45-24-11-HS	
Zentrifuge Megafuge 1.0 R, Rotor 2705	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland

Kühl-/ Gefrierschränke

Comfort	Liebherr GmbH, Biberach an der Riss, Deutschland
Hera freeze HFU 586 Basic	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Öko Super	Liebherr GmbH, Biberach an der Riss, Deutschland
Profiline	Liebherr GmbH, Biberach an der Riss, Deutschland

Mikrowellengeräte

M 754	Landgraf Laborsysteme HLL GmbH, Langenhagen, Deutschland
MWU512WS	Bauknecht Hausgeräte GmbH, Stuttgart, Deutschland

Waagen

R180-D	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
440-35A	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland

Mikroskope

Axioplan 2	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
IX81	Olympus, Tokio, Japan

Sonstige Geräte

Autoklav 32-2-3	KSG Sterilisatoren GmbH, Olching, Deutschland
Autotechnikon Leica ASP200	Leica, Wetzlar, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf®, Hamburg, Deutschland
CellCam LC	Phase, Lübeck, Deutschland
Certomat®BS-1	B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland
DPU-414 Thermal Printer	Seiko Instruments Inc., Chiba, Japan
Färbeküvetten Wheaton „810“	VWR® International, Darmstadt, Deutschland
Glasgefäße	VWR® International, Darmstadt, Deutschland
Mikrotom HM 450	Microm, Walldorf, Deutschland
Mischgerät Reax top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Model 1 000/500 Power Supply	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Mörser	VWR® International, Darmstadt, Deutschland
Plastikküvette für die Mikrowelle	VWR® International, Darmstadt, Deutschland
Praffin-Ausgießstation EC 350	Microm, Walldorf, Deutschland
Schwenktisch KS250 basic	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Spatel	VWR® International, Darmstadt, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf®, Hamburg, Deutschland
Transilluminator Fluo-Link	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland
Video Graphic Printer UP-895CE	Sony, Tokio, Japan

Methoden

3.8 Immunhistochemische Methoden

3.8.1 Silanisierung der Objektträger

Die Objektträger werden vor Gebrauch silanisiert, um die Haftung der Paraffinschnitte zu verbessern. Um dies zu erreichen, werden die Objektträger 1 Minute lang in ein 2%iges Silan-Aceton-Gemisch gestellt, dann zweimal je 1 Minute in reinem Aceton und zweimal je 1 Minute in destilliertem Wasser (dH_2O) inkubiert und schließlich über Nacht bei 40°C im Wärmeschrank getrocknet.

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

3.8.2 Fixierung des Gewebes und Herstellung der Schnittpräparate

3.8.2.1 Gefrierschnitte

Nachdem die BALB/c Mäuse mit Kohlenstoffdioxid (CO_2) getötet worden waren, wurden sie präpariert und ihnen möglichst schnell die Organe entnommen. Diese wurden dann auf mit Einbettmedium für Gefrierschnitte bestückte Korkplättchen gebracht und auf einem Block bei -20°C im Kryostat gekühlt. Von den Organen wurden 5-10 µm dicke Gefrierschnitte hergestellt, welche auf Objektträger gebracht wurden. Die Schnittpräparate wurden dann 10 Minuten lang in kaltem Aceton fixiert und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur (RT) getrocknet, bevor am Folgetag die immunhistochemische Färbung durchgeführt wurde. Wurden die Organe nicht sofort weiterverarbeitet, so wurden sie in flüssigem Stickstoff durchgefroren und bei -80°C gelagert.

3.8.2.2 Paraffinschnitte

Fixierung des Gewebes

Nach dem Töten der Mäuse mit CO_2 wurden die Tiere präpariert und den BALB/c Mäusen die Organe entnommen. Den SV40 T-Ag transgenen Mäusen wurde sowohl gesundes, als auch karzinomatös verändertes Brustdrüsengewebe entnommen. Sämtliche Organe und Gewebeproben wurden sofort per Immersionsfixation fixiert, indem sie bei RT 24 Stunden zuerst in saurem Formalin, danach 24 Stunden in neutralem Formalin inkubiert wurden.

Saures Formalin:	*4% Formaldehyd; 1,5% Essigsäure*
Neutral gepuffertes Formalin (10%):	*0,4% Natriumhydrogenphosphat; 0,65% Dinatriumhydrogenphosphat; 10% (v/v) Formaldehyd 37%; ad 1000 ml dH_2O*

Einbettung des Gewebes

Nach der oben erläuterten Immersionsfixation wurden die Gewebestücke 4 Stunden unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen, bevor sie über Nacht maschinell eingebettet wurden. Bei der Einbettung erfolgte bei aufsteigender Alkoholreihe zuerst eine Entwässerung, dann eine Inkubation des Gewebes in Methylbenzoat und schließlich ein Auswaschen des Alkohols durch Toluol. Zum Abschluss werden die Stücke komplett mit Paraffin durchtränkt. Der genaue Ablauf dieses maschinellen Prozesses ist der unten stehenden Tabelle 2 zu entnehmen. Diesem Schritt folgte das Ausgießen zu schneidbaren Paraffinblöcken.

Tabelle 2: Arbeitsschritte der maschinellen Einbettung mit Reagenzien, Einwirkzeit und Temperatur.

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

Entparaffinieren der Schnittpräparate

Mit dem Schlittenmikrotom wurden von den Paraffinblöcken ca. 3µm dicke Schnitte angefertigt, die auf Objektträger gebracht wurden und dann über Nacht bei 40°C im Wärmeschrank getrocknet wurden.

Die Schnittpräparate, die zur HE-Färbung vorbereitet wurden, wurden entparaffiniert und rehydriert, indem sie zunächst zweimal 10 Minuten in Xylol gegeben wurden, dann jeweils 5 Minuten lang dreimal in 100%igem Ethanol und je einmal in 96%igem, 80%igem, 70%igem und 50%igem Ethanol inkubiert wurden. Abschließend wurden sie zweimal kurz in dH_2O gespült.

Die Schnittpräparate, die anschließend immunhistochemisch gefärbt werden sollten, wurden entparaffiniert, indem sie zweimal je 10 Minuten in Xylol eingelegt wurden, und rehydriert, indem sie dreimal je 5 Minuten in 100%igem Ethanol inkubiert wurden. Anschließend wurden die Schnittpräparate 1 Minute lang in

0,05%ige Celloidinlösung gegeben, um ein Ablösen der Schnitte bei der Hitzedemaskierung zu verhindern. Danach wurden sie 30-40 Sekunden lang an der Raumluft angetrocknet, dann 5 Minuten in 70%igem Ethanol inkubiert und schließlich zweimal jeweils 5 Minuten in dH_2O gespült.

Celloidinlösung 0,05%: 0.05% Cedukol in 50% (v/v) Ethanol absolut und 50% (v/v) Diethylether reinst

3.8.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Bei Hämatoxylin handelt es sich um einen farblosen Pflanzenfarbstoff, den man durch Alkoholextraktion aus Blauholz gewinnt.
Beim Färben lagern sich an die negativ geladenen Nukleinsäurephosphatgruppen die positiv geladenen Komplexverbindungen des Alauns an.
Die eigentliche Färbung, die Blaufärbung der Zellkerne, erreicht man durch Einstellen des pH-Wertes >3 durch Leitungswasser oder eine 0,1%ige Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)-Lösung, was als Bläuen bezeichnet wird. Diese Reaktion ist auf die Indikatoreigenschaften der Schwermetallanteile des Alauns zurückzuführen.
Eosin wird hauptsächlich zu Übersichtsfärbungen gemeinsam mit Hämalaun eingesetzt. Es trägt negative Ladungen und bindet somit an positiv geladene Gruppen. Gefärbt wird es regressiv, was bedeutet, dass Eosin zunächst überfärbt und anschließend differenziert wird.

Um die Paraffinschnitte besser beurteilen zu können, wurden zunächst Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbungen gemacht.

Die entparaffinierten Schnitte wurden 4 Minuten in Hämatoxylinfarbe gefärbt, dann zweimal für je 1 Minute in dH_2O gespült. Dann wurden die Schnitte kurz in 1%igem Salzsäure (HCl)-Ethanol-Gemisch differenziert, bevor sie 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut wurden. Anschließend erfolgte für 1 Minute eine Spülung in dH_2O, gefolgt von einer Färbung in Eosin von 2 Minuten.

Schließlich wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt, jeweils 5 Minuten zweimal in 96%igem und dreimal in 100%igem Alkohol, abschließend zweimal je 5 Minuten in Xylol gegeben und letztlich mit Entellan eingedeckelt und getrocknet.

3.8.4 Immunhistochemische Färbungen

3.8.4.1 Verdünnungen und Detektionssysteme

Verdünnungen der Antikörper

Zum Nachweis von CKIε kamen die polyklonalen Kaninchenantikörper 712 (Brockschmidt et al. 2008) und sc-25423 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) zum Einsatz. Um optimale Färbungsergebnisse zu erhalten und um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, wurden für beide Antikörper sowohl für die Gefrierschnitte (GS), als auch für die Paraffinschnitte (PS) verschiedene Verdünnungen getestet. Dabei zeigte sich, dass für den polyklonalen Antikörper 712 eine Verdünnung von 1:1000 bei den Paraffinschnitten und 1:200 bei den Gefrierschnitten am besten geeignet ist. Für den polyklonalen Antikörper sc-25423 galt dies für die Verdünnung 1:150 für die Paraffinschnitte, für Gefrierschnitte erwies sich dieser Antikörper als ungeeignet.
Der polyklonale Kaninchenantikörper R 15 (Deppert and Pates 1979) wurde zum Nachweis des aktivierten T-Ag in Brustdrüsengewebe von SV40 T-Ag transgenen Mäusen eingesetzt. Für die Immunhistochemie an dem in Paraffin eingebetteten Gewebe war die optimale Verdünnung 1:5000.

Detektionssysteme

Als Detektionsmethode wurde sowohl für die Gefrier-, als auch für die Paraffinschnitte die Zweischritt-Technik von N-Histofine® eingesetzt.

3.8.4.2 Immunhistochemie an Gefrierschnitten

Nachdem die Schnittpräparate am Vortag in Aceton fixiert und über Nacht bei RT getrocknet wurden, erfolgte zunächst deren Rehydrierung für 5 Minuten in Tris-Puffer und anschließend, um Hintergrundreaktionen zu blockieren, deren Inkubation für 10 Minuten mit Peroxidase Blocking Reagent. Nach dem Spülen der Präparate in Tris-Puffer (2x je 5 Minuten), wurden diese mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Kapitel 3.3) versetzt und für 40 Minuten bei RT stehen gelassen. Die Schnittpräparate wurden dann erneut zweimal je 5 Minuten in Tris-Puffer gewaschen, bevor der mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierte Sekundärantikörper unverdünnt aufgetragen wurde. Diesen ließ man 30 Minuten bei RT einwirken. Anschließend wurde der übrige, ungebundene Sekundärantikörper durch Spülen in Tris-Puffer (2x je 5 Minuten) entfernt und schließlich das Chromogen 3,3-Diaminobenzidin (DAB) auf die Schnitte aufgetragen, wodurch es durch die Reaktion mit HRP zur Darstellung von CKIε kam. Die Schnittpräparate wurden mit dem Chromogen bei RT 10-30 Minuten inkubiert, dann wurde die Reaktion durch zweimaliges Waschen in bidestilliertem Wasser (ddH_2O) (je 5 Minuten) gestoppt und die Schnitte 10 Sekunden zur Gegenfärbung in Mayers Hämalaun getaucht. Im Anschluss wurden sie 10 Minuten unter fließendem Wasser gebläut, erneut 5 Minuten in ddH_2O gewaschen und abschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt (je 5 Minuten, 1x in 70%igem Ethanol, 1x in 96%igem Ethanol, 3x in 100%igem Ethanol). Danach wurden die Schnittpräparate noch zweimal für 5 Minuten in Xylol inkubiert und letztlich mit Entellan eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

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

3.8.4.3 Immunhistochemie an Paraffinschnitten

Bei der Fixierung mit Formalin kommt es im Gewebe zu chemischen Veränderungen, was zu einer Antigenmaskierung führt, die wiederum dazu führen kann, dass der eingesetzte Antikörper das nachzuweisende Antigen nicht mehr erkennt (Shi et al. 1997). Aus diesem Grund wurde die sogenannte Hitzedemaskierung eingeführt, welche die Detektion bestimmter mit Formalin behandelter Antigene mit immunhistochemischen Färbungen wieder deutlich verbesserte (Kim et al. 2004). Diese Methode, die auch eine gängige Technik in der Histologie und der Pathologie ist (Cattoretti et al. 1993; Morgan et al. 1994) kam auch hier zum Nachweis von CKIε und T-Ag zur Anwendung.

Die Detektion von CKIε mittels Antikörper 712 und Antikörper sc-25423 erfolgte nach gleichem Protokoll. Als Demaskierungslösung wurde 1:10 verdünnter Citratpuffer (BioGenex) verwendet, der sich mit entsprechender Mirkowellenbehandlung als am besten geeignet erwies. Die entparaffinierten Schnittpräparate wurden direkt nach dem zweiten Spülen in dH_2O in eine mit Citratpuffer (1:10) gefüllte Plastikküvette gegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass die Schnitte komplett mit Puffer bedeckt waren. Dann wurde die Küvette mit einem Deckel verschlossen, aber nur so weit, dass noch Dampf austreten konnte. Daraufhin wurde sie in die Mirkowelle gestellt, wo alles 2 Minuten bei 450 Watt kurz aufgekocht wurde, bevor es für weitere 20 Minuten bei 80 Watt erhitzt wurde. Danach wurde die Küvette aus der Mikrowelle entnommen, der Deckel entfernt und alles 20 Minuten lang bei RT zum Abkühlen stehen gelassen.
Das Protokoll zur Detektion von aktiviertem T-Ag mittels Antikörper R 15 ist bis auf wenige Unterschiede bei der Hitzedemaskierung identisch zum Protokoll der Antikörper 712 und sc-25423. So wurden hier die Schnittpräparate in der Mikrowelle zunächst 15 Minuten bei 450 Watt und dann weitere 20 Minuten bei 150 Watt erhitzt. Zudem wurde die Plastikküvette für die Mikrowellenbehandlung der Schnittpräparate zusätzlich in einen Dampfkochtopf gestellt.
Nach dem Prozess der Hitzedemaskierung wurden die Schnittpräparate jeweils 10 Minuten zuerst in dH_2O, dann in Tris-HCl-Puffer gewaschen, bevor sie für 10 Minuten mit Peroxidaseblock bedeckt wurden. Anschließend wurden die Schnitte

zweimal je 10 Minuten in Tris-HCl-Puffer gewaschen, mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung versetzt und so über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert.
Am folgenden Tag wurden die Schnittpräparate zunächst zweimal je 10 Minuten in Tris-HCl-Puffer gewaschen, um den Primärantikörper zu entfernen. Dann wurden sie mit dem entsprechenden Sekundärantikörper von Histofine bestückt, der 20 Minuten lang bei RT einwirken konnte. Der ungebundene Sekundärantikörper wurde danach durch Waschen in Tris-HCl-Puffer (2x je 10 Minuten) entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit Chromogenen versetzt (DAKO DAB+), was zur Reaktion mit der HRP führte, wodurch die gewünschten Antigene nach ca. 10 Minuten sichtbar und ausreichend stark braun angefärbt wurden. Die Reaktion wurde dann durch das Waschen der Präparate zweimal für je 10 Minuten in dH_2O gestoppt und es folgte die Gegenfärbung in Mayers Hämalaun mit anschließendem Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten. Die Schnittpräparate wurden dann durch die aufsteigende Alkoholreihe, wo sie für je 5 Minuten einmal in 70%igem Ethanol, einmal in 96%igem Ethanol und dreimal in 100%igem Ethanol standen, geführt, noch zweimal je 5 Minuten in Xylol inkubiert und abschließend mit Entellan eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

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

Citratpuffer: CitraPlus (10x) BioGenex

3.8.4.4 Beurteilung der immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate

Von den Mausorganen und wurden Serienschnitte angefertigt. Dann wurde mit den spezifischen Antikörpern 712 und sc-25423 CKIε in den Schnittpräparaten detektiert. Sichtbar gemacht wurde CKIε in den jeweiligen Gewebestrukturen durch die typische braune Farbreaktion des Chromogens DAB. Die Intensität der Färbung korreliert mit der Expression von CKIε und wurde in folgende Kategorien eingeteilt:

Tabelle 3: Einteilung der Intensitätsgrade der Casein Kinase Iε (CKIε) spezifischen Farbreaktion.

-	negativ
+	schwach
++	mäßig
+++	stark

Angaben mit Schrägstrich (z.B. -/+ oder ++/+++) bedeuten ein heterogenes Expressionsmuster. Das bedeutet, dass man in dem entsprechenden Gewebe Zellen mit den verschiedenen, genannten Färbeintensitäten findet.
Ähnlich wurde mit dem Brustdrüsengewebe der SV40 T-Ag transgenen Mäuse verfahren. In den hiervon angefertigten Schnittpräparaten wurde CKIε mit dem spezifischen Antikörper 712 und aktiviertes T-Ag mit dem spezifischen Antikörper R 15 nachgewiesen. Zur Beurteilung der Expressionsstärke gelten ebenfalls die Angaben in Tabelle 3.

3.9 Proteinbiochemische Methoden

3.9.1 Herstellung von Proteinlysaten

Die tiefgefrorenen Gewebestücke wurden mit je 500 µl Lysispuffer versetzt und homogenisiert. Die Homogenisate wurden dann 30 Minuten auf Eis gekühlt und immer wieder durchmischt, bevor sie 15 Minuten bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurden. Anschließend konnte der Überstand, in dem die Proteine angereichert waren, abgenommen werden.

NP-40 Lysispuffer (pH 8,0): *50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 120 mM NaCl, 0,5% (v/v) NP 40, 10% (v/v) Glycerol, immer unmittelbar vor Gebrauch frisch dazu geben 1:100 Trasylol, 1 mM EGTA, 5 mM DTT, 1:100 Benzamidin (Stock 100 mM), 1:1000 Leupeptin (Stock 50 mM)*

3.9.2 Konzentrationsbestimmung und Angleich der Proteinkonzentration in den Lysaten

Die Proteinmenge der hergestellten Lysate wurde photometrisch mit einem Spektral-Photometer (Eppendorf) bestimmt. Dazu wurden die Proben auf eine 96-well Mikrotiterplatte aufgetragen und gegen eine zuvor angefertigte Rinderserumalbumin (BSA)-Standardeichreihe gemessen. Die Ermittlung der in den Lysaten enthaltenen Proteinkonzentration geschah anhand der gemessenen Absorption bei 595 nm.
Zur Durchführung wurden zunächst Verdünnungen der zu analysierenden Lysate (1:40) und für die Standard-Eichreihe vier verschiedene BSA-Verdünnungen (BSA Stocklösung 1mg/ml, BSA- Verdünnungen: 0,1 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,7 mg/ml) mit ddH_2O hergestellt. Es wurden dann sowohl von den Proben, als auch von den BSA-Verdünnungen jeweils 10 µl mit 200 µl 2,2'-Bichinolon-4,4'-dicarbonsäure (BCA) Reagenz versetzt. Anschließend wurde die so bestückte Mikrotiterplatte abgedeckt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert, bevor die Proteinkonzentrationen im Spektral-Photometer bestimmt werden konnten.

BCA Reagenz: *BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology)*

3.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Variante der Gelelektrophorese zur Trennung der Proteine im elektrischen Feld. Die verwendeten Polyacrylamidgele bestanden aus einem Trenngel und einem darüber liegenden Sammelgel. Sie enthielten jeweils das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecysulfat), welches die Eigenladung der Proteine überdeckte, wodurch diese nach außen eine einzige negativ geladene Hülle hatten. So bestanden keine Ladungsunterschiede mehr zwischen ihnen und sie wurden nach ihrer Größe aufgetrennt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben zunächst mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 99°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Proteine wurden dann zuerst

20 Minuten lang bei 80 V Spannung im Sammelgel konzentriert und dann eine Stunde bei einer Spannung von 180 V im Trenngel aufgetrennt.

SDS-Sammelgel: *0,1% (w/v) SDS, 4% (w/v) Acrylamid, 130 mM Tris-HCl (pH 6,8); kurz vor dem Gießen der Gele wurden 0,09% (w/v) APS und 0,3% (v/v) TEMED zugegeben*

SDS-Trenngel: *0,1% (w/v) SDS, 12,5% (w/v) Acrylamid, 130 mM Tris-HCl (pH 8,8); kurz vor dem Gießen der Gele wurden 0,05% (w/v) APS und 0,12% (v/v) TEMED zugegeben*

SDS-PAGE-Laufpuffer: *250 mM Tris-HCl, 1,9M Glycin, 1% (w/v) SDS*

5x SDS-Probenpuffer: *250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 25% (v/v) ß-Mercaptoethanol, 50% (v/v) Glycerol, 10% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) Bromphenolblau*

3.9.4 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue

Die Färbung der Proteinbanden in den Polyacrylamidgelen erfolgte in Coomassie Brilliant Blue Färbelösung 15 Minuten lang. Danach wurden die Gele bis zur Entfärbung des Hintergrunds in Coomassie-Entfärber und schließlich noch in dH_2O geschwenkt.

Coomassie-Färbelösung: *1,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 in 1 l Methanol/ ddH_2O/ Eisessig (5:5:1)*

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

3.9.5 Transfer von Proteinen auf Membranen

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden aus den Polyacrylamidgelen in einer Nassblotapparatur über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld über 90 Minuten eluiert (Spannung 60 V) und auf synthetische Membranen transferiert, welche zuvor 2 Minuten in Methanol aktiviert und in Transferpuffer äquilibriert worden waren. Das Auftrennungsmuster blieb dabei erhalten. Außerdem wurde das an die Proteine angelagerte SDS ausgewaschen, wodurch diese renaturieren und ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen konnten und so für Antikörper erkennbar wurden.

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

3.9.6 Immundetektion (Western Blot-Analyse)

Um zu verhindern, dass die Antikörper an freie, unspezifische Bindungsstellen auf den Membranen binden, mussten diese Bindungsstellen nach dem Transfer der Proteine zunächst abgesättigt werden, indem die Membranen 60 Minuten bei RT in Blockpuffer geschwenkt wurden. Der Blockpuffer enthielt ein für die Antikörper nicht erkennbares Protein.
Anschließend wurden die Membranen mit dem Primärantikörper in Blockpuffer bei 4°C über Nacht inkubiert.
Am folgenden Tag wurden die Membranen zuerst in Waschpuffer gewaschen (3x 10 Minuten), um den übrigen, nicht gebundenen Antikörper zu entfernen.
Zum Nachweis der spezifischen Bindung der Primärantikörper an CKIε wurden die Membranen dann 1 Stunde bei RT mit einem speziesspezifischen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in Blockpuffer inkubiert, der an den Primärantikörper bindet. Abschließend wurden die Membranen erneut dreimal 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen, bevor auf ihnen durch die ECL-Reaktion die Proteine visualisiert werden konnten. Für eine eventuelle spätere Weiterverwendung konnten die Membranen bei 4°C in Waschpuffer aufbewahrt werden.

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*

3.9.7 Visualisierung durch Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Reaktion

Um die Banden sichtbar zu machen, wurden die Membranen 2 Minuten in ECL-Reaktionslösung geschwenkt und dann auf Röntgenfilmen exponiert (10 Sekunden bis 2 Minuten). Auf Grund der Spaltung des in der Reaktionslösung enthaltenen Wasserstoffperoxids durch die an die Sekundärantikörper gebundene HRP entstanden Radikale, welche eine Chemolumineszens-Reaktion auslösten. Diese Chemolumineszens-Reaktion führte zu einer Schwärzung des Röntgenfilms an der Position der gebundenen Sekundärantikörper.

Lösung A: *100 µl Luminolstammlösung, 44 µl 4-Coumarinsäure-Stammlösung, 10 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) jeweils frisch angesetzt*

Lösung B: *15 µl H_2O_2 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-Coumarinsäure:	*4-Coumarinsäure (p-Hydroxyzimtsäure): 74 mg in 5 ml DMSO (90 mM), Lagerung in Aliquoten bei -20°C*
ECL-Reaktionslösung:	*1:1 Gemisch aus Lösung A und Lösung B, unmittelbar vor Gebrauch mischen*

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Expression von CKIε in verschiedenen Mausorganen durch Western Blot-Analyse

Um die Expression von CKIε in verschiedenen Organen und Geweben unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden zunächst Western Blot-Analysen durchgeführt. Dafür wurden von Organen 4-6 Wochen alter BALB/c Mäuse Proteinlysate hergestellt und deren Proteingehalt, wie in Material und Methoden beschrieben, photometrisch bestimmt. Jeweils gleiche Proteinmengen wurden auf 12,5%igen SDS-Gelen in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran geblottet. CKIε wurde dann im Western Blot immunologisch nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β-Aktin (siehe Abbildung 6).

Die Ergebnisse der immunologischen Detektion von CKIε sind in Abbildung 6 gezeigt. Eine hohe Expression von CKIε konnte in der Lunge und im Gehirn nachgewiesen werden. Mäßig ist die Expression von CKIε in den Lysaten der Organe Herz, Thymus, Ovar, Muskel, Leber, Uterus und Hoden. In der Mamma, im Auge, im Dickdarm, im Pankreas, der Blase und der Niere wird CKIε nur schwach exprimiert. Bei der Milz deutet die schneller wandernde Bande darauf hin, dass es sich hier um ein Abbauprodukt handelt. Dies erschwert eine eindeutige Aussage über die Stärke der CKIε-Expression in der Milz.

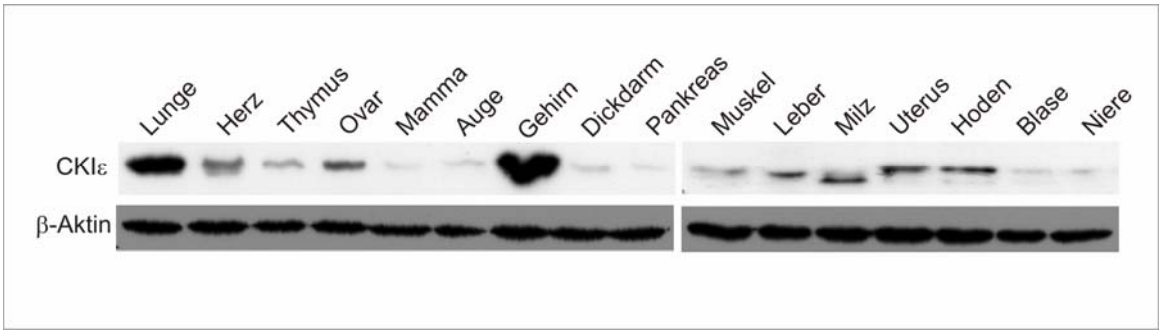


Abbildung 6: Detektion von Casein Kinase Iε (CKIε) und β-Aktin in Proteinlysaten verschiedener Organe und Gewebe einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Nach Homogenisierung des Gewebes wurden je gleiche Mengen Gesamtprotein in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend erfolgte die immunologische Detektion von CKIε mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper Anti-Casein Kinase Iε von BD Biosciences im Western Blot. Um zu kontrollieren, ob gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde β-Aktin immunologisch nachgewiesen.

4.2 Nachweis von CKIε in Gewebeschnitten der Maus

Da der Nachweis von CKIε in den Proteinlysaten der untersuchten Organe und Gewebe keine Rückschlüsse auf deren Verteilung auf zellulärer Ebene zulässt, wurden zur Untersuchung der gewebespezifischen Lokalisation von CKIε immunhistochemische Techniken angewandt. Es wurden dazu folgende zwei polyklonale CKIε spezifische Antikörper verwendet: der Antikörper sc-25423 von Santa Cruz (siehe Material und Methoden) und der Antikörper 712, dessen Spezifität in der Immunhistologie bereits gezeigt werden konnte (Brockschmidt et al. 2008). Auf Grund der großen Homologie zwischen CKIε und CKIδ wurden diejenigen immunhistochemischen Methoden angewandt, die sich bereits für den Nachweis von CKIδ in Gefrier- und Paraffinschnitten von Organen 4-6 Wochen alter BALB/c Mäuse bewährt hatten (siehe Material und Methoden).

4.2.1 Nachweis von CKIε in Gefrier- und Paraffinschnitten

Bei der Anwendung immunhistochemischer Techniken können diverse Schwierigkeiten auftreten. So stellen Hintergrundfärbungen durch unspezifische Antikörperbindungen ein häufiges Problem dar. Dies war jedoch bei den in dieser Arbeit eingesetzten Antikörpern nicht der Fall (siehe Abbildung 7).
Des Weiteren kann eine hohe Expression endogener Peroxidasen in Zellen ebenfalls zu falsch positiven Markierungen führen (True 2008). Um dies zu verhindern, wurden die Schnittpräparate vor der Inkubation mit dem spezifischen Antikörper mit Peroxidase Blocking Reagent inkubiert.
Auch kann es durch die Aktivität endogener Peroxidasen zum Abbau der Antigene kommen, was deren Detektion folglich unmöglich macht. Voraussetzung für die Antigenerkennung durch immunhistochemische Methoden ist, dass das nachzuweisende Antigen während des Fixierungsvorgangs nicht zerstört wird. Im Gegensatz zu Paraffinschnitten bleiben in Gefrierschnitten, für welche das entnommene Gewebe sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wird, auch labile Antigene erhalten. Aus diesem Grund wurden zunächst Gefrierschnitte von Organen 4-6 Wochen alter BALB/c Mäuse angefertigt. Zum Nachweis von CKIε in

den Gefrierschnitten wurde der polyklonale Antikörper 712 (Brockschmidt et al. 2008) eingesetzt. Da jedoch die Gewebemorphologie in Gefrierschnitten in der Regel weniger gut erhalten bleibt, wurden gleichzeitig Schnitte von in Paraffin eingebettetem Gewebe angefertigt, in welchen CKIε mit demselben Antikörper nachgewiesen wurde.

Die Gefrierschnitte wurden mit den Paraffinschnitten, die von sämtlichen Organen angefertigt wurden, verglichen. Dabei bestätigte sich der schlechtere morphologische Erhalt des Gewebes in den Gefrierschnitten (siehe auch Abbildung 7 A). Dies macht auch eine Interpretation der gewebespezifischen Lokalisation von CKIε in diesen sehr schwierig, weshalb auf eine genauere Untersuchung der Gefrierschnitte und eine detaillierte Beschreibung der Ergebnisse zum Nachweis von CKIε in ihnen verzichtet wurde. In Kapitel 4.2.3 wird auf Lokalisation und Expression von CKIε in paraffineingebetteten Geweben näher eingegangen und die Untersuchungsergebnisse detailliert dargestellt.

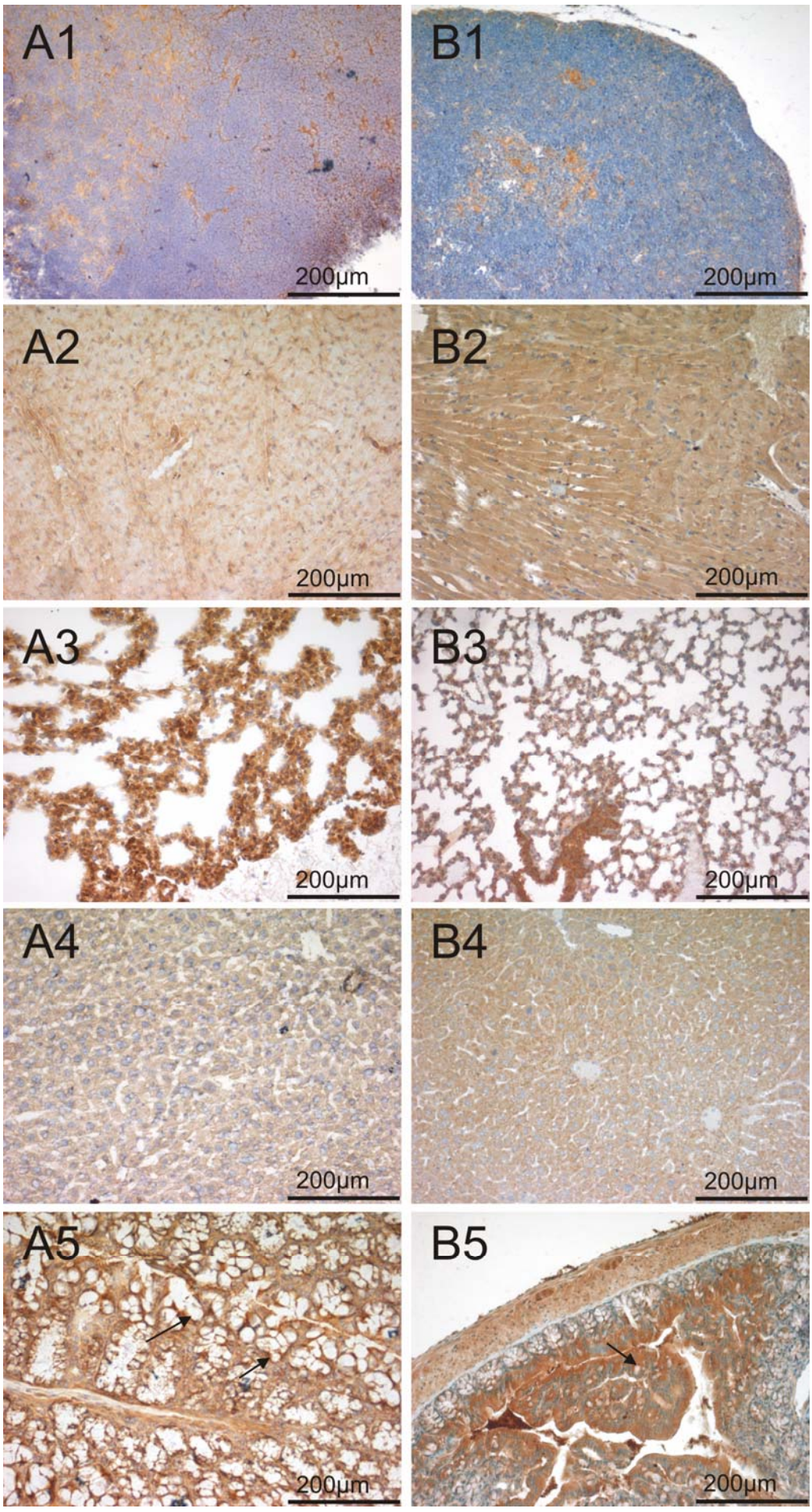

A1
200µm
B1
200µm
A2
200µm
B2
200µm
A3
200µm
B3
200µm
A4
200µm
B4
200µm
A5
200µm
B5
200µm

Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in Gefrierschnitten (A) und in paraffin-eingebettetem Gewebe (B). Detektion von CKIε durch den Antikörper 712, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Vergr. 10fach. **(A1/B1): Nachweis von CKIε im Thymus einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.** (**A1**: Gefrierschnitt **B1**: Paraffinschnitt, Immersionsfixation mit saurem Formalin). Eine positive Markierung auf CKIε ist deutlich in den epithelialen Zellen im Mark und in Makrophagen nachzuweisen. Die Thymozyten sind größtenteils CKIε negativ und wirken im Gefrierschnitt, als wären sie miteinander verschmolzen. **(A2/B2): Nachweis von CKIε im Herz einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.** (**A2**: Gefrierschnitt **B2**: Paraffinschnitt, Immersionsfixation mit saurem Formalin). In den Herzmuskelzellen ist CKIε eindeutig detektierbar. Im Gefrierschnitt fällt die spezifische Färbung im Vergleich zu derjenigen im Paraffinschnitt etwas schwächer aus. Die Querstreifung und die morphologischen Details sind im Gefrierschnitt schlecht zu erkennen. **(A3/B3): Nachweis von CKIε in der Lunge einer 5 Wochen alten BALB/c Maus.** (**A3**: Gefrierschnitt **B3**: Paraffinschnitt, Immersionsfixation mit saurem Formalin). Im Paraffinschnitt ist eine positive Farbreaktion auf CKIε in den Alveolarmakrophagen und den Pneumozyten Typ II nachweisbar. Im Gefrierschnitt ist eine Färbung vorhanden, die einzelnen Zellen der Lunge sind aber nicht eindeutig zu differenzieren. **(A4/B4): Nachweis von CKIε in der Leber einer 5 Wochen alten BALB/c Maus.** (**A4**: Gefrierschnitt **B4**: Paraffinschnitt, Immersionsfixation mit saurem Formalin). Im Gefrier- und im Paraffinschnitt ist CKIε in den Hepatozyten gut detektierbar. Die morphologischen Details sind im Paraffinschnitt besser erhalten. **(A5/B5): Nachweis von CKIε im Kolon einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.** (**A5**: Gefrierschnitt **B5**: Paraffinschnitt, Immersionsfixation mit saurem Formalin). Die Oberflächenepithelzellen und die Becherzellen (Pfeile) zeigen eine starke Expression von CKIε. Die Strukturen und der Aufbau des Kolon sind im Paraffinschnitt besser erkennbar.

4.2.2 Nachweis der Expression von CKIε in Paraffinschnitten

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel gezeigt, ist der Erhalt des Gewebes und der morphologischen Details in paraffineingebettetem Gewebe deutlich besser als in Gefrierschnitten.

Für die Beurteilung der gewebespezifischen Lokalisation und Expression von CKIε wurden deshalb in dieser Arbeit die immunhistochemischen Färbungen der Paraffinschnitte herangezogen.

4.2.2.1 Optimierung der Antigendarstellung in Paraffinschnitten

Zum Nachweis von CKIε in Paraffinschnitten wurden die CKIε spezifischen Antikörper 712 und sc-25423 eingesetzt. In Abbildung 8 wird anhand einiger Beispiele gezeigt, dass beide Antikörper in den meisten Fällen in den immunhistochemischen Färbeergebnissen übereinstimmen.

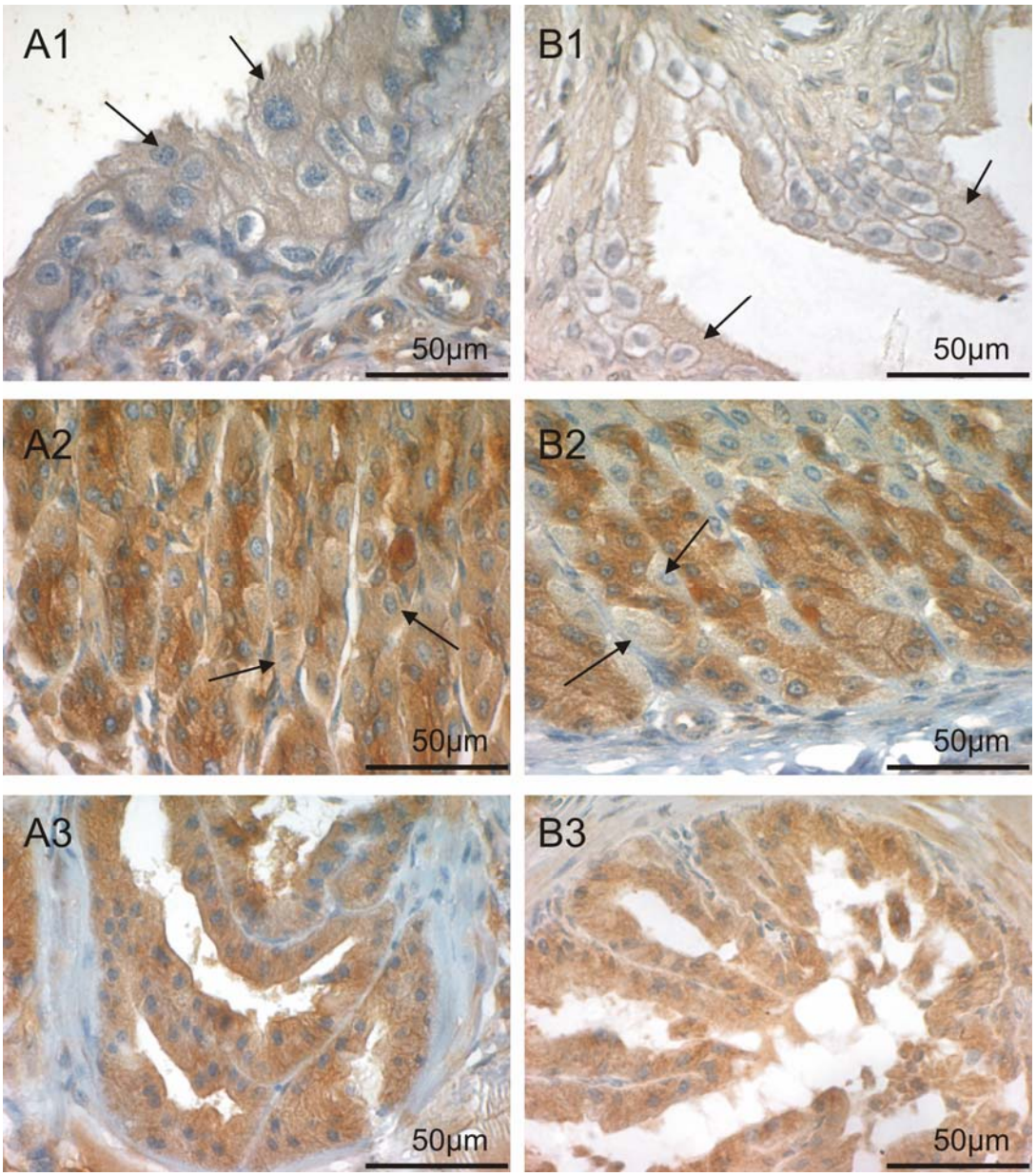


Abbildung 8: Vergleich der beiden Casein Kinase Iε (CKIε) spezifischen Antikörper 712 (A) und sc-25423 (B). Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Vergr. jeweils 40fach. **(A1/B1): Immunhistochemischer Nachweis von CKIε in der Harnblase einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.** Bei beiden Antikörpern ergibt sich eine positive Markierung auf CKIε im Urothel der Blase, wobei die oberflächlichen Deckzellen (Pfeile) eine mäßige, die basalen Zellen eine eher schwache Färbung aufweisen. (**A1**: Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. **B1**: Detektion von CKIε durch den Antikörper sc-25423.). **(A2/B2): Immunhistochemischer Nachweis von CKIε im Magen einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.** Im Magen ist mit beiden Antikörpern eine starke Expression von CKIε in den Hauptzellen detektierbar. Die großen Parietalzellen (Pfeile) dazwischen sind schwächer auf CKIε angefärbt. (**A2**: Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. **B2**: Detektion von CKIε durch den Antikörper sc-25423.). **(A3/B3): Immunhistochemischer Nachweis von CKIε in der Prostata einer 5 Wochen alten BALB/c Maus.** Zu sehen sind Ausschnitte aus der Prostata, deren Epithel sich bei beiden Antikörpern mäßig bis stark auf CKIε anfärbt. (**A3**: Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. **B3**: Detektion von CKIε durch den Antikörper sc-25423.).

Für eine Antigenerkennung durch die verwendeten Antikörper und um gute immunhistochemische Färbeergebnisse zu erhalten, ist es unerlässlich, einen möglichst guten Erhaltungszustand der Antigene in den zu untersuchenden

Geweben sicherzustellen. Ein erster wichtiger Schritt ist dabei eine rasche Fixierung der entnommenen Organe, um eine Autolyse und damit eine Zerstörung der Antigene zu verhindern. Außerdem spielen Dauer und Temperatur des Fixierungsprozesses sowie die verwendete Fixierungslösung und deren pH-Wert eine entscheidende Rolle beim Antigenerhalt (Williams et al. 1997).

Für diese Arbeit wurde als Fixationsmethode die Immersionsfixation gewählt, da sie einfach durchführbar ist, gute Ergebnisse liefert und sich bereits beim Nachweis von CKIδ in Mausorganen bewährt hat (Lohler et al. 2009). Als Fixierungslösung wurde saures Formalin gewählt, da gezeigt wurde, dass dies den besten Antigenerhalt für die Mehrheit der Antigene liefert (Williams et al. 1997).

Während des Fixierungsprozesses der Gewebe kommt es häufig zu chemischen Veränderungen der Antigene. Da dies für einige Antigene durch eine Hitzebehandlung rückgängig gemacht werden kann (Cuevas et al. 1994; Shi et al. 1997), ist die sogenannte Hitzedemaskierung eine in der Immunhistologie häufig angewandte Technik (Pileri et al. 1997). Es wird vermutet, dass der Hauptmechanismus der hitzeinduzierten Antigendemaskierung die Spaltung von inter- und intramolekularen Methylenbrücken ist, welche zum Beispiel durch Formalin induziert werden (Emoto et al. 2005). Die am häufigsten eingesetzte Demaskierungslösung ist Citratpuffer (pH 6,0) (Brown and Chirala 1995; Shi et al. 1991). Er liefert für viele Antigene gute Ergebnisse (Emoto et al. 2005). Allerdings wurde auch gezeigt, dass das Ergebnis der Antigendemaskierung stark vom pH-Wert der eingesetzten Demaskierungslösung abhängig ist (Emoto et al. 2005).

Für diese Arbeit wurde die hitzeinduzierte Antigendemaskierung der Paraffinschnitte in einer Mikrowelle durchgeführt. Als Demaskierungslösung wurde Citratpuffer (pH 6,0) eingesetzt, der sich für die hier verwendeten Antikörper bewährt hat und gute Ergebnisse erbrachte (siehe Material und Methoden).

4.2.3 Lokalisation von CKIε in den Organen der Maus

In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse der zur Charakterisierung der gewebespezifischen Expression und Lokalisation von CKIε immunhistochemisch untersuchten Organe 4-6 Wochen alter BALB/c Mäuse dargestellt und genau erläutert. Die verschiedenen Organe sind dabei nach Organsystemen zusammengefasst und zusätzlich auch tabellarisch dargestellt. Da die beiden CKIε spezifischen Antikörper gleiche oder sehr ähnliche Markierungsmuster aufweisen (siehe Abbildung 8), sind exemplarische Abbildungen von nur einem Antikörper gezeigt.

4.2.3.1 Expression von CKIε in Binde-, Stütz- und Muskelgewebe

Da die verschiedenen Arten von Bindegewebe und auch Stütz- und Muskelgewebe nicht auf ein Organsystem beschränkt sind und an vielen Stellen im Körper vorkommen, werden diese Gewebe in einem eigenen Kapitel im Voraus abgehandelt.

Gemeinsames Merkmal der Binde- und Stützgewebe ist, dass ihre Zellen oft weit auseinander liegen und der dadurch entstehende interstitielle Raum mit Flüssigkeit und mit von den jeweils spezifischen Bindegewebszelltypen produzierter Extrazellulärmatrix gefüllt ist (Lüllmann-Rauch 2006b).

Kollagenes Bindegewebe kommt in der Haut, in Gefäß- und Nervenscheiden, im Stroma der epithelialen Organe, sowie in Verschiebeschichten der Wände von Hohlorganen und in der Lamina propria unter Epithelschichten vor. Die spezifische Bindegewebszelle ist der Fibroblast. Er produziert eine Matrix, deren Hauptbestandteile Kollagenfibrillen, elastische Fasern, Adhäsionsproteine, Proteoglykane und Glykosaminoglykane sind (Lüllmann-Rauch 2006b).

In den meisten Fibroblasten lässt sich CKIε nicht nachweisen. In einigen Fällen wurde jedoch eine perinukleäre Lokalisation von CKIε detektiert (keine Abbildung).In der Matrix gibt es überwiegend Bereiche mit negativer, aber auch Bereiche mit schwach positiver CKIε spezifischer Farbreaktion.

Tabelle 4: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in Binde-, Stütz- und Muskelgewebe. Die Detektion von CKIε wurde evaluiert anhand der Intensität der spezifischen Farbreaktion der verwendeten CKIε spezifischen Antikörper 712 und sc-25423. Die verwendete Skalierung: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark. Angaben mit Schrägstrich (z.B. -/+ oder ++/+++) bedeuten ein heterogenes Expressionsmuster, in dem Zellen mit den verschiedenen, jeweils genannten Farbintensitäten zu finden sind.

Gewebe- / Zelltyp	712	sc-25423
Binde-/ Stützgewebe		
Fibroblasten	-/+	-/+
Matrix der Bindegewebe	-/+	-/+
Chondrozyten	-	-
Knorpelmatrix	-	-
Osteoblasten	+++	+++
Osteozyten	+	+
Knochenmatrix	-	-
Fettgewebe		
Adipozyten (univakuolär)	+/++	+/++
Adipozyten (plurivakuolär)	++	++
Muskelgewebe		
Skelettmuskelfasern	-/++	-/++
Herzmuskelzellen	-/++	-/++
Glatte Muskelzellen	++	++

Die Stützgewebe des Körpers sind Knorpel und Knochen.

Die spezifische Knorpelzelle ist der Chondrozyt. Dieser bildet die weiträumige Knorpelmatrix, welche hauptsächlich aus Kollagenen und Hyaluronsäure besteht (Welsch 2006b). Weder Chondrozyten, noch Matrix zeigen eine Expression von CKIε (siehe Abbildung 9).

Die Matrix der Knochen ist mineralisiert und besteht größtenteils aus Kollagen und Hydroxylapatit-Kristallen. Sie macht den Knochen druckfest. Eine Expression von CKIε kann nicht nachgewiesen werden. Im Knochen ist CKIε hingegen in den knochenbildenden Osteoblasten detektierbar, welche eine intensive zytoplasmatische und auch nukleäre Positivität auf CKIε zeigen. In den ruhenden, komplett von Knochenmatrix eingemauerten Osteozyten ist die Markierung auf CKIε schwach (siehe Abbildung 10).

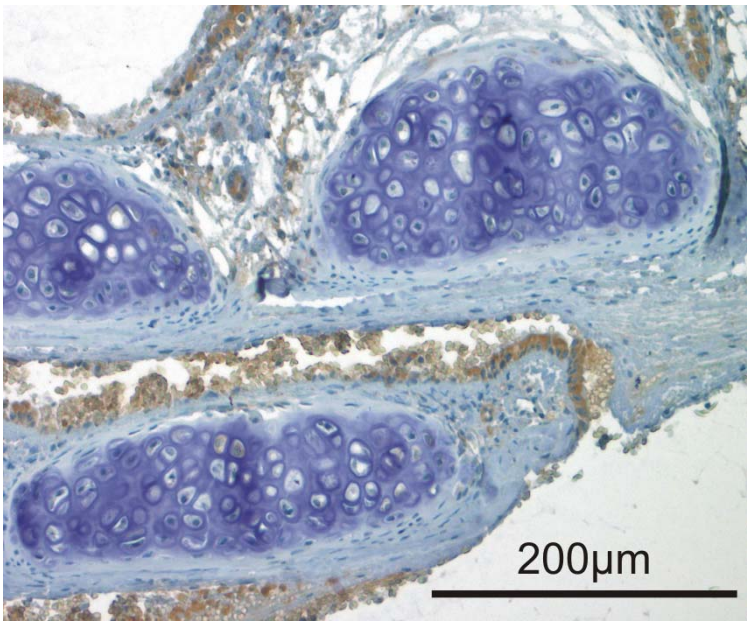


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Knorpel einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Im Knorpelgewebe ist CKIε nicht nachweisbar. Vergr. 10fach.

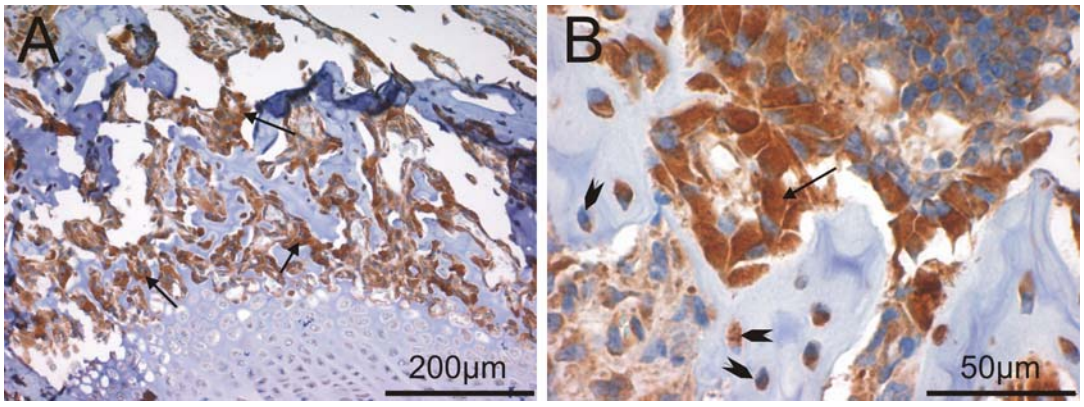


Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Knochen einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε wurde detektiert mittels Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):**Die Osteoblasten (Pfeile) zeigen eine starke Färbung auf CKIε, die Knochenmatrix ist dagegen nicht angefärbt. Vergr. 10fach. **(B):** Die Pfeilspitzen deuten auf Osteozyten, die nur noch schwach CKIε exprimieren. Vergr. 40fach.

Fettgewebe wird üblicherweise zum Bindegewebe gezählt. Es besteht aus Adipozyten und tritt in zwei Varianten auf. Weit verbreitet ist das weiße, univakuoläre Fettgewebe, dessen Zellen groß und kugelförmig sind. Diese besitzen nur einen schmalen Zytoplasmasaum und einen flachen, an den Rand gedrängten Kern. In ihrem Zytoplasmasaum ist eine Farbreaktion auf CKIε erkennbar (dargestellt in Abbildung 11 A).

Das braune, plurivakuoläre Fett dient der Wärmeproduktion und erscheint durch einen hohen Mitochondriengehalt braun (Lüllmann-Rauch 2006b). Die Adipozyten

sind etwas kleiner und enthalten viele Lipidtröpfchen. Bei ihnen ist die zytoplasmatische Anfärbung auf CKIε etwas deutlicher als im weißen Fettgewebe (zu sehen in Abbildung 11 B).

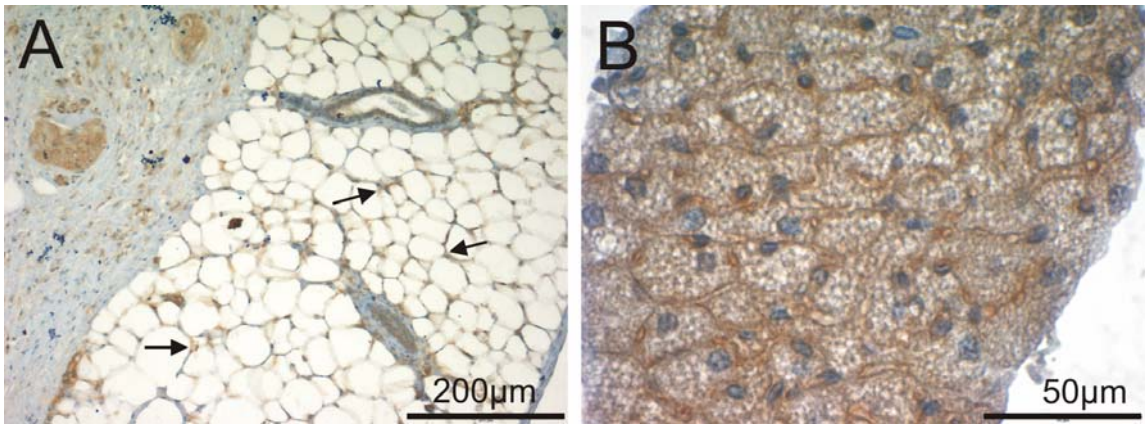


Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Fettgewebe einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** In den univakuolären Zellen des weißen Fettgewebes ist der Zytoplasmasaum nur sehr schmal. Dennoch ist in diesem eine Anfärbung auf CKIε zu erkennen (Pfeile). Vergr. 10fach. **(B):** Zu sehen ist braunes Fettgewebe, das eine positive Färbung auf CKIε aufweist. Vergr. 40fach.

Es gibt drei verschiedene Arten von Muskelgewebe: die Skelettmuskulatur, die Herzmuskulatur und die glatte Muskulatur. Die ihnen gemeinsame wichtigste Eigenschaft ist die ausgeprägte Fähigkeit zur Kontraktion.

Die Skelettmuskulatur ist in erster Linie die Muskulatur des Bewegungsapparates. Man findet sie aber auch an anderen Stellen des Körpers, die willkürlich bewegt, bzw. kontrahiert werden können, so zum Beispiel in der Zunge. Sie wird innerviert vom somatischen Nervensystem. Die ortständigen Zellen sind die langen, vielkernigen Muskelfasern. Typisch ist die mikroskopisch sichtbare Querstreifung der vielen hundert aneinander gelagerten Myofibrillen in jeder Faser.

Ebenfalls quergestreift ist die Herzmuskulatur. Organisation und Aufbau des Kontraktionsmechanismus gleichen dem der Skelettmuskulatur. Allerdings sind die Herzmuskelzellen kleiner, meist einkernig und sie verzweigen sich dreidimensional. An ihren Enden sind sie über Kontaktstrukturen miteinander verknüpft, wodurch die so genannten Glanzstreifen entstehen, die in der Abbildung 12 D zu erkennen sind. Das Herz besitzt außerdem spezielle modifizierte Muskelzellen, die ein herzeigenes Erregungsbildungszentrum und

Erregungsleitungsbahnen bilden. Diese Strukturen und Zellen wurden in dieser Arbeit aber nicht näher untersucht.

Sowohl in der Skelettmuskulatur, als auch in der Herzmuskulatur lässt sich ein heterogenes Expressionsmuster für CKIε nachweisen. Der überwiegende Teil der Muskelzellen zeigt eine mittelgradige zytoplasmatische Markierung auf CKIε. Dazwischen treten aber auch immer wieder CKIε negative Muskelzellen auf.

In der glatten Muskulatur konnte CKIε im Zytoplasma aller Zellen nachgewiesen werden. Allerdings variiert die Intensität der Farbreaktion von Organ zu Organ teilweise leicht. Glatte Muskulatur findet sich in der Wand der meisten Hohlorgane. Sie kontrahiert sich langsamer und ausgiebiger als quergestreifte Muskulatur und wird über das vegetative Nervensystem innerviert.

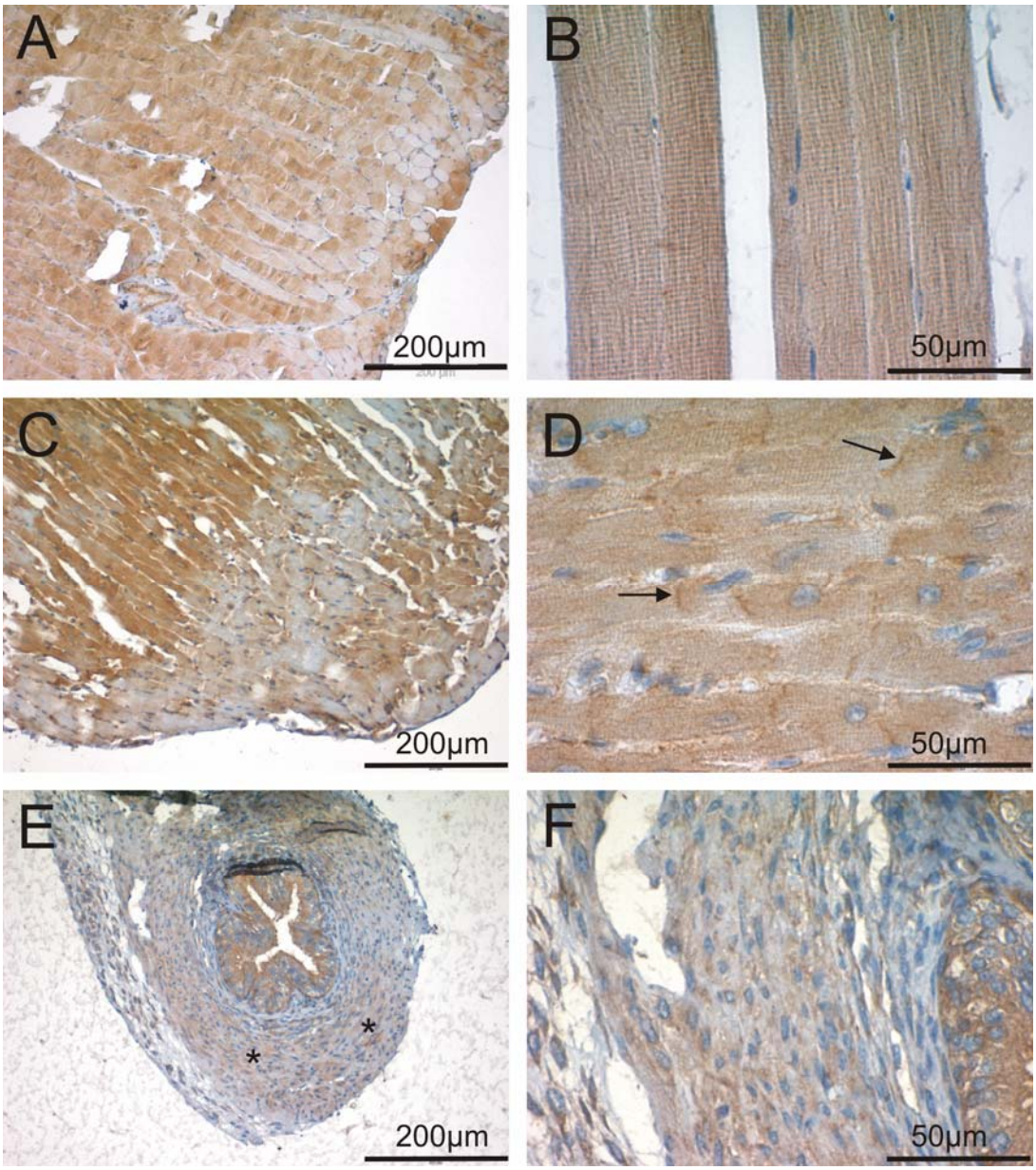


Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Muskelgewebe einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Im gezeigten Ausschnitt der Skelettmuskulatur zeigt sich die heterogene Farbreaktion auf CKIε. Vergr. 10fach. **(B):** Bei stärkerer Vergrößerung ist die Querstreifung der Skelettmuskulatur gut zu erkennen. Vergr. 40fach. **(C):** In der hier dargestellten Herzmuskulatur ist das heterogene Markierungsmuster mit CKIε positiven und CKIε negativen Muskelzellen zu sehen. Vergr. 10fach. **(D):** Besonders stark ist die Anfärbung an den Glanzstreifen (Pfeile) in der Herzmuskulatur. Vergr. 40fach. **(E):** Die Stärke der Anfärbung der glatten Muskulatur variiert von Organ zu Organ leicht. In der Abbildung ist glatte Muskulatur der Tunica muscularis (Stern) des Ductus deferens mit mäßigem Nachweis von CKIε zu sehen. Vergr. 10fach. **(F):** Der stärker vergrößerte Ausschnitt aus der Tunica muscularis des Ductus deferens lässt die positive Farbreaktion auf CKIε besser erkennen. Vergr. 40fach.

4.2.3.2 Expression von CKIε in den Kreislauforganen

Das Herz-Kreislaufsystem ist bei allen Säugetieren nach demselben Prinzip aufgebaut. Zu den Kreislauforganen gehören das Herz, das bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde, die Blut- und die Lymphgefäße.
Die Wand der meisten Blutgefäße ist aus Intima, Media und Adventitia aufgebaut. Alle Gefäße sind vom Endothel, einer einschichtigen Zelllage, ausgekleidet.

Tabelle 5: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den Kreislauforganen. Der Nachweis von CKIε wurde anhand der Intensität der spezifischen Farbreaktion der verwendeten CKIε spezifischen Antikörper 712 und sc-25423 evaluiert. Die verwendete Skalierung: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark.

Gewebe- / Zelltyp	712	sc-25423
Gefäßendothel		
Arterien	++	++
Venen	+	+
Lymphgefäße	+	+
Hohe endotheliale Venolen	++	++

In allen Gefäßendothelien wird CKIε exprimiert. Die spezifische Farbreaktion ist dabei im Endothel der arteriellen Gefäße am deutlichsten, gefolgt vom Endothel der hohen endothelialen Venolen (HEV). Im Endothel der Lymphgefäße und der Venen fällt die Färbung dagegen schwächer aus.

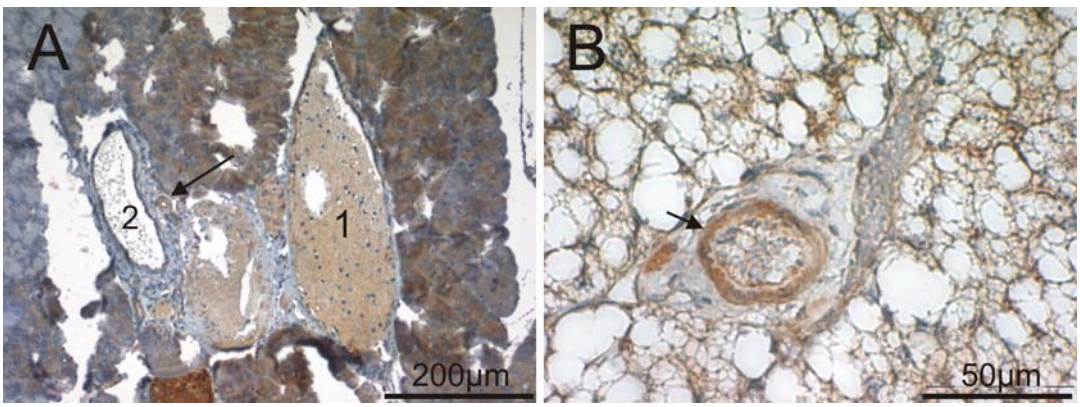


Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Gefäßendothel einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Zu sehen sind eine Arteriole (Pfeil), eine Vene (1) und ein Lymphgefäß (2). Das Endothel der Arteriole zeigt eine mäßige Färbung auf CKIε, bei Vene und Lymphgefäß ist sie nur schwach. Vergr.10fach. **(B):** Sowohl die Muskelschicht der kleinen Arterie (Pfeil), als auch ihr Endothel lassen eine mäßige CKIε-Expression erkennen. Vergr.40fach.

4.2.3.3 Expression von CKIε in den lymphatischen Organen

In den lymphatischen Organen ist keine gleichmäßige Expression von CKIε nachweisbar. Insgesamt zeigt bei der immunhistochemischen Untersuchung der lymphatischen Organe der Antikörper 712 häufig eine intensivere Markierung für CKIε als der Antikörper sc-25423.

CKIε ist in den lymphatischen Organen vorrangig in den neben den lymphatischen Zellen ebenfalls zu findenden Makrophagen, Megakaryozyten und epithelialen Zellen nachweisbar. Diese Zellen zeigen einen mäßigen bis hohen Expressionsgrad von CKIε.

Tabelle 6: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in lymphatischem Gewebe. Die Detektion von CKIε wurde evaluiert anhand der Intensität der spezifischen Farbreaktion der verwendeten CKIε spezifischen Antikörper 712 und sc-25423. Die verwendete Skalierung: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark. Angaben mit Schrägstrich (z.B. -/+ oder ++/+++) bedeuten ein heterogenes Expressionsmuster, in dem Zellen mit den verschiedenen, jeweils genannten Farbintensitäten zu finden sind.

Gewebe- / Zelltyp	712	sc-25423
Knochenmark		
Megakaryozyten	++/+++	++
Zellen der Hämatopoese	-/+/++	-/+/++
Makrophagen	+++	++
Retikulumzellen	++	++
Thymus		
Thymozyten im Cortex	-/+	-/+
Medulla Thymozyten Epitheliale Zellen Makrophagen	 -/+ ++/+++ +++	 -/+ ++/+++ ++
Milz		
Megakaryozyten	+++	++
Makrophagen	+++	+++
Weiße Pulpa	-/+	-/+
Rote Pulpa	++	++

Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe		
Lymphozyten	-/+	-/+
Epitheliale Zellen	+	+
Makrophagen	++	++
Lymphknoten		
Lymphozyten Primärfollikel	-	-
Lymphozyten Keimzentrum	++	+/++
Lymphozyten Mantelzone	-	-
T-Zone Lymphozyten	+	+/++
Makrophagen	+++	++

Das Knochenmark ist Ort der Hämatopoese (Abbildung 14).

Neben einer starken Markierung der Makrophagen und Megakaryozyten sind Retikulumzellen angefärbt, die das Stützgerüst des blutbildenden Knochenmarks darstellen. Die Zellen der Hämatopoese befinden sich in unterschiedlichen Reifestadien. Ihr genauer Reifegrad ist schwer zu differenzieren und es sind nur vereinzelt Blutzellen angefärbt.

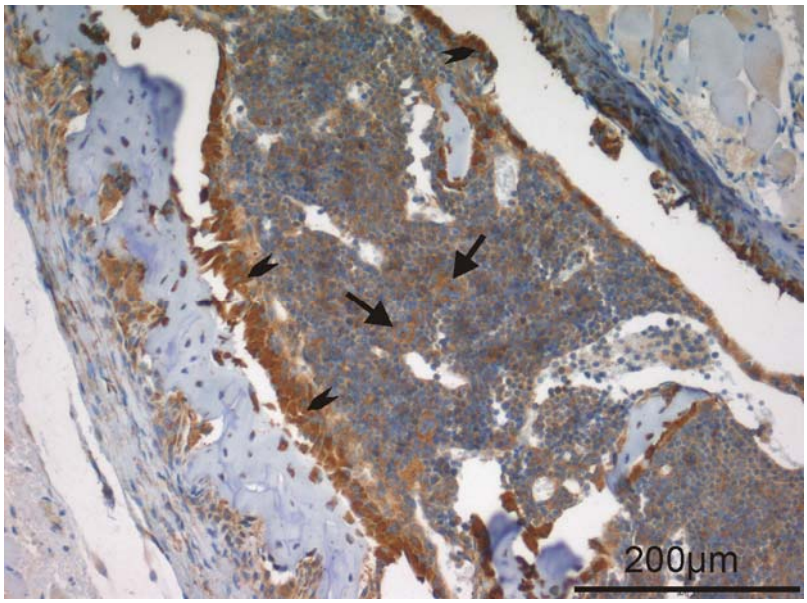


Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Knochenmark einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Die Pfeile deuten auf CKIε positive Megakaryozyten im Knochenmark. Bei den stark auf CKIε angefärbten Zellen am Rande des Knochenmarks handelt es sich um Osteoblasten (Pfeilspitzen). Vergr. 10fach.

Der Thymus gilt als primäres lymphatisches Organ des T-Zellsystems.
Beim Menschen erreicht er sein maximales Gewicht im Kindesalter und bildet sich im Laufe der Pubertät bis auf einige Reste zurück (Lüllmann-Rauch 2006a). Der Thymus der Maus ist mit Erreichen der sexuellen Reife voll entwickelt und bildet sich dann ebenfalls zurück, wobei bei der Maus diese Involution aber inkomplett ist (Conti et al. 2004).
Der histologische Aufbau des Thymus ist bei beiden Spezies ähnlich. Er hat eine durch Septen entstehende Pseudoläppchenstruktur und besteht aus einem epithelialen Grundgerüst, das mit Thymozyten besiedelt ist. Das Parenchym wird gegliedert in eine thymozytenreiche Rinde und in das Mark, in dem epitheliale und dendritische Zellen dominieren (Lüllmann-Rauch 2006a). Die im menschlichen Thymus auffallenden großen Hassall-Körperchen sind bei der Maus sehr klein und selten anzutreffen (Conti et al. 2004). In den Thymozyten konnte CKIε nur vereinzelt detektiert werden. Einen hohen Grad an CKIε-Expression zeigen die epithelialen Zellen und die Makrophagen (siehe Abbildung 15).

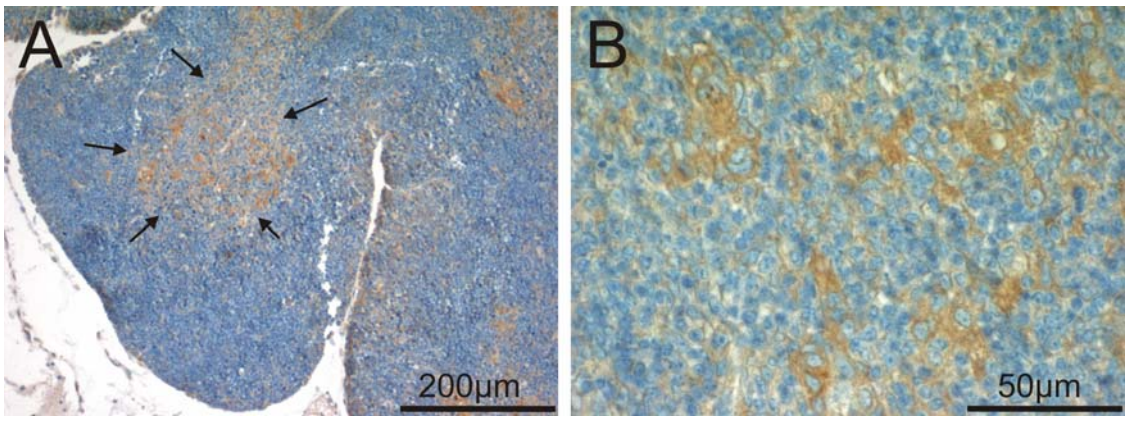


Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Thymus einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε-Detektion durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Eine Anfärbung auf CKIε zeigen in erster Linie die epithelialen Zellen, die vorwiegend im Mark zu finden sind (Pfeile). Im Cortex zeigen nur vereinzelte Thymozyten eine positive Markierung. Vergr. 10fach. **(B):** Der Ausschnitt aus der Medulla in stärkerer Vergrößerung verdeutlicht, dass vor allem die epithelialen Retikulumzellen CKIε exprimieren und die Thymozyten größtenteils CKIε negativ sind. Vergr. 40fach.

Das Organparenchym der Milz gliedert sich in rote und weiße Pulpa. Die weiße Pulpa stellt das lymphatische Gewebe dar, das die Lymphozyten enthält. CKIε konnte in der weißen Pulpa im größten Teil der Zellen nicht nachgewiesen werden. In der roten Pulpa dagegen zeigt sich eine Expression von CKIε. Die rote Pulpa wird von vielen venösen Blutsinus durchzogen und dient vor allem der

Aussonderung veränderter oder alter Blutzellen. Bei der Maus ist sie zudem Ort lebenslanger extramedullärer Blutbildung (Conti et al. 2004), was auch das Auftreten der Megakaryozyten erklärt, die durch eine starke Markierung auf CKIε ins Auge fallen (zu sehen in Abbildung 16 B).

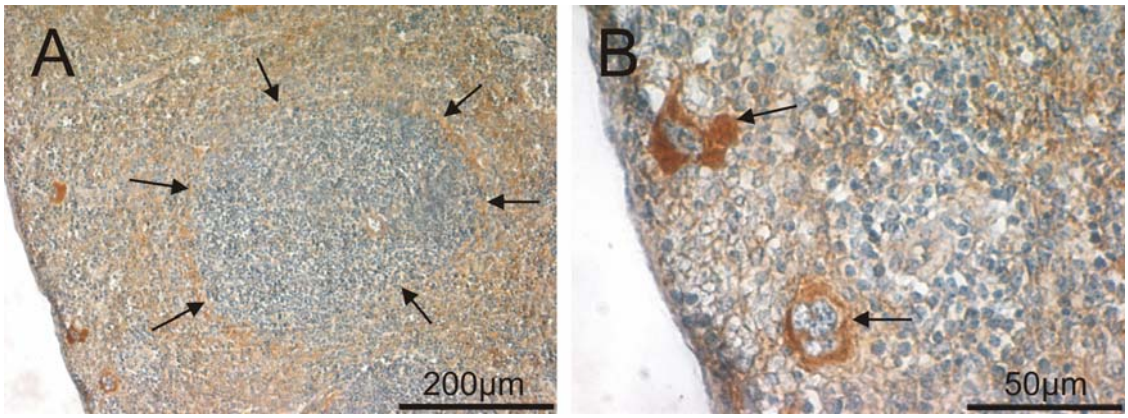


Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Milz einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε wurde detektiert mittels Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Im Übersichtsbild ist eine stärker positive Reaktion auf CKIε der roten Pulpa im Vergleich zur weißen Pulpa zu erkennen. Die weiße Pulpa ist saumartig von stark auf CKIε angefärbten Makrophagen (Pfeile) umgeben. Vergr. 10fach. **(B):** In der Milz zeigen die Megakaryozyten (Pfeile) am deutlichsten eine Farbreaktion auf CKIε. Vergr. 40fach.

Zum Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe gehören die sogenannten Peyer-Plaques in der Wand des Ileums und des Wurmfortsatzes, sowie die in der Schleimhaut des ganzen Verdauungstrakts auftretenden solitären Lymphfollikel. In Abbildung 17 ist ein solcher Follikel dargestellt. Die im Follikel verstreuten Makrophagen zeigen eine Farbreaktion auf CKIε. Vereinzelt sind auch Lymphozyten angefärbt. Zudem kann CKIε eindeutig im Endothel der HEV detektiert werden, wie bei höherer Vergrößerung in der Abbildung 17 B zu sehen ist.

Das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe gehört eigentlich zur Gesamtheit des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT), zu dem das organisierte lymphatische Gewebe der Schleimhäute gehört. Exemplarisch für das MALT wird nachfolgend das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe untersucht.

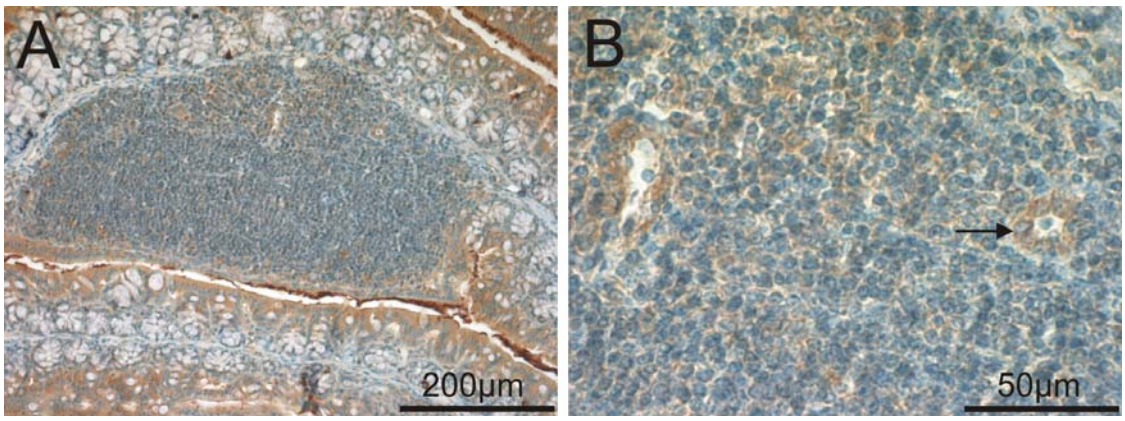


Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Das Bild zeigt einen Lymphfollikel im Kolon. Der größte Teil des Lymphozyten präsentiert sich CKIε negativ. Außerdem sind im Gewebe verstreute Makrophagen deutlich CKIε positiv. Vergr. 10fach. **(B):** Stärker vergrößerter Ausschnitt des Follikels. Das Endothel der im Follikel befindlichen hochendothelialen Venolen (Pfeile) zeigt ebenfalls eine Anfärbung auf CKIε. Vergr. 40fach.

Lymphknoten sind im ganzen Körper als Filterstationen in das Lymphgefäßsystem eingebaut. Sie sind in Rinde und Mark gegliedert. Die Lymphozyten in der im Rindenbereich lokalisierten B-Zone zeigen nur in den Keimzentren von Sekundärfollikeln eine Farbreaktion auf CKIε. In der die Keimzentren umgebenden Mantelzone und in Primärfollikeln sind die Lymphozyten CKIε negativ. Die T-Zone Lymphozyten zeigen dagegen fast durchgehend eine schwache Färbung. Eine starke Expression auf CKIε zeigen die Makrophagen, die vor allem im Randsinus angesammelt sind.

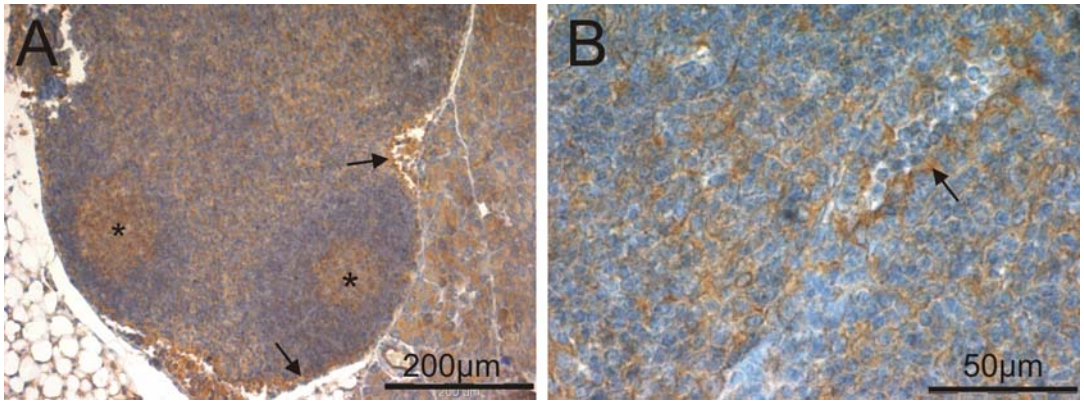


Abbildung 18: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Lymphknoten einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε wurde detektiert mittels Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Besonders die im Marginalsinus zu findenden Makrophagen und Plasmazellen (Pfeile) zeigen eine starke Markierung für CKIε. Im Bild sind außerdem zwei Sekundärfollikel mit mäßig CKIε positiven Keimzentren (Sterne) und diese umgebenden CKIε negativen Mantelzonen zu sehen. Die Lymphozyten im Bereich der T-Zone zeigen wieder eine positive Reaktion. Vergr. 10fach. **(B):** Im Bild zu sehen ist eine schräg angeschnittene hohe endotheliale Venole, deren Endothel (Pfeil) CKIε positiv ist. Vergr. 40fach.

4.2.3.4 Expression von CKIε in den Atmungsorganen

Die Lunge ist das Atmungsorgan des Organismus, das den Gasaustausch zwischen Luft und Blut bewältigt. Dieser Austausch findet im Bereich der belüfteten Alveolen statt. Ihnen vorgeschaltet sind die extrapulmonalen Atemwege Nasenhöhle, Pharynx, Larynx, Trachea und Hauptbronchien, sowie die intrapulmonalen Atemwege des Bronchialbaums (Lüllmann-Rauch 2006a).

Tabelle 7: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den Atmungsorganen. Die Stärke der Expression wurde anhand der Farbintensität nach immunhistochemischer Färbung mit den CKIε spezifischen Antikörpern 712 und sc-25423 beurteilt. Die verwendete Skalierung: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark. Angaben mit Schrägstrich (z.B. -/+ oder ++/+++) bedeuten ein heterogenes Expressionsmuster, in dem Zellen mit den verschiedenen, jeweils genannten Farbintensitäten zu finden sind.

Gewebe- / Zelltyp	712	sc-25423
Larynx		
Respiratorisches Epithel	+++	+++
Drüsen mukös serös	 ++ -/+	 ++ -/+
Trachea/ Hauptbronchien		
Respiratorisches Epithel	+++	+++
Glandulae tracheales	+	+
Lunge		
Pleura	+	+
Pneumozyten Typ I	+	+
Pneumozyten Typ II	++	++
Alveolarmakrophagen	+++	++
Epithel der Bronchioli	+++	++

Das respiratorische Epithel der Atemwege ist ein mehrreihiges, hochprismatisches Flimmerepithel mit Becherzellen. In allen für diese Arbeit untersuchten Abschnitten der Atemwege zeigt sich eine deutliche Anfärbung von CKIε in den Zellen dieses Epithels.

Die in der Schleimhaut des Larynx liegenden Drüsen lassen in den mukösen Anteilen eine Expression von CKIε erkennen, die serösen Anteile sind nicht oder

nur sehr blass gefärbt. Die in der Wand der Trachea zu findenden Glandulae tracheales erscheinen schwach CKIε positiv (nicht gezeigt).

Das respiratorische Epithel der Bronchien und Bronchioli ist, wie in den anderen Abschnitten der Atemwege, stark CKIε positiv (siehe Abbildung 19 A). In der die Lunge umgebenden Pleura (nicht dargestellt) lässt sich eine schwache Expression von CKIε detektieren. In den Pneumozyten Typ I, welche das Oberflächenepithel der Alveolen bilden, war CKIε ebenfalls nur schwach detektierbar. In den Pneumozyten Typ II, kubische Zellen, die Surfactant produzieren, lässt sich CKIε eindeutig nachweisen. Noch stärker ist die Farbreaktion auf CKIε in den Alveolarmakrophagen, die in den Alveolen und den terminalen Luftwegen vereinzelt anzutreffen sind (gezeigt in Abbildung 19 B).

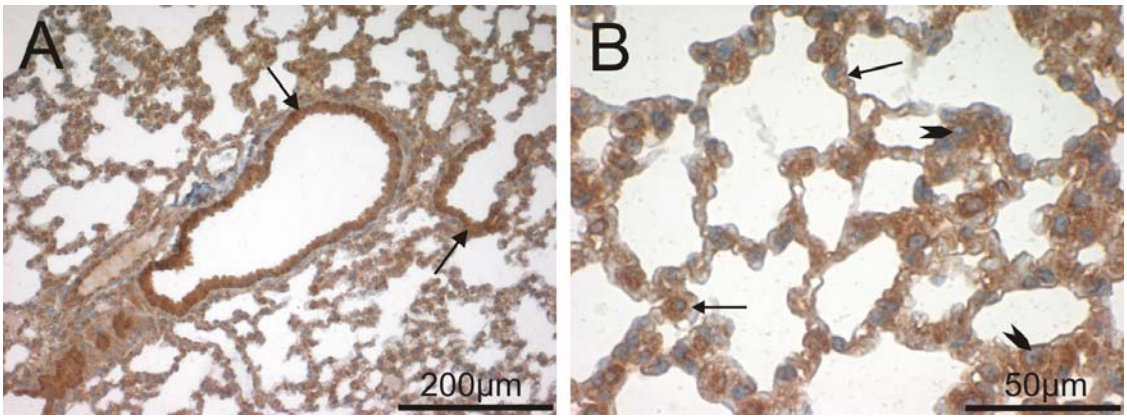


Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Lunge einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Das Epithel der Bronchiolen (Pfeil) zeigt eine starke Markierung auf CKIε. Zu sehen sind auch pulmonale Blutgefäße. Vergr. 10fach. **(B):** Bei den Alveolen zeigen die Pneumozyten Typ II (Pfeil) eine deutliche Farbreaktion auf CKIε, während sie bei den Pneumozyten Typ I nur schwach ausfällt. Stark angefärbt sind die Alveolarmakrophagen (Pfeilspitze). Vergr. 40fach.

4.2.3.5 Expression von CKIε in den Organen des Verdauungstraktes

Die in der Tabelle 8 aufgeführten Organe bilden den Rumpfteil des Verdauungskanals. Die Wand hat in allen Abschnitten grundsätzlich den gleichen Aufbau. Die äußerste Schicht ist die Serosa oder die Adventitia, deren mesotheliale Zellen eine schwache Expression von CKIε detektieren lassen, gefolgt von der Tunica muscularis, die aus einer Längs- und einer Ringmuskelschicht besteht. Es folgen die Tela submucosa und schließlich die

Tunica mucosa, die sich in Muscularis mucosae, Lamina propria und abschließend in das Oberflächenepithel gliedert (Lüllmann-Rauch 2006a).

Tabelle 8: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den Verdauungsorganen. Der Nachweis von CKIε wurde evaluiert anhand der Intensität der spezifischen Farbreaktion der verwendeten CKIε spezifischen Antikörper 712 und sc-25423. Die verwendete Skalierung: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark. Angaben mit Schrägstrich (z.B. -/+ oder ++/+++) bedeuten ein heterogenes Expressionsmuster, in dem Zellen mit den verschiedenen, jeweils genannten Farbintensitäten zu finden sind.

Gewebe- / Zelltyp	712	sc-25423
Ösophagus		
Oberflächenepithel		
Str. basale/parabasale	++	+
Str. intermedium	++	++
Str. superficiale	+++	+++
Magen		
Oberflächenepithel	++	+
Hauptzellen	+++	+++
Nebenzellen	+	+
Parietalzellen	+/++	+
Tela submucosa	-	-/+
Tunica muscularis	++	++
Dünndarm		
Enterozyten (Epithel)	+++	+++
Becherzellen	-/++	-/++
Paneth-Zellen	-/+	-/+
Tela submucosa	-	-/+
Tunica muscularis	++	++
Mesothel	+	+
Dickdarm		
Kolonozyten (Epithel)	+++	+++
Becherzellen	-/++	-/++
Tela submucosa	-	-/+
Tunica muscularis	++	++
Mesothel	+	+

Der Ösophagus (Abbildung 20) ist bei der Maus von mehrschichtigem, verhorntem Plattenepithel ausgekleidet, in dem eindeutig CKIε exprimiert wird. Am stärksten ist die Expression im luminalen Stratum superficiale des Epithels, während die spezifische Färbung sich über das mittlere Stratum intermedium zum Stratum

parabasale und Stratum basale hin abschwächt. Die dem Stratum superficiale aufliegende, abgeschilferte Hornschicht zeigt keinen Nachweis von CKIε.

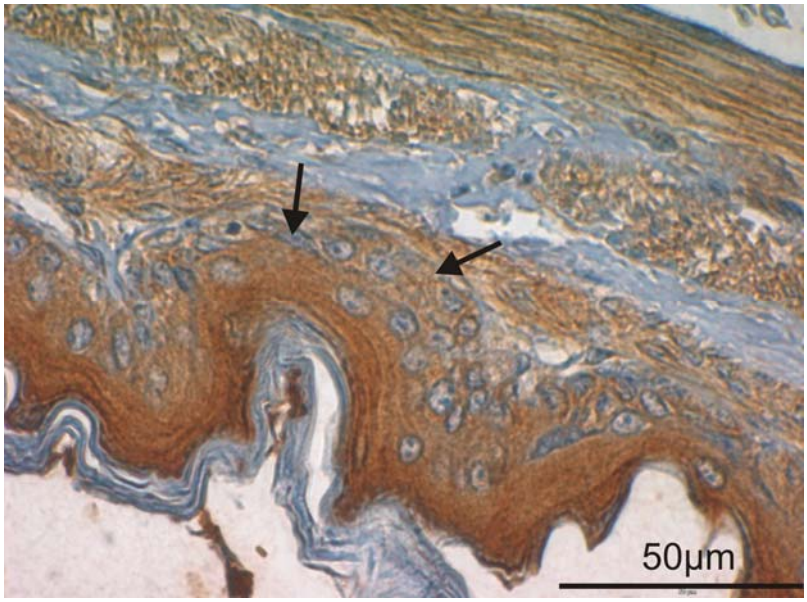


Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Ösophagus einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Die starke Expression von CKIε im mehrschichtigen verhornten Plattenepithel ist deutlich erkennbar. Die Pfeile deuten auf die etwas schwächer auf CKIε angefärbte basale Zellschicht. Vergr. 40fach.

Der Magen der Maus wird teilweise von verhorntem Plattenepithel mit starker Färbung auf CKIε ausgekleidet. Der größere übrige Bereich wird von einem einschichtigen prismatischen schleimbildenden Oberflächenepithel ausgekleidet, das eine schwache Markierung für CKIε aufweist. Darunter befinden sich tubuläre Magendrüsen, die je nach Magenabschnitt unterschiedlich aufgebaut sind. Die Drüsen des Korpus und Fundus machen den Hauptteil aus und enthalten fünf Zelltypen, nämlich endokrine Zellen, Stammzellen, Nebenzellen, Parietalzellen und Hauptzellen. Die endokrinen Zellen und die Stammzellen werden bei der Untersuchung auf CKIε nicht mit eingeschlossen, da sie im Epithel ohne Hilfsmittel nicht zu differenzieren sind.

Die Nebenzellen lassen kaum eine Färbung auf CKIε erkennen. Ihre Aufgabe ist die Produktion von Muzinen. Es sind schmale Zellen, die vor allem im Isthmus der Magendrüsen und in tieferen Regionen der Drüsen zwischen den Parietalzellen vorkommen.

Die Parietalzellen sind große Zellen, die hauptsächlich im oberen und mittleren Abschnitt der Magendrüsen vorkommen und die Salzsäure und den Intrinsischen

Faktor sezernieren. Sie zeigen eine teils leichte, teils mittelgradige Expression von CKIε (siehe Abbildung 21).
Die stärkste Expression ist in den Hauptzellen zu detektieren. Diese Drüsenzellen befinden sich im unteren Drüsendrittel und sezernieren Pepsinogene.
Außerdem lässt sich in der glatten Muskulatur des Magens, ebenso wie in den anderen Abschnitten des Verdauungskanals, CKIε eindeutig nachweisen.

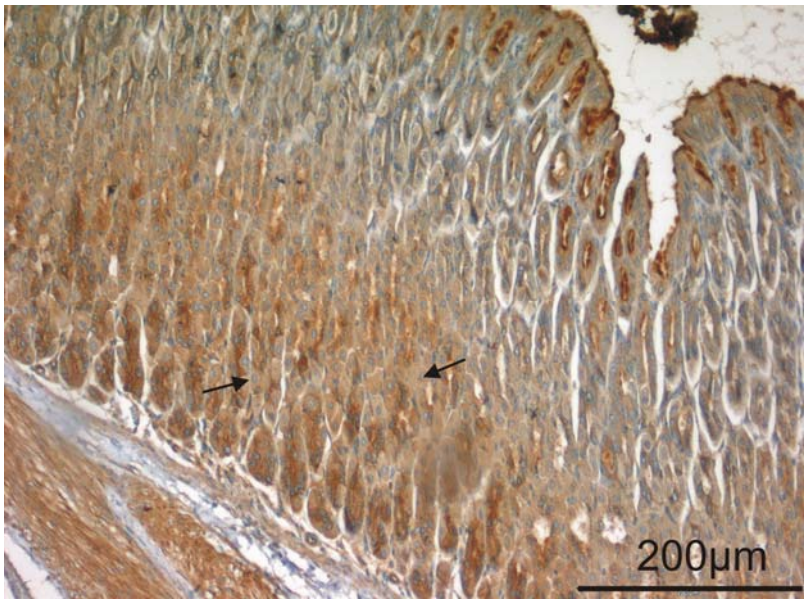


Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Magen einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Ausschnitt aus dem Magenfundus. In den längs angeschnittenen Glandulae gastricae ist eine deutlich positive Färbung auf CKIε in den Hauptzellen zu erkennen. Ebenfalls angefärbt, wenn auch etwas schwächer, sind die Parietalzellen (Pfeile), sowie die Nebenzellen, die eine schwach positive Markierung zeigen. Vergr. 10fach. In Abbildung 8 A2 sind sind die großen, CKIε positiven Parietalzellen (Pfeile) zwischen stark gefärbten Hauptzellen in stärkerer Vergrößerung sichtbar.

Der Dünndarm (Abbildung 22) besteht aus Duodenum, Jejunum und Ileum, die alle den gleichen Wandaufbau haben. Die Schleimhaut bildet Zotten und Krypten und trägt ein einschichtiges Zylinderepithel mit Bürstensaum. Es besteht aus Enterozyten, deren Zytoplasma stark auf CKIε angefärbt ist. Im Zytoplasmasaum der Becherzellen, die zahlreich im Epithel zu finden sind, ist größtenteils der Nachweis von CKIε gut möglich, teilweise stellen sich die Becherzellen jedoch auch CKIε negativ da. Nur schwach und auch nur zum Teil färben sich hingegen die am Kryptengrund liegenden, für den Dünndarm typischen Paneth-Zellen, die antimikrobielle Stoffe sezernieren und so der unspezifischen Immunabwehr dienen.

Die Zellen des Dickdarmepithels weisen das gleiche Expressionsmuster für CKIε auf wie die des Dünndarms. Die Schleimhaut bildet nur noch Krypten, Paneth-Zellen sind hier jedoch nicht mehr anzutreffen, Becherzellen sind dafür zahlreicher (siehe Abbildung 23).

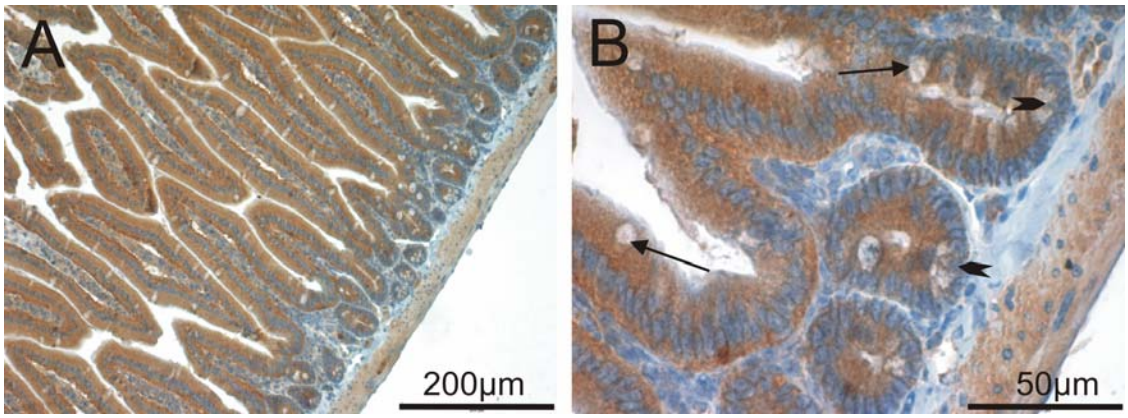


Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Dünndarm einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε-Detektion durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Längsschnitt durch die Zotten und Krypten. Starke Farbreaktion auf CKIε der Enterozyten des Dünndarmepithels. Vergr. 10fach. **(B):** Die Becherzellen (Pfeile) zeigen größtenteils eine zytoplasmatische Markierung auf CKIε, in den Paneth-Zellen (Pfeilspitzen) ist die Reaktion teils negativ, teils schwach positiv. Vergr. 40fach.

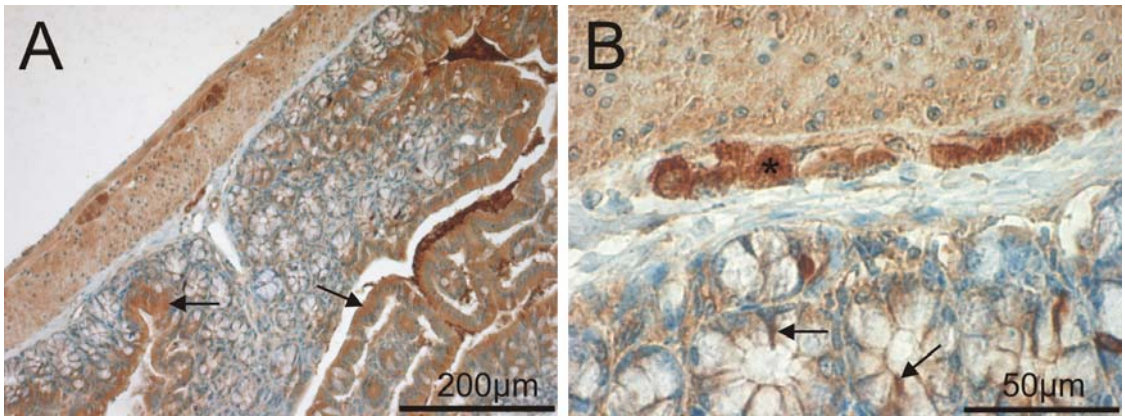


Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Kolon einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε wurde detektiert mittels Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Schnitt durch die Krypten. Deutlich zu erkennen ist die starke Färbung der Oberflächenepithelzellen (Pfeile). Vergr. 10fach. **(B):** Positive Reaktion auf CKIε im Zytoplasmasaum der Becherzellen (Pfeile). Außerdem zu sehen ist ein Anschnitt des Meissner-Plexus (Stern), ein Teil des enterischen Nervensystems. Die starke Anfärbung der Ganglienzellen auf CKIε im Plexus ist deutlich erkennbar. Vergr. 40fach.

4.2.3.6 Expression von CKIε in den Anhangsdrüsen des Verdauungssystems

Zu den Anhangsdrüsen des Verdauungssystems werden Drüsen gezählt, die Sekrete produzieren, welche der Verdauung dienen.

Tabelle 9: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den Anhangsdrüsen des Verdauungssystems. Die Stärke der Expression wurde anhand der Farbintensität nach immunhistochemischer Färbung mit den CKIε spezifischen Antikörpern 712 und sc-25423 beurteilt. Die verwendete Skalierung: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark. Angaben mit Schrägstrich (z.B. -/+ oder ++/+++) bedeuten ein heterogenes Expressionsmuster, in dem Zellen mit verschiedenen, jeweils genannten Farbintensitäten zu finden sind.

Gewebe- / Zelltyp	712	sc-25423
Speicheldrüsen		
Seröse Endstücke	-	-
Muköse Endstücke	+	+
Epithel des Gangsystems	++	++
Myoepithelzellen	-	-
Pankreas (exokrin)		
Seröse Drüsenendstücke	-/+	+/++
Epithel des Gangsystems	+	+/++
Leber		
Hepatozyten	++	++
Epithel der Gallengänge	++	++

Die Speicheldrüsen des Menschen produzieren täglich 1- 1,5 Liter Speichel. Die drei großen Speicheldrüsen sind beim Menschen, wie bei der Maus, die Glandula parotis, die Glandula submandibularis und die Glandula sublingualis, die allesamt zusammengesetzte tubuloalveoläre Drüsen sind (Conti et al. 2004; Lüllmann-Rauch 2006a). CKIε ließ sich eindeutig im Epithel des verzweigten Ausführungsgangsystems dieser Drüsen detektieren. In den mukösen Endstücken zeigt sich eine schwache Expression, die serösen Endstücke, sowie die die Endstücke umgebenden Myoepithelzellen sind CKIε negativ.

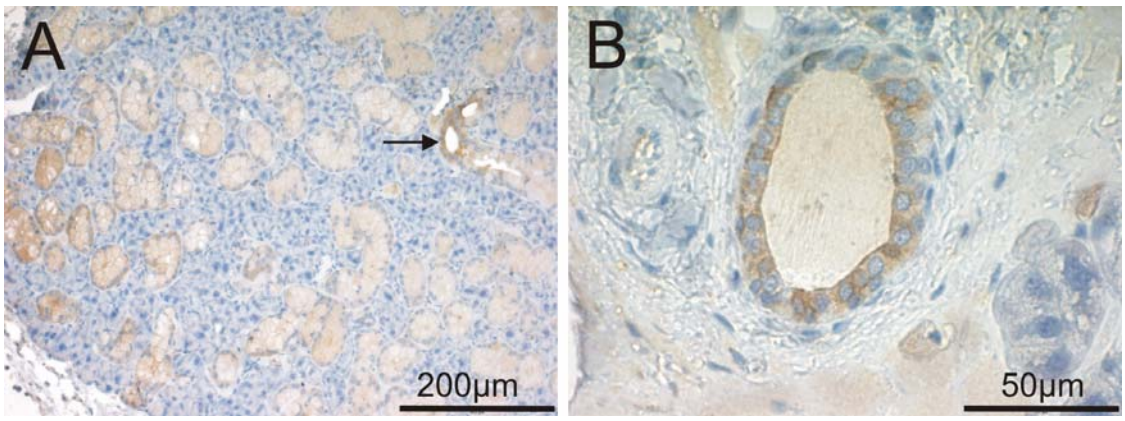


Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in einer Speicheldrüse einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Das immunhistochemische Färbeergebnis auf CKIε in den serösen Azini ist negativ, in den mukösen Endstücken ist es leicht positiv. Das Epithel des Ausführungsgangsystems (Pfeil) zeigt eine deutlichere Anfärbung. Vergr. 10fach. **(B):** Das Bild zeigt den Querschnitt eines Streifenstücks, dessen Epithel sich CKIε positiv darstellt. Vergr. 40fach.

Das Pankreas liegt retroperitoneal und besteht aus einem exokrinen und einem endokrinen Anteil. Der endokrine Anteil wird im folgenden Kapitel 4.2.3.7 beschrieben. Hier erfolgt zunächst die Beschreibung der Expression von CKIε im exokrinen Anteil. Der exokrine Anteil, der den Hauptanteil des Pankreas ausmacht, ist eine rein seröse Drüse, die einen enzymreichen, alkalischen Verdauungssaft sezerniert (Lüllmann-Rauch 2006a). Auf CKIε zeigen die Drüsenepithelzellen teils eine blasse Färbung bei der Detektion mit dem Antikörper 712, teils sind sie sogar CKIε negativ (zu sehen in Abbildung 26). Bei der Detektion von CKIε im exokrinen Pankreas durch den Antikörper sc-25423 sind große Anteile ebenfalls nur blass angefärbt, es finden sich aber auch Bereiche, die eine mittelgradige Farbreaktion auf CKIε erkennen lassen. Die schwer erkennbaren Ausführungsgänge des exokrinen Pankreas weisen in ihrem kubischen bis zylindrischen Epithel eine schwache zytoplasmatische Markierung auf CKIε auf (nicht dargestellt).

Die Leber ist die größte Drüse, die zahlreiche Funktionen hat. Sie ist in Leberläppchen gegliedert und besteht größtenteils (80%) aus Hepatozyten, die Galle sezernieren, welche von der Leber exokrin sezerniert wird. Daneben sezerniert sie einige Stoffe, wie Gerinnungsfaktoren, auch endokrin und dient als wichtiges Ausscheidungsorgan (Lüllmann-Rauch 2006a).

Sowohl in den Hepatozyten, als auch im Epithel der intrahepatischen Gallengänge ist CKIε deutlich nachweisbar.

Die extrahepatischen Gallengänge, die die Galle von der Leber in die Gallenblase leiten, und auch die Gallenblase, wurden für diese Arbeit wegen der schwierigen Präparation nicht untersucht.

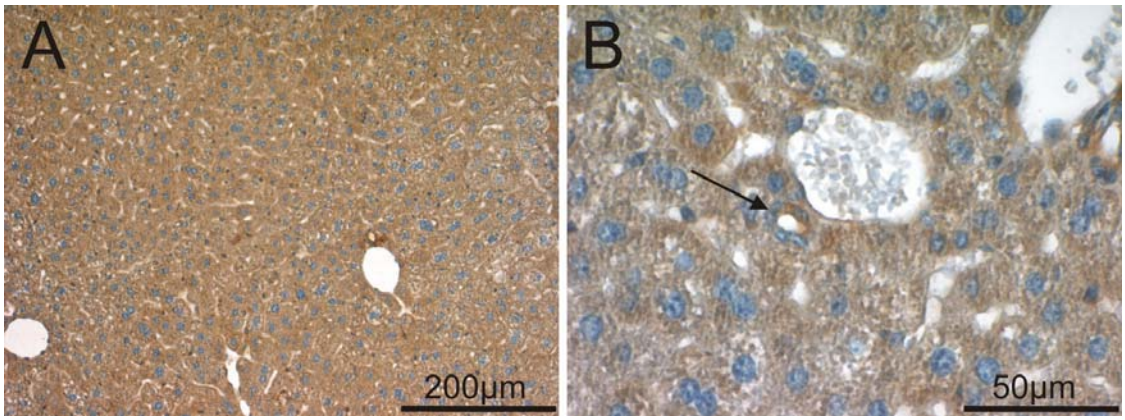


Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Leber einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε wurde detektiert mittels Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Ausschnitt aus der Leber mit eindeutiger Markierung der Hepatozyten auf CKIε. Vergr. 10fach. **(B):** Der Pfeil zeigt auf einen Gallengang, dessen Epithel einen mittelgradigen Nachweis von CKIε erkennen lässt. Vergr. 40fach.

4.2.3.7 Expression von CKIε in endokrinen Organen

Die endokrinen Organe sind Drüsen ohne Ausführungsgänge. Sie sezernieren Hormone, die sie direkt in die Blutbahn abgeben und die so zu ihren Zielorganen gelangen, wo sie an Rezeptoren binden und spezifische Effekte auslösen (Lüllmann-Rauch 2006a).

Endokrine Zellen sind meist Epithelzellen, jedoch gibt es auch Hormon produzierende Neurone, auf die hier nicht näher eingegangen wird.

Es gibt eine Vielzahl verschiedener Arten endokriner Drüsen. Zur Übersicht werden hier nur die gut präparierbaren, makroskopisch abgrenzbaren Drüsenorgane und der endokrine Anteil des Pankreas aufgeführt.

Zu erwähnen ist außerdem das hier nicht näher untersuchte diffuse neuroendokrine System (DNES). Dabei handelt es sich um neuroendokrine Zellen, die im Epithel des Magen-Darm-Trakts, der Atemwege und des Urogenitaltrakts verstreut vorkommen und Polypeptidhormone mit lokaler Wirkung bilden (Lüllmann-Rauch 2006a).

Tabelle 10: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den endokrinen Organen. Der Nachweis von CKIε wurde anhand der Intensität der spezifischen Farbreaktion der verwendeten CKIε spezifischen Antikörper 712 und sc-25423 evaluiert. Die verwendete Skalierung: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark. Angaben mit Schrägstrich (z.B. -/+ oder ++/+++) bedeuten ein heterogenes Expressionsmuster, in dem Zellen mit den verschiedenen, jeweils genannten Farbintensitäten zu finden sind.

Gewebe- / Zelltyp	712	sc-25423
Pankreas (endokrin)		
Langerhans-Inseln	++/+++	++
Nebenniere		
Zona glomerulosa	++	++
Zona fasciculata	+	+
X-Zone	+++	++
Medulla	-/+++	+++
Hypophyse		
Neurohypophyse Pituizyten Neuropil	 +++ ++	 +++ ++
Adenohypophyse Pars distalis Pars intermedia	 +++ +++	 +++ +++
Schilddrüse		
Follikelepithel	+/++	+/++
Kolloid	-	-

Die Langerhans-Inseln des Pankreas, die nur ungefähr 2% der Organmasse ausmachen, stellen den endokrinen Anteil des Organs dar. Beim Menschen lassen sich darin mindestens vier verschiedene endokrine Zelltypen unterscheiden. Dies sind die B-Zellen, die Insulin produzieren, die A-Zellen, die Glukagon bilden, die D-Zellen, die Somatostatin sezernieren und die PP-Zellen, die das Pankreatische Polypeptid bilden, dessen Wirkung noch nicht ausreichend geklärt ist (Lüllmann-Rauch 2006a).

Bei der Untersuchung auf eine Expression von CKIε wird nur ein Überblick über die Expression in den Langerhans-Inseln gegeben. Auf die unterschiedlichen Zelltypen in den Langerhans-Inseln wird nicht näher eingegangen.

Bei der Detektion von CKIε zeigen die Inseln ein heterogenes Färbeergebnis. Es finden sich sowohl stark positive, als auch nur mittelgradig angefärbte Zellen (siehe Abbildung 26).

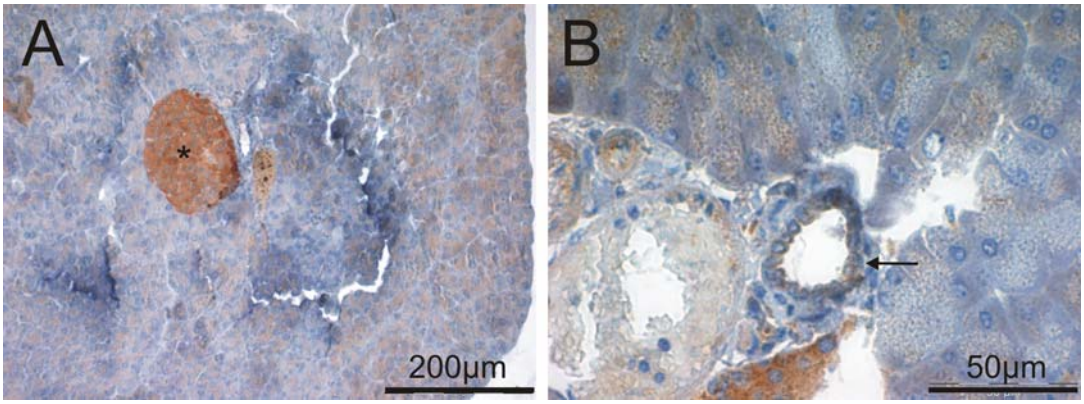


Abbildung 26: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Pankreas einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε wurde detektiert mittels Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** In den endokrinen Langerhans'schen Inseln (Stern) ist deutlich eine CKIε-Expression nachweisbar. Vergr. 10fach. **(B):** Das Epithel des Ausführungsgangs (Pfeil) lässt einen schwachen Nachweis von CKIε erkennen. Vergr. 40fach.

Die beiden Nebennieren sitzen dem oberen Nierenpol auf. Sie bilden eigenständige endokrine Organe und bestehen aus Rinde und Mark.

Die Nebennierenrinde des Menschen gliedert sich in drei Zonen. Die äußerste, relativ schmale Zone ist die Zona glomerulosa, deren Zellen Mineralcorticoide bilden. Ihr folgt die Zona fasciculata, die beim Erwachsenen den größten Teil der Rinde einnimmt und in der überwiegend Glucocorticoide produziert werden. Die innerste Schicht ist die Zona reticularis, deren Hauptprodukt schwach wirksame Androgene sind (Lüllmann-Rauch 2006a).

Die Nebennierenrinde der Maus unterscheidet sich von der des Menschen. Hier gibt es nur zwei Zonen. Die Zona reticularis existiert bei der Maus nicht. Dafür findet man bei jungen Mäusen die sogenannte X-Zone, in der vorübergehend das Hormon Renin gebildet wird (Craig et al. 1993). Sie liegt um das Mark herum und bildet sich bei männlichen Tieren nach Erreichen der Geschlechtsreife, bei weiblichen Tieren nach der ersten Schwangerschaft langsam zurück (Conti et al. 2004).

Beim Expressionsnachweis von CKIε ergibt sich zwischen den beiden eingesetzten CKIε spezifischen Antikörpern ein Unterschied. So ist bei Einsatz des Antikörpers 712 die Färbung auf CKIε in der X-Zone am stärksten. Etwas schwächer, aber dennoch sehr deutlich ist die Färbung in der außen liegenden Zona glomerulosa. In der Zona fasciculata ist eine Farbreaktion ebenfalls vorhanden, wenn auch schwächer als in den anderen Rindenbereichen

(siehe Abbildung 27). Bei Verwendung des Antikörpers sc-25423 ist die Farbreaktion in der X-Zone schwächer ausgeprägt und zeigt eine ähnliche Expressionsstärke wie in der Zona glomerulosa. In den beiden anderen Nebennierenrindenzonen liefern die beiden Antikörper identische Ergebnisse.

Im Nebennierenmark werden Katecholamine sezerniert. Die Zellen des Marks sind epithelartig und in Gruppen angeordnet. Sie stammen aus der Neuralleiste, entsprechen postganglionären sympathischen Neuronen und sind somit Bestandteil des Sympathikus (Lüllmann-Rauch 2006a). Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden können bei den meisten Säugern zwei Zelltypen unterschieden werden. Zur Untersuchung einer möglichen Expression von CKIε wurden die Zellen nicht differenziert.

Die immunhistochemische Untersuchung des Nebennierenmarks mit dem Antikörper sc-25423 ergibt eine starke zytoplasmatische Markierung auf CKIε. Die Detektion von CKIε durch den Antikörper 712 liefert hingegen ein heterogenes Expressionsmuster für CKIε im Nebennierenmark. Hier sind zwischen CKIε negativen Zellnestern nur vereinzelte Zellgruppen stark CKIε positiv.

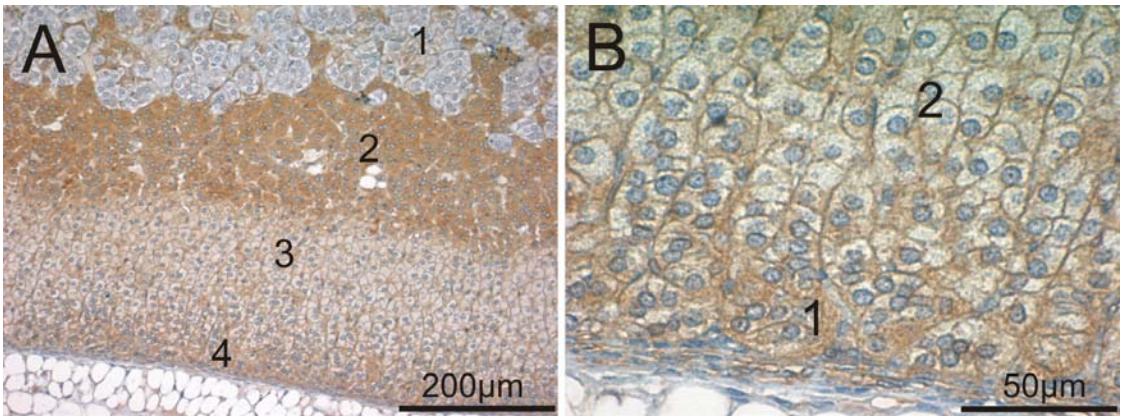


Abbildung 27: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Nebenniere einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** In dieser Übersicht sind alle Schichten der Nebenniere zu erkennen. Von innen nach außen sieht man das CKIε negative Zellnester enthaltende Mark (1), gefolgt von der stark positiven X-Zone (2), der schwach auf CKIε gefärbten Zona fasciculata (3) und der wieder stärker positiven Zona glomerulosa (4). Vergr. 10fach. **(B):** Stärker vergrößert zu sehen sind hier die äußere, etwas stärker angefärbte Zona glomerulosa (1) und die innere, schwächer angefärbte Zona fasciculata (2). Vergr. 40fach.

Die Hypophyse besteht aus der Adeno- und der Neurohypophyse (Welsch 2006c). Sie weist überall eine CKIε-Markierung auf, mit leichten regionalen Unterschieden der Intensität der spezifischen Färbung.

Die Adenohypophyse gliedert sich weiter in drei Abschnitte. Die Pars distalis macht den vorderen, größten Teil der Hypophyse aus. Die Pars intermedia liegt in der Mitte im Grenzgebiet zur Neurohypophyse. Bei der Maus ist dieser Teil stärker ausgeprägt als beim Menschen. Die Pars tuberalis ist der Abschnitt, der dem Hypophysenstiel anliegt (Welsch 2006c). Letzter wird aufgrund der schwierigen Präparation nicht dargestellt.

In allen Bereichen sind die Zellen in Nestern und Strängen angeordnet, zwischen denen Sinusoide liegen. Die Adenohypophyse enthält fünf unterschiedliche endokrine Zelltypen, welche sechs verschiedene Hormone bilden. Die vier Hormone Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), Thyroidea-stimulierendes Hormon (TSH), Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH) sind glandotrope Hormone, die nachgeordnete Drüsen stimulieren. Prolaktin und das Wachstumshormon (GH) sind nicht-glandotrop.

Die verschiedenen Zelltypen werden nicht speziell auf eine CKIε-Expression untersucht. Im Überblick zeigt die bei der Maus deutlich ausgeprägte Pars intermedia eine starke Farbreaktion auf CKIε. In der Pars distalis ist die Färbung nur wenig schwächer.

Die Neurohypophyse ist eine Fortsetzung des Thalamus und besteht hauptsächlich aus marklosen Axonen und Axonenden, deren Perikaryen im Hypothalamus liegen, sowie aus speziellen Gliazellen (Pituizyten) und Gefäßen. In ihr selbst werden keine Hormone gebildet. Sie ist lediglich Ort der Speicherung und Ausschüttung der Hormone Adiuretin und Oxytocin, die in hypothalamischen Kerngebieten synthetisiert werden. Die Hormone gelangen, in Granula verpackt, über axonalen Transport in die Hypophyse (Lüllmann-Rauch 2006a).

Die Anfärbung der Neurohypophyse auf CKIε zeigt eine mäßige, aber klar ersichtliche CKIε-Expression des Neuropils, sowie eine starke zytoplasmatische CKIε-Expression der Pituizyten (siehe Abblidung 28 B).

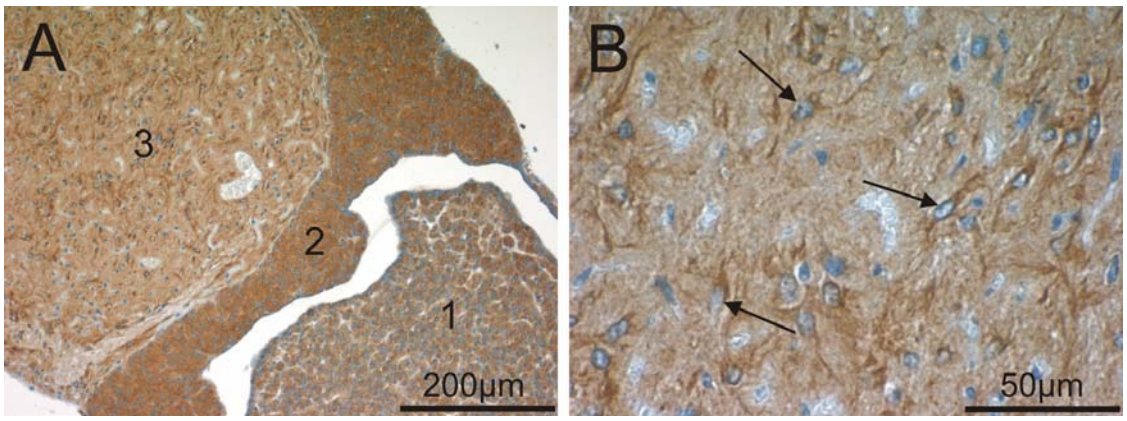


Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Hypophyse einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε-Detektion mittels Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** In der Übersichtsaufnahme kann man deutlich Pars distalis (1), Pars intermedia (2) und Pars nervosa (3) voneinander unterscheiden. Während Pars distalis und intermedia eine starke Färbung auf CKIε zeigen, ist die Reaktion in der Pars nervosa im Vergleich schwächer, wenn auch noch immer eindeutig positiv auf CKIε. Vergr. 10fach. **(B):** Ausschnitt aus der Pars nervosa der Hypophyse in stärkerer Vergrößerung. Man erkennt den Aufbau aus marklosen Axonen und die stark CKIε positiven Pituizyten (Pfeile). Vergr. 40fach.

Die Schilddrüse (Abbildung 29) stellt ein weiteres eigenständiges endokrines Organ dar, das auf eine mögliche Expression von CKIε untersucht wurde.

Sie besteht aus zahlreichen Follikeln, die gefüllt sind mit Kolloid und von einem einschichtigen Epithel begrenzt werden. Die Epithelzellen lassen einen schwachen Nachweis von CKIε im Zytoplasma erkennen, der jedoch nicht homogen ausfällt.

Je nach Funktionszustand variieren Größe der Follikel und Epithelhöhe. In aktiven Follikeln ist das Epithel kubisch, außerdem ist die Expression von CKIε deutlicher erkennbar. In inaktiven Follikeln ist das Epithel flach und die Farbreaktion auf CKIε nur sehr blass oder sogar negativ.

Die Epithelzellen bilden Thyreoglobulin, das im Follikellumen gespeichert wird.

Die eigentlichen Schilddrüsenhormone Triiodthyronin und Thyroxin entstehen, indem die Epithelzellen Kolloid aufnehmen und die Hormone durch proteolytische Spaltung aus dem Thyreoglobulin befreien.

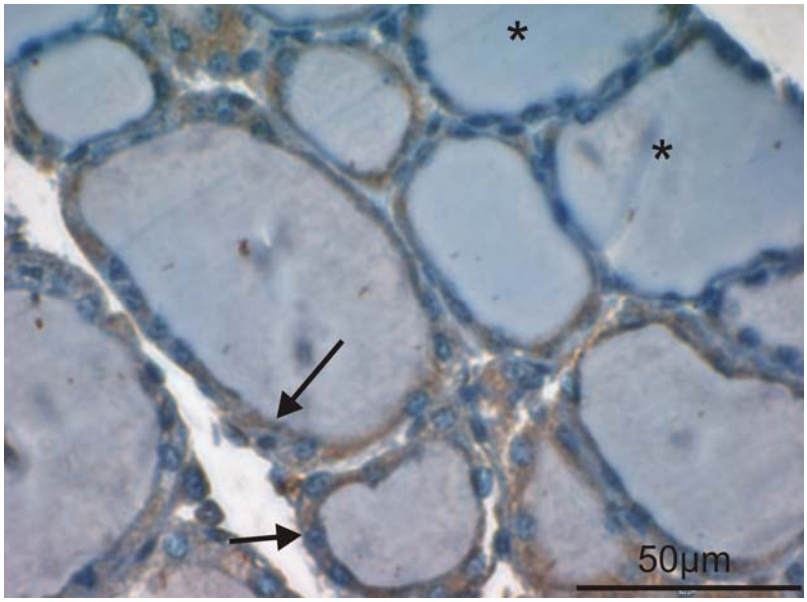


Abbildung 29: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Schilddrüse einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε-Detektion mittels Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Zu sehen sind aktive Follikel mit CKIε positivem Epithel (Pfeile), sowie inaktive Follikel (Sterne), in deren flachem Epithel CKIε nicht detektierbar ist. Vergr. 40fach.

4.2.3.8 Expression von CKIε in den Harnorganen

Zu den Harnorganen zählen die harnbereitenden, paarigen Nieren und die ableitenden Harnwege (Welsch 2006d). Die für diese Arbeit auf ihre CKIε-Expression untersuchten Organe sind in der folgenden Tabelle 11 aufgeführt.

Die Niere ist ein wichtiges Ausscheidungsorgan für wasserlösliche Abfallprodukte. Sie spielt außerdem eine wesentliche Rolle im Salz- und Wasser-, sowie im Säure-Basen-Haushalt und besitzt zudem endokrine Funktionen (Lüllmann-Rauch 2006a).

Zu erwähnen ist, dass sich die Niere der Maus im Aufbau von der des Menschen darin unterscheidet, dass die Maus unipapilläre, der Mensch dagegen multipapilläre Nieren besitzt. Der weitere Aufbau ist jedoch bei beiden Spezies nahezu identisch.

Makroskopisch lässt sich die Niere grob in Rinde und Mark gliedern. Dabei fällt nach immunhistochemischer Untersuchung auf, dass im Überblick der

Rindenbereich eine gute und insgesamt stärkere Anfärbung auf CKIε aufweist, als Nierenmark und Nierenpapille.

Mikroskopisch ist die wichtigste Baueinheit der Niere das Nephron, das sich wiederum in zwei Abschnitte unterteilen lässt, nämlich das Nierenkörperchen und das daran angeschlossene System der Nierentubuli, welches schließlich in eine weitere Baueinheit, die Sammelrohre mündet (Welsch 2006d).

Tabelle 11: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den Harnorganen. Die Stärke der Expression wurde anhand der Farbintensität nach immunhistochemischer Färbung mit den CKIε spezifischen Antikörpern 712 und sc-25423 beurteilt. Die verwendete Skalierung: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark. Angaben mit Schrägstrich (z.B. -/+ oder ++/+++) bedeuten ein heterogenes Expressionsmuster, in dem Zellen mit den verschiedenen, jeweils genannten Farbintensitäten zu finden sind.

Gewebe- / Zelltyp	712	sc-25423
Niere		
Kapsel	+	+
Nierenkörperchen	-/+	-/+
Epithel proximaler Tubuli	++	++
Epithel distaler Tubuli	+++	+++
Epithel Intermediärtubuli	++	++
Epithel Sammelrohre	+	+
Harnblase		
Urothel Basalschicht Intermediärschicht Superfizialschicht	 + + ++	 + + ++
Glatte Muskulatur	++	+/++

Das Nierenkörperchen (siehe Abbildung 30 B) dient der Ultrafiltration des Blutes und ist ausschließlich im Rindenbereich lokalisiert. Es besteht aus der Bowman-Kapsel und dem Glomerulus, einem Blutkapillarknäuel, das sich in die Kapsel stülpt. Die Bowman-Kapsel gliedert sich in ein parietales Blatt aus flachen Zellen und in ein viszerales Blatt bestehend aus sogenannten Podozyten (Welsch 2006d). Die einzelnen Bestandteile und Zellen im Nierenkörperchen sind mikroskopisch schwer zu differenzieren, weshalb sie nicht alle einzeln aufgeführt werden. Insgesamt ist aber erkannbar, dass ein Teil der Zellen schwach auf CKIε angefärbt ist und sich ein anderer Teil CKIε negativ darstellt.

Das Tubulussystem ist durchgehend mit einschichtigem Epithel ausgekleidet, das je nach Abschnitt in seiner Art variiert. Im proximalen Tubulus ist das Epithel kubisch mit Bürstensaum und zeigt einen eindeutigen Nachweis von CKIε. Im distalen Tubulus scheint die Expression gleich oder fast noch stärker zu sein. Das Epithel ist in diesem Abschnitt einfach kubisch. Im flachen Epithel der dünnen Intermediärtubuli ist eine mäßige Färbung auf CKIε sichtbar, während das die Sammelrohre auskleidende, kubische bis prismatische Epithel nur eine leichte Farbreaktion zeigt.

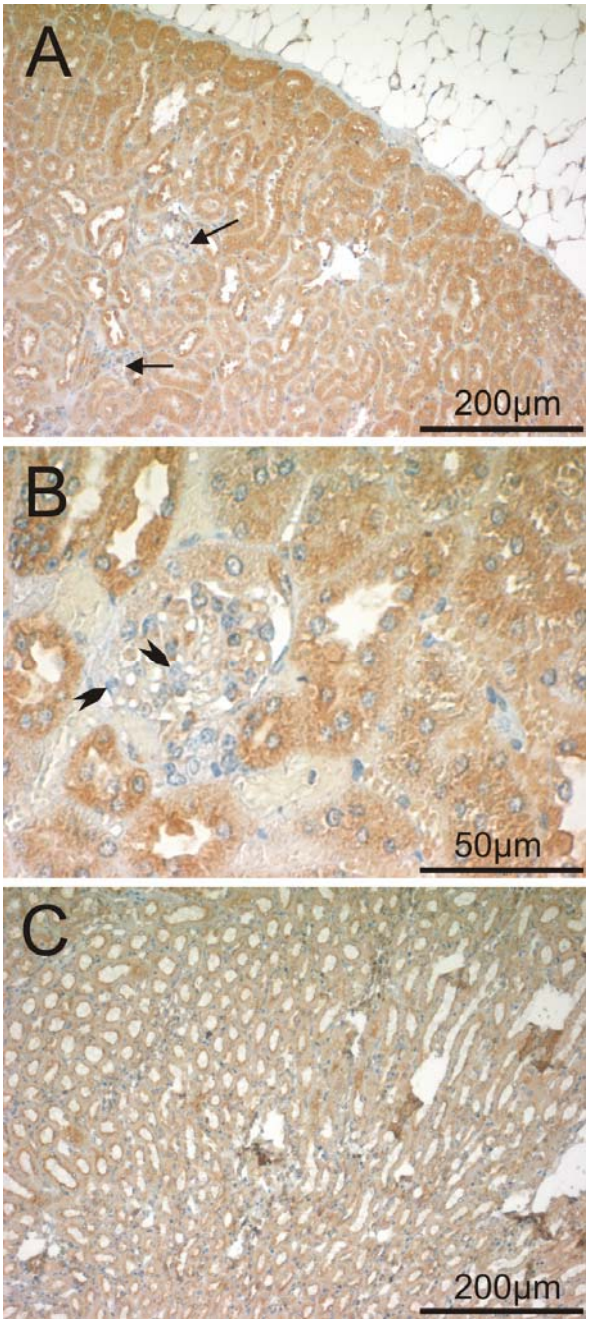


Abbildung 30: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Niere einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Ausschnitt aus dem Rindenlabyrinth der Niere mit Glomeruli (Pfeile). Das Epithel der Tubuli zeigt eine eindeutig positive Reaktion auf CKIε. Vergr. 10fach. **(B):** Dargestellt ist ein Nierenkörperchen. Man sieht sowohl Zellen mit leichter Färbung auf CKIε, als auch einige CKIε negative Zellen (Pfeilspitzen). Vergr. 40fach. **(C):** Ausschnitt aus dem Markbereich der Niere mit vielen Sammelrohranschnitten, deren Epithel nur eine leicht positive Reaktion auf CKIε erkennen lässt. Vergr. 10fach.

Die ableitenden Harnwege, so auch die Harnblase, zeigen einen typischen Wandaufbau aus Tunica mucosa, Tunica muscularis und Adventitia mit einem speziellen, mehrschichtigen Oberflächenepithel, dem Urothel. Dieses lässt sich in

eine Basal-, eine Intermediär- und eine Superfizialschicht gliedern. Es besitzt auf der Oberfläche große Deckzellen (Lüllmann-Rauch 2006a). CKIε wird im Urothel in den basal und intermedär liegenden Zellen schwach exprimiert, die oberflächlichen Deckzellen zeigen eine mäßige CKIε-Expression. In der glatten Muskulatur der Tunica muscularis der Harnblase ist ebenfalls eine mäßige zytoplasmatische Anfärbung auf CKIε erkennbar.

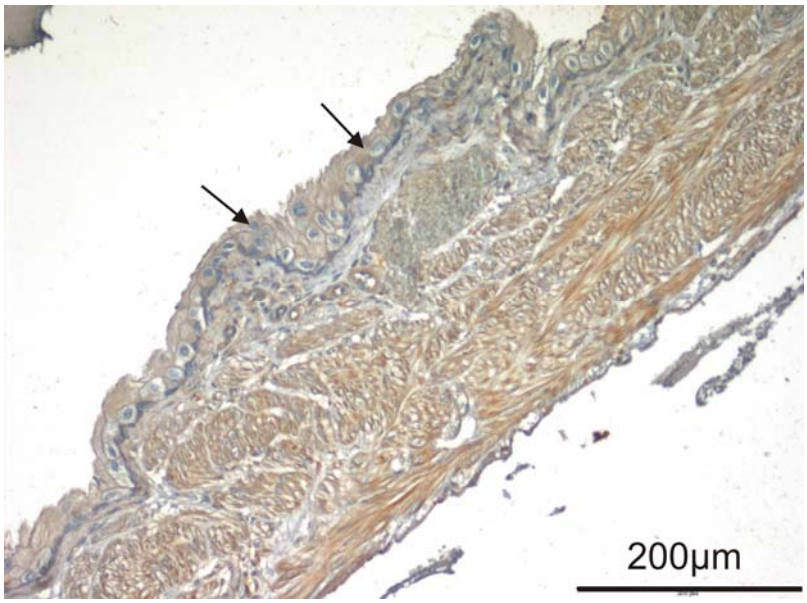


Abbildung 31: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Harnblase einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε wurde detektiert mittels Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Ausschnitt aus der Wand der Harnblase. Die Schleimhaut wird vom Urothel (Pfeile) bedeckt, das CKIε positiv ist. Vergr. 10fach. In Abbildung 8 A1 (Kapitel 4.2.2.1) sind in stärkerer Vergrößerung die Gliederung des Urothels in Basal-, Intermediär- und Superfizialschicht, sowie seine Färbung auf CKIε besser zu erkennen.

4.2.3.9 Expression von CKIε in den männlichen Geschlechtsorganen

Zu den männlichen Geschlechtsorganen gehören neben dem äußeren Genitale der paarige Hoden, die Samenwege und die akzessorischen Drüsen (Lüllmann-Rauch 2006a). Die Expression von CKIε wurde in den in Tabelle 12 aufgeführten Organen untersucht.

Tabelle 12: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den männlichen Geschlechtsorganen. Der Nachweis von CKIε wurde evaluiert anhand der Intensität der spezifischen Farbreaktion der verwendeten CKIε spezifischen Antikörper 712 und sc-25423. Die verwendete Skalierung: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark. Angaben mit Schrägstrich (z.B. -/+ oder ++/+++) bedeuten ein heterogenes Expressionsmuster, in dem Zellen mit den verschiedenen, jeweils genannten Farbintensitäten zu finden sind.

Gewebe- / Zelltyp	712	sc-25423
Hoden		
Tunica albuginea	-	-
Spermatogonien	+++	++/+++
Spermatozyten	++	++
Sertoli-Zellen	+	+
Leydig-Zellen	++	+/++
Nebenhoden		
Epithel Ductuli efferentes	+++	+++
Epithel Ductus epididymidis	+++	+++
Ductus deferens		
Epithel	+++	++
Lamina propria	-	-
Tunica muscularis	++	++
Samenblase		
Epithel	++	++
Prostata		
Drüsenepithel	++/+++	++/+++

Im Hoden findet im Epithel der Hodenkanälchen die Spermatogenese statt. Die als Stützzellen dienenden Sertoli-Zellen sind die eigentlichen Epithelzellen der Tubuli seminiferi. Sie zeigen eine schwache Markierung für CKIε. Zwischen ihnen liegen die Keimzellen, die sich in verschiedenen Reifungsstadien befinden. Die unreifsten Zellen, die Spermatogonien (Conti et al. 2004), liegen in der basalen Hälfte des Keimepithels und zeigen sowohl im Zytoplasma, als auch im Kern eine starke Farbreaktion auf CKIε. In der apikalen Hälfte sind die weiter ausgereiften Spermatozyten anzutreffen, die im Zytoplasma ebenfalls eindeutig CKIε exprimieren (zu sehen in Abbildung 32 A).

Zwischen den Tubuli seminiferi sind gruppenweise Leydig-Zellen anzutreffen (siehe Abbildung 32 B). Diese Zellen, die Androgene bilden, weisen eine mittelgradige Expression von CKIε auf.

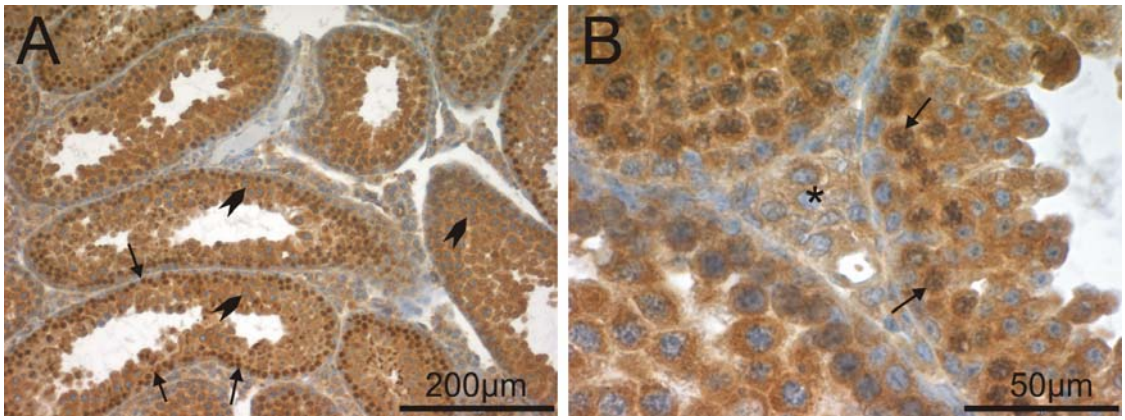


Abbildung 32: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Hoden einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Zu sehen ist das stark auf CKIε angefärbte Keimepithel der Tubuli seminiferi. Der stärkste Nachweis von CKIε findet sich im Zytoplasma und im Kern der Spermatogonien (Pfeile), sowie im Zytoplasma der Spermatozyten (Pfeilspitzen). Vergr. 10fach. **(B):** Ein leicht positiv auf CKIε angefärbtes Nest von Leydig-Zellen (Stern). Deutlicher Nachweis von CKIε in den Spermatogonien, besonders im Kern (Pfeile). Vergr. 40fach.

Die reifen Spermatozoen gelangen über die Ductuli efferentes (nicht gezeigt) weiter in den Nebenhoden, wo sie funktionell ausreifen und gespeichert werden. Der Nebenhoden wird gegliedert in Caput, Corpus und Cauda und besteht größtenteils aus dem Ductus epididymidis, der in Abbildung 33 dargestellt ist. Das Epithel des Ductus epididymidis ist gleichmäßig hoch, zweireihig und mit langen Stereozilien ausgestattet. Es betreibt sowohl Resorption, als auch Sekretion. Das Epithel der Ductuli efferentes ist dagegen unregelmäßig aus zum Teil hochprismatischen, zum Teil flachen Zellen aufgebaut. Es besitzt mit Kinozilien ausgestatte Zellen, die dem Spermientransport dienen, und Mikrovilli tragende Zellen, die Resorption betreiben (Lüllmann-Rauch 2006a). Trotz dieser erwähnten Unterschiede zeigen beide Epithelien eine ähnlich starke Expression von CKIε.

Auf den Nebenhoden folgt der Ductus deferens (Samenleiter), der die Spermiensuspension in die Urethra transportiert. Typische Merkmale sind die dreischichtige, dicke Muskelwand und das sternförmige, enge Lumen (Lüllmann-Rauch 2006a). Ausgekleidet wird der Ductus deferens von einem zwei- bis mehrreihigen Zylinderepithel mit Stereozilien, welches eine starke Farbreaktion

auf CKIε präsentiert. In der glatten Muskulatur der Wand ist diese Farbreaktion nur schwach (dargestellt in Abbildung 12 E).

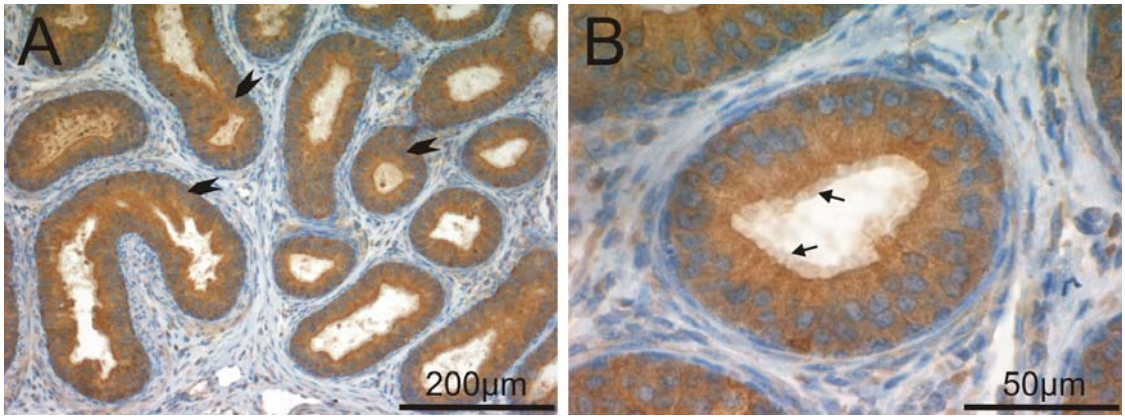


Abbildung 33: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Nebenhoden einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε wurde detektiert mittels Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Mehrere Anschnitte des Ductus epididymidis mit stark CKIε positiver zytoplasmatischer Färbung des zweireihigen Epithels (Pfeilspitzen). Vergr. 10fach. **(B):** Stereozilien auf dem Epithel (Pfeil). Vergr. 40fach

Die akzessorischen Geschlechtsdrüsen sind Samenblase (Vesicula seminalis) (keine Abbildung), Prostata und Cowper-Drüsen (Glandulae bulbourethrales, hier nicht untersucht).

Das prismatische Epithel der Samenblase ist mäßig auf CKIε angefärbt. Es sezerniert ein alkalisches Sekret, das 60-80% des Ejakulats ausmacht und unter anderem Proteine und Fruktose als Nährstoffe für die Spermatozoen enthält (Welsch 2006a).

Die Prostata ist eine Drüse, die aus 40-50 tubuloalveolären Einzeldrüsen besteht. Sie produziert ein saures Sekret, das 15-30% des Ejakulats ausmacht und zum Beispiel saure Phosphatase, Prostaglandine und Proteasen enthält. Beim Menschen wird sie in eine periurethrale Mantelzone, eine Innen- und eine Außenzone gegliedert. Die Anatomie der Prostata bei der Maus unterscheidet sich von der des Menschen. Sie besteht aus vier separaten Lappen, nämlich dem dorsalen, dem lateralen, dem ventralen und dem anterioren Lappen (Conti et al. 2004).

Die Epithelhöhe in der Prostata ist abhängig vom Funktionszustand, in aktiven Drüsen ist es prismatisch, in ruhenden eher kubisch bis flach (Welsch 2006a). CKIε ist im Prostataepithel durchgehend gut detektierbar (zu sehen in Abbildung 34). Neben den sekretorischen Drüsenepithelzellen sind im Epithel auch noch

Stammzellen und vereinzelte endokrine Zellen vorhanden. Diese sind jedoch nur durch spezifische immunhistochemische Färbungen zu identifizieren und wurden in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

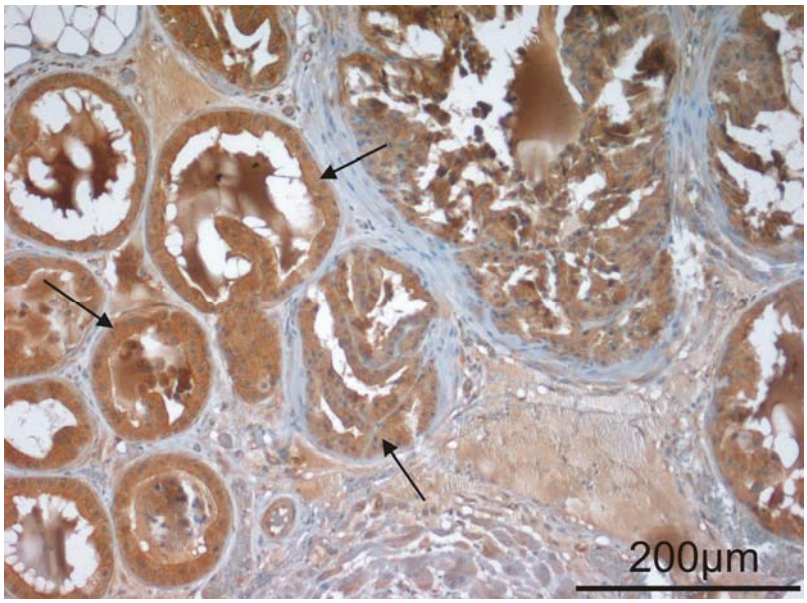


Abbildung 34: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Prostata einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε wurde detektiert mittels Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Im Schnitt durch die Prostata sieht man eine gut positive Farbreaktion des Drüsenepithels (Pfeile) für CKIε, während sich das bindegewebige Stroma überwiegend CKIε negativ darstellt. Vergr. 10fach.

4.2.3.10 Expression von CKIε in den weiblichen Geschlechtsorganen

Für diese Arbeit wurden nur die inneren weiblichen Geschlechtsorgane auf die Expression und Lokalisation von CKIε untersucht. Auf die zyklischen Veränderungen in diesen, die durch den Einfluss der Sexualhormone hervorgerufen werden, wird nicht eingegangen.
Dafür wird in diesem Kapitel die weibliche Brustdrüse mit eingeschlossen, die als Hautdrüse eigentlich nicht zu den Geschlechtsorganen gezählt wird.

Tabelle 13: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den weiblichen Geschlechtsorganen. Die Stärke der Expression wurde anhand der Farbintensität nach immunhistochemischer Färbung mit den CKIε spezifischen Antikörpern 712 und sc-25423 beurteilt. Die verwendete Skalierung: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark. Angaben mit Schrägstrich (z.B. -/+ oder ++/+++) bedeuten ein heterogenes Expressionsmuster, in dem Zellen mit den verschiedenen, jeweils genannten Farbintensitäten zu finden sind.

Gewebe- / Zelltyp	712	sc-25423
Brustdrüse		
Drüsenepithelzellen	++	++
Myoepithelzellen	-	-/+
Ovar		
Epithel Primordialfollikel	++	++
Epithel Primärfollikel	++	++
Granulosaepithelzellen	-/+	-/+
Theca folliculi	+	+
Oozyt	+/++	+/++
Eileiter		
Tubenepithel	++	++
Glatte Muskulatur	++	++
Uterus		
Endometrium Oberflächenepithel Glandulae uterinae Stroma	 ++/+++ ++ +	 ++/+++ ++ +
Myometrium	++	++
Vagina		
Oberflächenepithel	+++	+++
Lamina propria	-	-
Glatte Muskulatur	++	++

Die weibliche Maus besitzt, im Gegensatz zum Menschen, fünf Paar Brustdrüsen. Die Brustdrüse unterliegt einer hormonellen Steuerung und der anatomische Aufbau der laktierenden Brustdrüse unterscheidet sich deutlich von dem der nicht-laktierenden Brustdrüse, welche hier besprochen wird.

Das Drüsengewebe ist von Fettgewebe umgeben und differenziert sich in Azini und das Gangsystem, welche aus prismatischem Drüsenepithel und basal liegenden Myoepithelzellen bestehen (Conti et al. 2004). CKIε lässt sich

immunhistochemisch im Epithel gut detektieren, in den Myoepithelzellen zeigt sich nur mit dem Antikörper sc-25423 vereinzelt eine schwache Markierung.

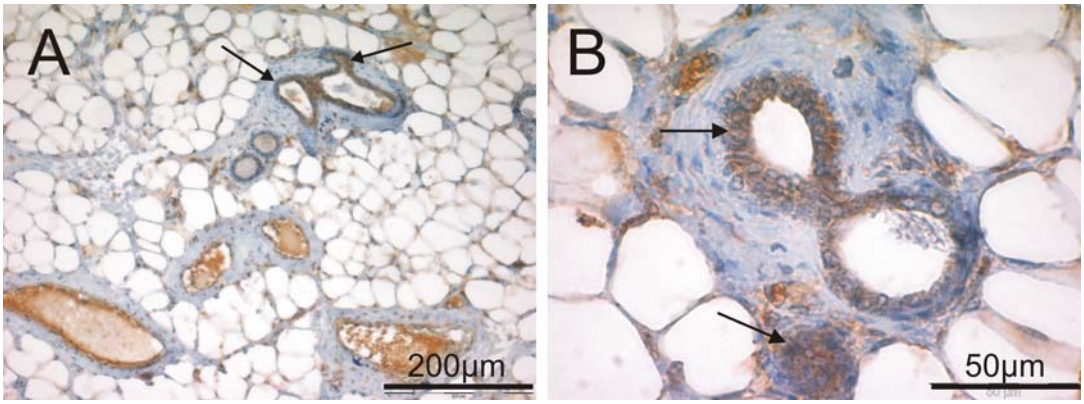


Abbildung 35: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Brustdrüse einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε wurde detektiert durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Sichtbar ist eine CKIε positive Reaktion im Zytoplasma der Ausführungsgangepithelzellen (Pfeile). Vergr. 10fach. **(B):** Der Expressionsnachweis von CKIε in den Epithelzellen der Brustdrüse (Pfeile) ist deutlich zu erkennen. Die sie umgebenden Myoepithelzellen sind CKIε negativ. Vergr. 40fach.

Das paarig angelegte Ovar gliedert sich in ein inneres Mark, das aus lockerem Bindegewebe, Blut- und Lymphgefäßen besteht, und eine zelldichte Rinde, in der Ovarialfollikel in verschiedenen Differenzierungsstadien in das bindegewebige Stroma eingelagert sind (Welsch 2006a).

Im Primordialfollikel umgibt eine Schicht flacher Epithelzellen den Oozyt. Sie zeigen eine deutliche Farbreaktion auf CKIε. Ähnlich stark angefärbt präsentieren sich die kubischen Epithelzellen des etwas größeren Primärfollikels, die sich ebenfalls einschichtig um den Oozyten legen.

Ab dem Reifungsstadium des Sekundärfollikels vermehren sich die Epithelzellen stark und werden dann Granulosaepithelzellen genannt. Sie exprimieren CKIε nur noch schwach. Um die Follikel herum entsteht ab einer fortgeschrittenen Differenzierung mit der Theca folliculi eine spezielle Bindegewebshülle, deren Zellen eine blasse Färbung auf CKIε aufweisen. Im Oozyt ist ein Nachweis von CKIε ebenfalls möglich.

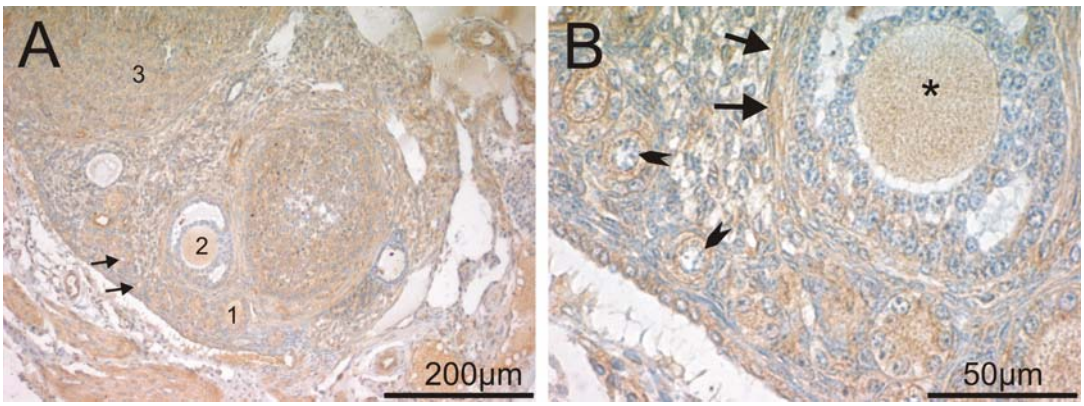


Abbildung 36: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Ovar einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Zu sehen sind verschiedene Stadien der Follikelreifung. **(A):** CKIε positive Färbung des Epithels der Primordialfollikel (Pfeile) und eines Primärfollikels (1). Außerdem vorhanden sind ein Sekundärfollikel (2) und ein Corpus luteum (3). Vergr. 10fach. **(B):** CK1ε positiv angefärbter Oozyt (Stern) in einem Sekundärfollikel. Schwache Farbreaktion des Zytoplasmas der Granulosaepithelzellen, gute CKIε positive Farbreaktion dagegen bei den Zellen der Theca folliculi (Pfeile) und den Primordialfollikeln (Pfeilspitzen). Vergr. 40fach.

Die Eileiter dienen der Weiterleitung der gesprungenen reifen Follikel in den Uterus. Zudem sind sie in der Regel Ort der Befruchtung. Die Schleimhaut trägt ein einschichtiges prismatisches Epithel, das sowohl sekretorische, als auch Kinozilien tragende Zellen enthält und eine deutliche Farbreaktion auf CKIε erkennen lässt. In der glatten Muskulatur der Tunica muscularis ist die Farbreaktion schwächer ausgeprägt.



Abbildung 37: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Eileiter einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε-Nachweis mittels Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Das Epithel, wie auch die glatte Muskulatur der Tunica muscularis, zeigen eine leichte positive, zytoplamatische Anfärbung auf CKIε. Vergr. 10fach.

Der Uterus der Maus besitzt eine etwas andere Form als der des Menschen. Er ist bicorn, das heißt, er bildet zwei Hörner oberhalb des unpaarigen Corpus, dessen Lumen durch ein Septum in zwei Kompartimente geteilt ist (Conti et al. 2004). Entsprechend dem menschlichen Uterus sind die Schichten der Wand von innen nach außen Endometrium (Tunica mucosa), Myometrium (Tunica muscularis) und Perimetrium (Tunica serosa und Tela subserosa).

Das Endometrium besteht aus dem einschichtigen, prismatischen Oberflächenepithel, aus tubulären Drüsen (Glandulae uterinae) und aus einem faserarmen, bindegewebigen Stroma (Welsch 2006a).

Die Oberflächenepithelzellen sind überwiegend stark auf CKIε angefärbt, das Epithel der Drüsen nur mäßig. Im überwiegend aus Bindegewebe bestehenden Stroma des Endometriums ist CKIε nur vereinzelt in Zellen zu detektieren. In der glatten Muskulatur des Myometriums ist CKIε wiederum durchgehend nachweisbar.

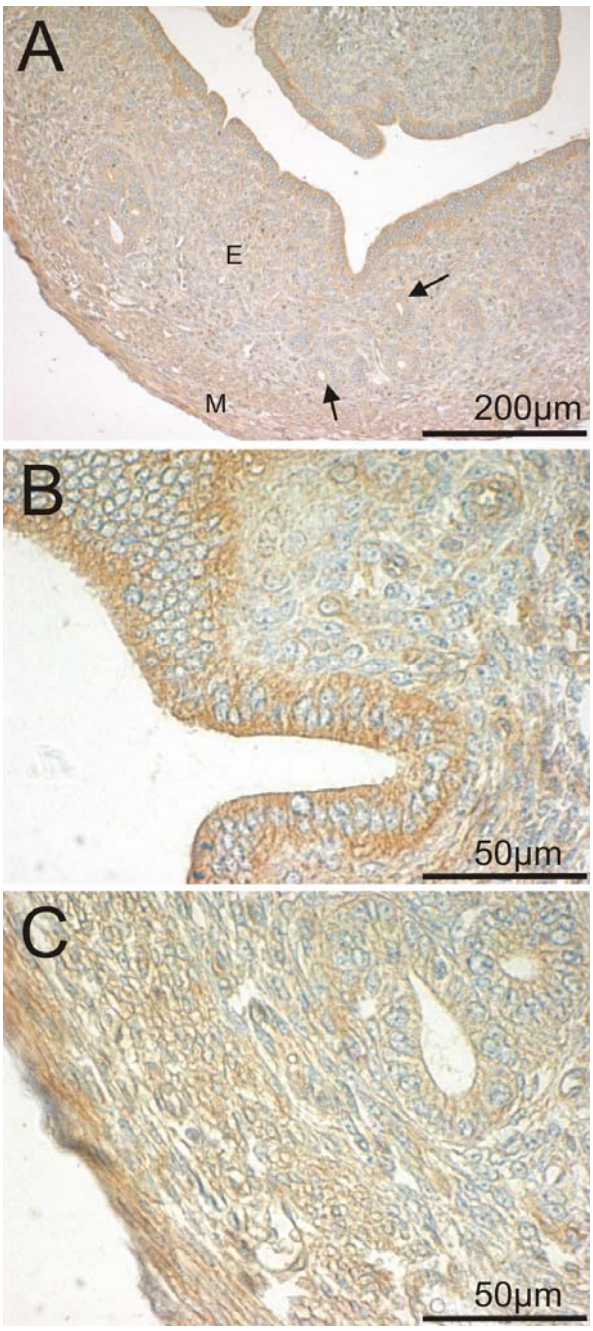


Abbildung 38: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Uterus einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** In der Übersicht sieht man das Myometrium (M), dessen glatte Muskelzellen sich CKIε positiv darstellen, sowie das Endometrium (E) mit CKIε positivem Oberflächenepithel und in der Tiefe liegenden, CKIε positiven Glandulae uterinae (Pfeile). Vergr. 10fach. **(B):** Gut sichtbare Anfärbung des Zytoplasmas im Oberflächenepithel. Vergr. 40fach. **(C):** Glandulae uterinae mit nur mäßig CK1ε positivem Zytoplasma. Vergr. 40fach.

Die Wand der Vagina (Abbildung 39) besteht von innen nach außen aus Tunica mucosa mit mehrschichtigem, unverhorntem Plattenepithel, Lamina propria, dünner Tunica muscularis und Adventitia (Lüllmann-Rauch 2006a). Das Oberflächenepithel, das zyklische Veränderungen durchmacht, zeigt deutlich eine Markierung auf CKIε.

In der glatten Muskulatur der Vaginalwand kann CKIε ebenfalls nachgewiesen werden.

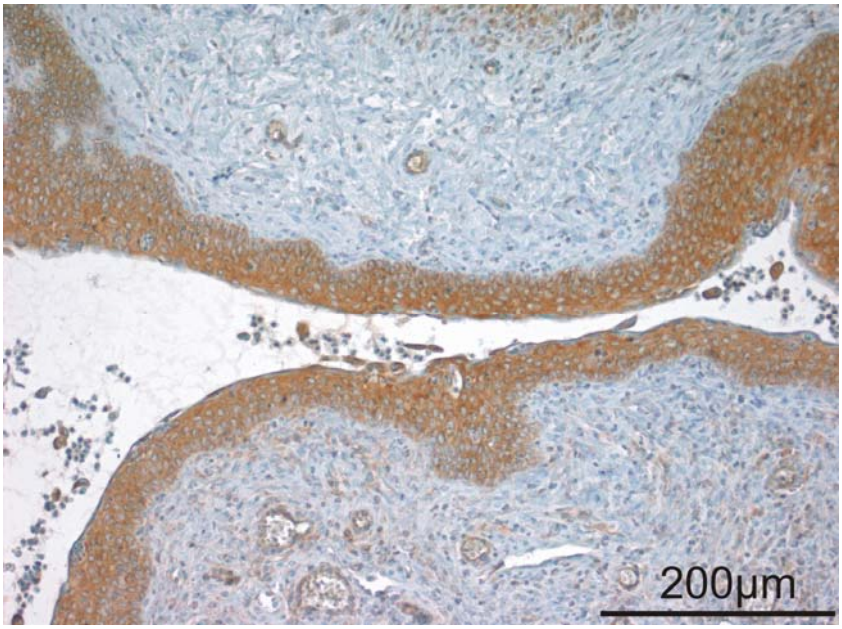


Abbildung 39: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Vagina einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Gut erkennbarer zytoplasmatischer Nachweis von CKIε im mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel. Vergr.10fach.

4.2.3.11 Expression von CKIε im Nervensystem

Das Nervensystem ist in seiner Gesamtheit ein komplexes, hochentwickeltes Koordinationsorgan, das Informationen aus Umwelt und Körperinnerem aufnimmt, verarbeitet und darauf mit lebenserhaltenden Reaktionen und Aktionen antwortet. Dafür bedient es sich elektrischer Erregungen und Neurotransmitter.
Das Nervensystem gliedert sich in Zentralnervensystem (ZNS) und peripheres Nervensystem (PNS). Zum ZNS gehören Gehirn und Rückenmark, zum PNS zählen die Ganglien und die peripheren Nerven (Welsch 2006e).
In dieser Arbeit wurden vom Gehirn Schnitte durch die Großhirnhemisphären und das Kleinhirn angefertigt. Bei der Untersuchung auf eine CKIε-Expression wurde auf die verschiedenen Hirnregionen nicht näher eingegangen. Anhand der in Tabelle 14 aufgeführten Ergebnisse kann so ein grober Überblick über die Verhältnisse der Expression von CKIε im Nervensystem gewonnen werden.

Das Gewebe des ZNS ist aus grauer und aus weißer Substanz aufgebaut. Die graue Substanz besteht aus den Perikarya von Neuronen und aus Nervenfasern, die weiße Substanz enthält vorwiegend myelinisierte Neuronfortsätze.
Im Gehirn, das in Endhirn und Kleinhirn unterteilt wird, bildet die graue Substanz die Rinde sowie die Kerngebiete, die im Inneren in der weißen Substanz eingebettet sind.
Die Endhirnrinde besteht zu 95% aus dem Isokortex (keine Abbildung), in dem die Neurone in sechs Schichten angeordnet sind. Allerdings ist dieser typische Aufbau nicht durchgehend in der Endhirnrinde zu finden, sondern die Anzahl und die Gestalt der Schichten ist von Region zu Region variabel. Ungefähr 85% der Neurone des Isokortex sind Pyramidenzellen (Welsch 2006e). Auf die Details im Aufbau der Endhirnrinde wurde bei der Untersuchung der CKIε-Expression nicht näher eingegangen. Insgesamt ist in den Perikarya der Neurone eine mäßige Anfärbung auf CKIε zu erkennen. Das Neuropil, das Nervengewebe, das den Raum zwischen den Perikarya in der grauen Substanz einnimmt, zeigt eine gleichmäßige blasse Färbung. Die weiße Substanz erscheint CKIε negativ. In den hier anzutreffenden Gliazellen ist jedoch eine deutliche Markierung zu sehen.

Tabelle 14: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in neuralem Gewebe. Der Nachweis von CKIε wurde evaluiert anhand der Intensität der spezifischen Farbreaktion der verwendeten CKIε spezifischen Antikörper 712 und sc-25423. Die verwendete Skalierung: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark. Angaben mit Schrägstrich (z.B. -/+ oder ++/+++) bedeuten ein heterogenes Expressionsmuster, in dem Zellen mit den verschiedenen, jeweils genannten Farbintensitäten zu finden sind.

Gewebe- / Zelltyp	712	sc-25423
Kleinhirn		
Molekularschicht	-	-
Purkinje-Zellschicht	-	-
Körnerzellschicht	-	-
Weiße Substanz	-	-
Astroglia	++	++
Endhirn		
Perikarya der Neurone	++	++
Neuropil	+	+
Weiße Substanz	-	-
Astroglia	++	++
Rückenmark		
Perikarya der Neurone	+++	+++
Neuropil	+	+
Weiße Substanz	-	-
Astrozyten	+	+
Spinalganglien		
Ganglienzellperikarya	+++	+++
Nervenfasern	+/++	+
Enterisches Nervensystem		
Ganglienzellperikarya	+++	+++
Nervenfasern	+/++	+
Peripherer Nerv		
Perikarya der Neurone	+++	+++
Nervenfasern	+	+

Das Kleinhirn beeinflusst den Muskeltonus und ist zuständig für Feinmotorik und Koordination.

Die Verhältnisse der CKIε-Expression sind hier in der weißen Substanz ähnlich wie im Endhirn. In der Kleinhirnrinde lassen sich jedoch Unterschiede erkennen. Sie ist, im Gegensatz zum Endhirn, überall ähnlich strukturiert und zeigt durchgehend einen gleichmäßigen Aufbau aus drei gut differenzierbaren Schichten. Von innen nach außen sind dies die Körnerschicht (Stratum

granulosum), die Purkinje-Zellschicht (Stratum ganglionare) und die Molekularschicht (Stratum moleculare) (zu sehen in Abbildung 40 A). Die Körnerschicht besteht aus dicht gepackten kleinen Körnerzellen, deren Axone sich in die Molekularschicht erstrecken. In ihren Perikarya lässt sich CKIε nicht nachweisen.

Die Purkinje-Zellschicht besteht aus einer einfachen Reihe großer Purkinje-Zellen, die ebenfalls keine Markierung auf CKIε aufweisen. Ihre Axone ziehen tief in die weiße Substanz, ihre Dendriten verzweigen sich in der Molekularschicht.

Die Molekularschicht ist sehr faserreich und es finden sich nur wenige Zellen. Auch hier ist keine Expression von CKIε zu detektieren.

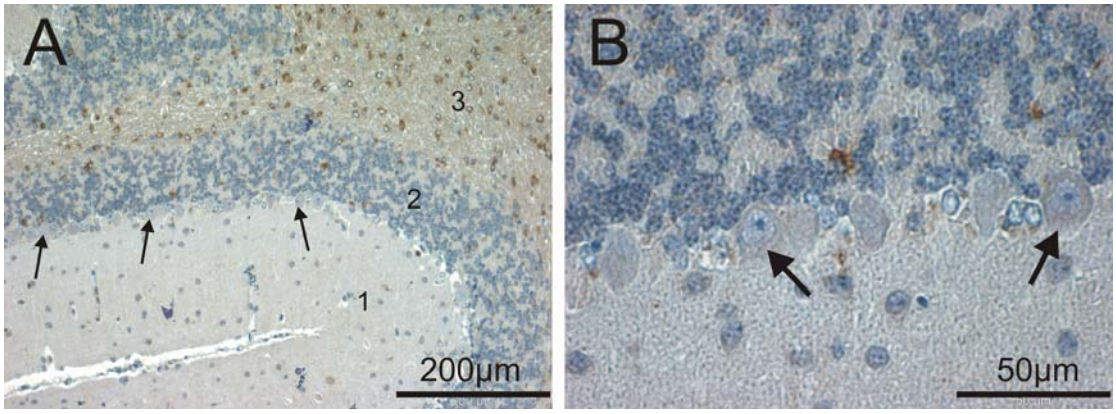


Abbildung 40: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Kleinhirn einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Gut sichtbar ist der dreischichtige Aufbau des cerebellären Cortex. Weder die Molekularschicht (1), noch die Purkinje-Zellen (Pfeile), noch die Körnerzellen (2) zeigen eine Farbreaktion auf CKIε. In der weißen Substanz (3) ist nur in den Perikarya der Astrogliazellen CKIε nachweisbar. Vergr. 10fach. **(B):** Ausschnitt aus dem Cortex. Die Pfeile deuten auf die großen, CKIε negativen Purkinje-Zellen, die zwischen Molekular- und Körnerzellschicht liegen. Vergr. 40fach.

Das Rückenmark liegt im Wirbelkanal und ist durchgehend prinzipiell gleich aufgebaut. Im Innern liegt der mit Liquor gefüllte Zentralkanal, umgeben von der schmetterlingsförmigen grauen Substanz, die weiße Substanz liegt außen. Es erscheint segmental organisiert durch den regelmäßigen Austritt der Spinalnervenpaare (Welsch 2006e). Die weiße Substanz besteht größtenteils aus longitudinal verlaufenden, markhaltigen Nervenfasern. Eine signifikante Färbung auf CKIε ist hier nicht erkennbar. Die graue Substanz enthält die Perikarya der Neurone, die alle eine deutliche CKIε-Markierung zeigen. Es werden Wurzelzellen und Binnenzellen unterschieden. Bei den Wurzelzellen handelt es sich um

motorische Neurone, die Binnenzellen sind Teil der afferenten Leitungsbahnen (Welsch 2006e).

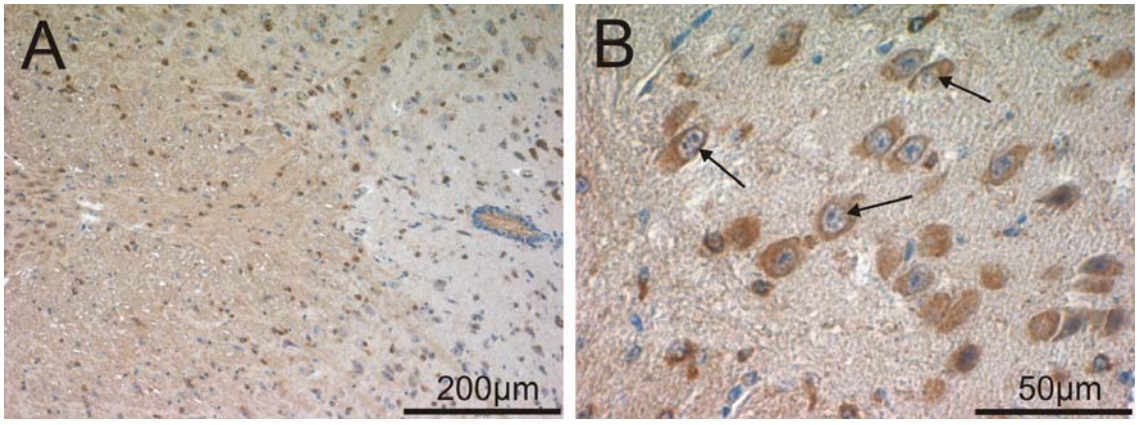


Abbildung 41: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Rückenmark einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε wurde detektiert durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Man sieht das positiv auf CKIε angefärbte Neuropil in der linken Bildhälfte und die nicht signifikant gefärbte weiße Substanz auf der rechten Seite. Vergr. 10fach. **(B):** Die Pfeile zeigen auf die multipolaren Nervenzellen in der grauen Substanz, welche eine stark positive Farbreaktion auf CKIε erkennen lassen. Vergr. 40fach.

Die Spinalganglien liegen benachbart zum Rückenmark. Sie befinden sich im Verlauf der Spinalnervenwurzeln, gehören aber zum peripheren Nervensystem. Sie bestehen aus zahlreichen Perikarya und aus Fortsätzen pseudounipolarer, sensibler Neurone. Die Perikarya sind von kleinen peripheren Gliazellen, den Satellitenzellen, umgeben.

Die Zellkörper der Neurone zeigen eine starke Färbung auf CKIε, auch das Geflecht aus Nervenfasern ist CKIε positiv.



Abbildung 42: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in einem Spinalganglion einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. CKIε-Nachweis mittels Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Die Übersichtsaufnahme dieses Spinalganglions lässt den Unterschied zwischen den stark CKIε positiven pseudounipolaren Ganglienzellen (Pfeile) und den viel helleren, schwächer gefärbten Nervenfasern deutlich werden. Vergr. 10fach.

Der Verdauungstrakt besitzt mit dem enterischen Nervensystem (ENS) in seiner Wand ein eigenes Nervensystem. Dessen Hauptbestandteile sind der Plexus submucosus (Meissner-Plexus) (dargestellt in Abbildung 23 B) und der Plexus myentericus (Auerbach-Plexus) (siehe Abbildung 43 A). Der Plexus submucosus ist unter der Tunica mucosa lokalisiert und innerviert diese, sowie die Ringmuskelschicht. Den Plexus myentericus findet man zwischen Längs- und Ringmuskelschicht, die beide von ihm innerviert werden. Insgesamt ist das ENS ein kompliziertes neuronales System, durch das der Verdauungstrakt weitgehend funktionell autonom ist (Lüllmann-Rauch 2006a). In diesem Zusammenhang sind auch die interstitiellen Zellen von Cajal (ICC) zu erwähnen, die in dieser Arbeit sonst nicht weiter berücksichtigt werden. Diese elektrisch spontan aktiven, fibroblastenähnlichen Zellen haben eine Schrittmacherfunktion und sind wichtig als Vermittler zwischen Muskulatur und ENS.

Die Plexus des ENS enthalten Ganglienzellen und ähneln in ihrer Erscheinung den Spinalganglien. Auch hier sind sowohl Nervenfasergeflecht, als auch die Perikarya der Ganglienzellen CKIε positiv, wobei besonders letztere eine starke Färbung zeigen.

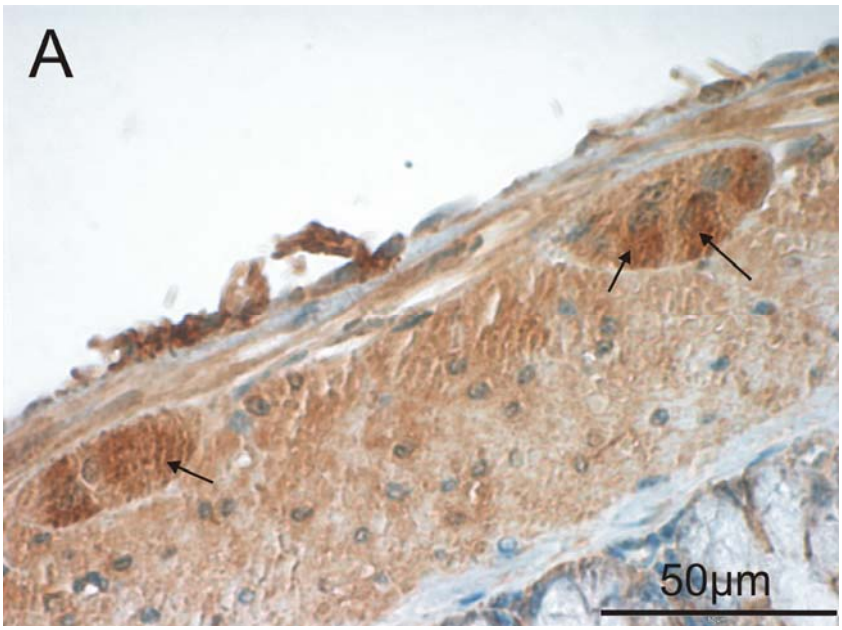


Abbildung 43: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im enterischen Nervensystem einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Dargestellt ist der Auerbach-Plexus. Die starke Anfärbung der Ganglienzellen (Pfeile) ist deutlich zu sehen. Die Nervenfasern sind etwas schwächer auf CKIε angefärbt. Vergr. 40fach. Ein Anschnitt des Meissner-Plexus ist in Abbildung 23 B (Kapitel 4.2.3.5) zu sehen (Stern).

In peripheren Nerven sind die Nervenfasern zu Faszikeln zusammengefasst. In diesen ist eine schwach positive Farbreaktion auf CKIε nachweisbar. Die Perikarya der Neurone des PNS lassen eine starke CKIε-Expression erkennen (nicht dargestellt).

4.2.3.12 Expression von CKIε im Auge

Bei der Maus, wie auch beim Menschen, stellt das Auge das paarige Sehorgan dar, das aus Augapfel (Bulbus oculi) und diversen Schutz- und Hilfsorganen (wie dem Augenlid oder der Tränendrüse) besteht. Die Wand des annähernd kugelförmigen Augapfels ist aus drei Schichten aufgebaut, dies sind die äußere Augenhaut (Tunica fibrosa bulbi), bestehend aus Sklera und Kornea, die mittlere Augenhaut (Uvea), bestehend aus Choroidea, Ziliarkörper und Irisstroma, und die aus zwei Blättern bestehende innere Augenhaut, welche auch als Retina bezeichnet wird.

Bei der Maus füllt die nahezu sphärische Linse den größten Teil des Augapfels aus. Der durchsichtige, gallertartige Glaskörper (Corpus vitreum) füllt den Raum

zwischen Linse und Retina. Beim Menschen sind die Größenverhältnisse dagegen eindeutig zu Gunsten des Glaskörpers verteilt.

Der hintere Abschnitt des Augapfels wird vom hinteren Teil der Retina, der so genannten Pars optica retinae ausgekleidet. Nur in diesem Teil enthält sie Lichtrezeptorzellen und weist einen komplexen Schichtenbau auf (zu sehen in Abbildung 44 B). In der Literatur werden für den Menschen traditionell zehn Schichten beschrieben. Hier werden nur die eindeutig identifizierbaren und auch für die Maus geltenden Schichten aufgeführt. Dies sind von außen nach innen folgende:

1) Pigmentepithelschicht (Stratum pigmentosum): Sie enthält die Fortsätze der Photorezeptorzellen.
2) Photorezeptorzellschicht: Sie wird weiter unterteilt in äußeres Segment und inneres Segment.
3) Äußere Körnerschicht (Str. nucleare externum): Sie enthält die Perikaryen der Photorezeptorzellen (entspricht dem 1.Neuron).
4) Äußere plexiforme Schicht (Str. plexiforme externum): Diese Schicht enthält Synapsen zwischen 1. und 2. Neuron und Horizontalzellen.
5) Innere Körnerschicht (Str. nucleare internum): Sie enthält Perikarya der bipolaren Zellen (entspricht dem 2.Neuron), außerdem der Horizontalzellen, der Müller-Zellen und amakrinen Zellen.
6) Innere plexiforme Schicht (Str. plexiforme internum): Sie enthält die Synapsen zwischen 2. und 3. Neuron und amakrinen Zellen.
7) Ganglienzellschicht (Str. ganglionicum): Diese Schicht enthält die Perikarya der Optikusganglienzellen (entspricht dem 3. Neuron).

Eine Macula lutea, der Bereich der zentralen Retina, in dem beim Menschen die meisten Zapfen konzentriert sind, existiert bei der Maus als nachtaktivem Tier nicht.

Tabelle 15: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) im Auge. Die Stärke der Expression wurde anhand der Farbintensität nach immunhistochemischer Färbung mit den CKIε spezifischen Antikörpern 712 und sc-25423 beurteilt. Die verwendete Skalierung: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark. Angaben mit Schrägstrich (z.B. -/+ oder ++/+++) bedeuten ein heterogenes Expressionsmuster, in dem Zellen mit den verschiedenen, jeweils genannten Farbintensitäten zu finden sind.

Gewebe- / Zelltyp	712	sc-25423
Auge		
Kornea		
Stroma corneae	-	-
Epithel	++	++
Sklera	-	-
Iris		
Stroma	++	+
Epithel	+	+
Choroidea	++	++
Ziliarkörper		
Musculus ciliaris	+	+
Ziliarepithel	++	+
Linse		
Kapsel	-	-
Linsenepithel	+	+
Rinde	++	++
Kern	-	-
Retina		
Stratum pigmentosum	+	++
Photorezeptorzellschicht		
Äußeres Segment	-	-
Inneres Segment	+++	++
Str. nucleare externum	-	-
Str. plexiforme externum	++	++
Str. nucleare internum	-	-
Str. plexiforme internum	+	++
Str. ganglionicum	+	+

Bei den verschiedenen Geweben, die im Auge zu finden sind, sind deutliche Unterschiede für die Expression von CKIε erkennbar. So sind Sklera und das Stroma der Kornea CKIε negativ, das Epithel der Kornea zeigt jedoch eine deutliche Markierung.

Iris und Choroidea zeigen beide eine ähnliche, mäßige Farbreaktion auf CKIε.

Der Ziliarkörper weist einen positiven CKIε-Nachweis auf, für die Linse gilt dies nur für das einschichtige, kubische Epithel und die Linsenrinde.

In der Retina ist die Expression von CKIε von Schicht zu Schicht verschieden. Mit beiden verwendeten CKIε spezifischen Antikörpern lässt sich CKIε in den zwei Körnerschichten und im äußeren Segment der Photorezeptorzellschicht gar nicht, und in der Ganglienzellschicht nur schwach nachweisen. Bei den übrigen Schichten gibt es zwischen beiden Antikörpern leichte Unterschiede. So fällt bei immunhistochemischer Färbung mit dem Antikörper 712 in der inneren plexiformen Schicht eine leichte, in der äußeren plexiformen Schicht eine mäßige und im inneren Segment der Photorezeptorzellschicht eine starke Anfärbung für CKIε auf, während diese drei Schichten bei Färbung mit dem Antikörper sc-25423 allesamt eine mäßige Markierung auf CKIε zeigen.

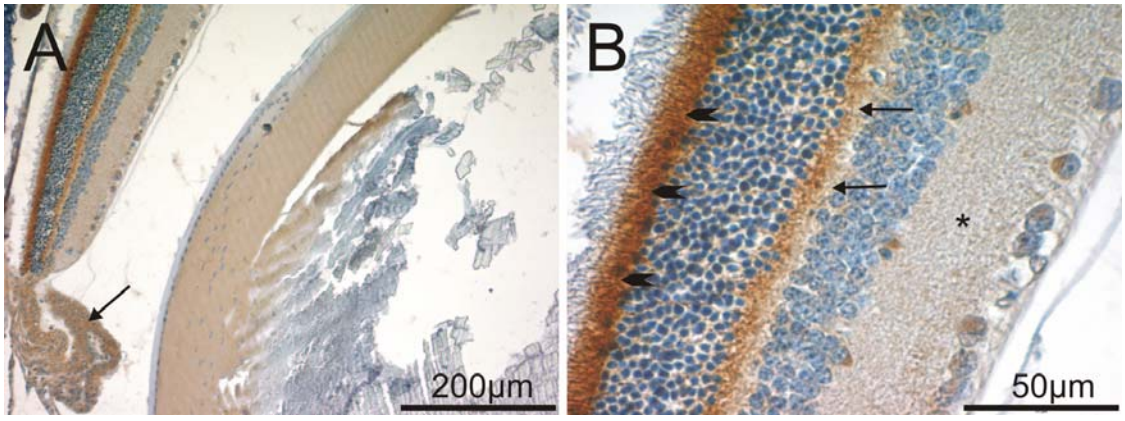


Abbildung 44: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Auge einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A):** Am unteren Rand der Retina ist der Ziliarkörper zu sehen (Pfeil). Das Oberflächenepithel und der Ziliarmuskel zeigen eine leichte Markierung auf CKIε. Rechts im Bild ist die Linse angeschnitten, die im Rindenbereich CKIε positiv ist. Vergr. 10fach. **(B):** Die einzelnen Schichten der Retina sind gut zu unterscheiden. Eine schwach positive Reaktion auf CKIε erkennt man im Stratum plexiforme internum (Stern), deutlich stärker zeigt sich die Farbreaktion im Stratum plexiforme externum (Pfeile) und besonders stark ist sie im inneren Segment der Photorezeptorzellschicht (Pfeilspitzen). Vergr. 40fach.

4.2.4 Expressionsunterschiede zwischen CKIδ und CKIε

Die zu CKIε nah verwandte CKI-Isoform CKIδ zeigt in Organen junger, adulter BALB/c Mäuse sehr ähnliche Lokalisations- und Expressionsmuster (Lohler et al. 2009). Dennoch ergeben sich im Vergleich in einigen Organen und Geweben Expressionsunterschiede zwischen CKIδ und CKIε, welche in der nachfolgenden Tabelle 16 zusammengestellt sind.

Tabelle 16: Expressionsunterschiede zwischen Casein Kinase Iδ (CKIδ) und Casein Kinase Iε (CKIε) in verschiedenen Organen. Zur Übersicht von Detektion und Expression von CKIδ siehe (Lohler et al. 2009). Die Detektion von CKIε wurde evaluiert anhand der Intensität der spezifischen Farbreaktion der verwendeten CKIε spezifischen Antikörper 712 und sc-25423. Die verwendete Skalierung: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark. Angaben mit Schrägstrich (z.B. -/+ oder ++/+++) bedeuten ein heterogenes Expressionsmuster, in dem Zellen mit den verschiedenen, jeweils genannten Farbintensitäten zu finden sind.

	Expression	
Gewebe- / Zelltyp	**CKIδ**	**CKIε**
Binde-/ Stützgewebe		
Osteoblasten	-	+++
Osteozyten	-	+
Muskelgewebe		
Glatte Muskelzellen	-/+	++
Gefäßendothel		
Hohe endotheliale Venolen	-/+	++
Ösophagus		
Oberflächenepithel Str. basale/ parabasale	-	++
Magen		
Nebenzellen	+/+++	+
Parietalzellen	-	+/++
Dünndarm/ Dickdarm		
Paneth-Zellen	-	-/+
Becherzellen	-	-/++

Speicheldrüsen		
Seröse Endstücke	++/+++	-
Muköse Endstücke	-	+
Pankreas (exokrin)		
Seröse Drüsenendstücke	++	-/+
Leber		
Epithel der Gallengänge	-	++
Niere		
Epithel Sammelrohre	++/+++	+
Harnblase		
Urothel Superfizialschicht	-	++
Ovar		
Theca folliculi	-	+
Oozyt	-	+/++
Kleinhirn		
Purkinje-Zellen	++	-
Astroglia	-	++
Auge		
Iris Stroma	-	++
Choroidea	-	++
Retina Str. nucleare internum Str. ganglionicum	 ++ +++	 - +

4.3 Expression von CKIε in Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe

4.3.1 Expression von CKIε im duktalen Mammakarzinom in Mäusen

SV40 T-Ag transgene Mäuse des Mausstammes NP8 entwickeln in der Regel innerhalb von durchschnittlich sechs Monaten nach der Induktion von SV40 T-Ag durch die erste Schwangerschaft und die erste Laktation ein makroskopisch erkennbares Mammakarzinom (Schulze-Garg et al. 2000).
Um die Expression von CKIε in murinen Mammakarzinomen untersuchen und mit der Expression von CKIε in normalem Brustdrüsengewebe vergleichen zu können, wurde aus 18 SV40 T-Ag transgenen Tieren jeweils normales und auch karzinomatös verändertes Brustdrüsengewebe entnommen. Bei einigen Tieren gelang es dabei, auch Gewebe von nicht invasiven in situ Karzinomen zu erhalten. Die Gewebeproben wurden fixiert und in Paraffin eingebettet. CKIε wurde dann in paraffineingebettetem Normal- und Tumorgewebe immunhistochemisch mit dem CKIε spezifischen Antikörper 712 (siehe Material und Methoden) nachgewiesen. Parallel dazu wurden immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von aktiviertem SV40 T-Ag mit dem T-Ag spezifischen Antikörper R 15 (siehe Material und Methoden) durchgeführt.
Um einen besseren Überblick zu bekommen, wurden die Ergebnisse zunächst tabellarisch zusammengestellt (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in Normalgewebe, in nicht-invasivem Tumorgewebe und in invasivem Tumorgewebe von Mäusen mit duktalem Mammakarzinom, sowie Tendenz der Expression von CKIε im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Die Stärke der Expression wurde anhand der Farbintensität nach immunhistochemischer Färbung mit dem CKIε spezifischen Antikörper 712 beurteilt. Die verwendete Skalierung für die Expression von CKIε: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark. Die Skalierung für die Tendenz der Expression von CKIε im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe: ↓↓ deutlich schwächer, ↓ schwächer, ↔ gleich, ↑ stärker, ↑↑ deutlich stärker. Angaben mit Schrägstrich (z.B. ++/+++) bedeuten ein heterogenes Expressionsmuster, in dem Zellen mit den verschiedenen, jeweils genannten Farbintensitäten zu finden sind. Ø bedeutet, dass kein entsprechendes Präparat vorhanden war.

			CKIε Expression			
Nr.	**Maus**	**Typ**	**Normal-gewebe**	**In situ Karzinom**	**Invasives Karzinom**	**Tendenz**
1	M 82	SV40 T-Ag transgen	+++	++	+	↓↓
2	M 188		+++	Ø	+	↓↓
3	M 86		++	Ø	+	↓↓
4	M 88		+++	Ø	+	↓↓
5	M 186		+++	Ø	+/++	↓
6	M 92		+++	Ø	+	↓↓
7	M 93		+++	Ø	+	↓↓
8	M 102		+++	++	+/++	↓
9	M 175		+++	++	+	↓↓
10	M 174		+++	Ø	++	↓
11	M 172		+++	Ø	+	↓↓
12	M 106		++	++	+	↓
13	M 170		+++	Ø	++	↓
14	M 110		+++	+	+	↓↓
15	M 111		++	Ø	+	↓
16	M 168		+++	Ø	+/++	↓↓
17	M 125		+++	++	+	↓↓
18	M 124		++	Ø	+	↓

Wie aus der oben stehenden Tabelle ersichtlich, wird die Expression von CKIε in Normalgewebe und in Tumorgewebe untersucht, wobei beim Tumorgewebe zwischen Gewebe von in situ Karzinomen und von invasiven Karzinomen unterschieden wird. Zur Beurteilung der Tendenz der CKIε-Expression wird das Normalgewebe direkt mit dem Gewebe der invasiven Karzinome verglichen. Gewebe von in situ Karzinomen konnte nicht von allen Tieren gewonnen werden. Bei denen dies gelang, wurde die Expression von CKIε in den Schnittpräparaten der in situ Karzinome beurteilt und in die Tabelle aufgenommen.

Im Normalgewebe zeigen die Drüsenepithelzellen und die Epithelzellen des Ausführungsgangsystems eine starke, meist sogar eine sehr starke

zytoplasmatische Expression von CKIε. Die Tumorzellen der in situ Karzinome lassen überwiegend eine mäßige CKIε spezifische Färbung erkennen. In den Paraffinschnitten der invasiven Karzinome ist diese CKIε spezifische Markierung der Zellen größtenteils nur noch ganz schwach erkennbar, bei einigen wenigen Präparaten ist sie mäßig. Insgesamt ist erkennbar, dass sich die Expression von CKIε in den Tumorzellen des duktalen invasiven Mammakarzinoms bei Mäusen im Vergleich zum normalen Brustdrüsengewebe deutlich schwächer darstellt. Und auch die Tumorzellen der hier untersuchten in situ Karzinome lassen bereits eine schwächere Färbung auf CKIε erkennen, als dies in den Epithelzellen des unveränderten Brustdrüsengewebes der Fall ist. Diese Expressionsunterschiede sind in Abbildung 45 B beispielhaft dargestellt. In Abbildung 45 A ist, ebenfalls beispielhaft, das Ergebnis der immunhistochemischen Detektion von induziertem T-Ag gezeigt. Hier ist erkennbar, dass bereits in den Epithelzellen von noch unverändertem Brustdrüsengewebe SV40 T-Ag aktiviert exprimiert ist und es auch in den in situ Karzinomen und in undifferenzierten invasiven Karzinomen noch nachweisbar ist.

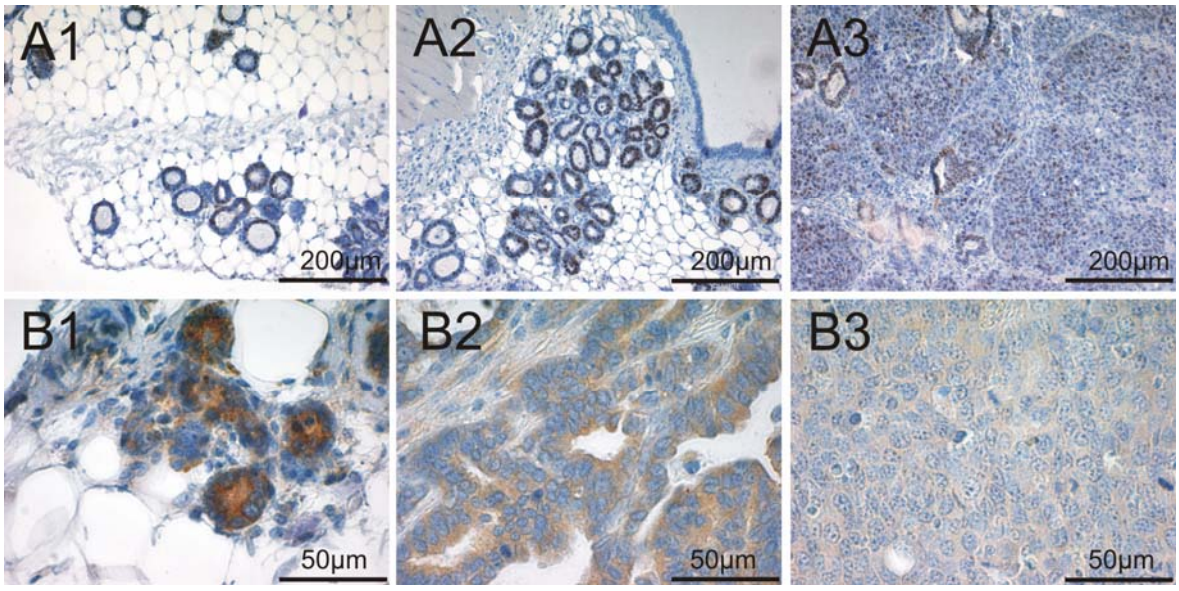


Abbildung 45: Immunhistochemischer Nachweis von T-Antigen (T-Ag) (A) und Casein Kinase Iε (CKIε) (B) jeweils in Normalgewebe (1), in Gewebe eines in situ Karzinoms (2) und in Gewebe eines invasiven Mammakarzinoms (3) der Maus M125. Detektion von T-Ag durch den Antikörper R 15. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. **(A1/A2/A3):** Bereits im Normalgewebe ist in den Drüsenepithelzellen T-Ag aktiviert, was anhand der deutlichen Farbreaktion zu sehen ist. Ähnlich stark ist der T-Ag-Nachweis im in situ Karzinom. In einem großen Teil der Zellen des invasiven Karzinoms ist ebenfalls eine spezifische Färbung auf T-Ag erkennbar. Dies zeigt, dass T-Ag auch hier noch aktiviert ist. Vergr. jeweils 10fach. **(B1/B2/B3):** Im Drüsenepithel des Normalgewebes zeigt sich eine sehr starke Expression von CKIε. In den Zellen des hier gezeigten in situ Karzinoms ist die Anfärbung auf CKIε noch deutlich, erscheint aber etwas schwächer. In den Zellen des invasiven Karzinoms ist die eindeutig schwächere Expression von CKIε im Vergleich zum Normalgewebe klar erkennbar. Vergr. jeweils 40fach.

4.3.2 Expression von CKIε im humanen kolorektalen Karzinom

Um die Expression von CKIε im humanen kolorektalen Karzinom untersuchen und mit der Expression von CKIε im Normalgewebe vergleichen zu können, wurden von 30 Patienten Gewebeproben sowohl aus einem gesunden Abschnitt des Kolorektums, als auch aus dem vom Karzinom befallenen Abschnitt entnommen. Von diesen Gewebeproben wurden Paraffinpräparate hergestellt, die immunhistochemisch mit dem CKIε spezifischen Antikörper 712 gefärbt wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Nach der WHO wird das kolorektale Karzinom in folgende Stadien eingeteilt:

GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

Wie aus Tabelle 18 ersichtlich ist, ist in dem hier untersuchten Patientenkollektiv fast jedes Tumorstadium vertreten.

Tabelle 18: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in Normalgewebe und im Tumorgewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom, sowie Tendenz der Expression von CKIε im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Die Stärke der Expression wurde anhand der Farbintensität nach immunhistochemischer Färbung mit dem CKIε spezifischen Antikörper 712 beurteilt. Die verwendete Skalierung für die Expression von CKIε: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark. Die Skalierung für die Tendenz der Expression von CKIε im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe: ↓ schwächer, ↔ gleich, ↑ stärker.

Patient Nr.	Grading	Normal-gewebe	Tumor-gewebe	Tendenz
1	G1	++	++	↔
2	G1-2	++	++	↔
3	G2	++	++	↔
4		++	+++	↑
5		++	+++	↑
6		++	+++	↑
7		++	+++	↑
8		++	+	↓
9		++	+++	↑
10		+++	++	↓
11		++	++	↔
12		++	++	↔
13		+++	++	↓
14		++	++	↔
15		++	++	↔
16		++	+	↓
17		++	++	↔
18		+++	+++	↔
19	G2-3	++	++	↔
20		++	++	↔
21		+++	+++	↔
22		++	++	↔
23	G3	++	+	↓
24		++	+	↓
25		++	+++	↑
26		++	+	↓
27		+++	++	↓
28		++	++	↔
29	G3-4	+++	+++	↔
30		++	+++	↑

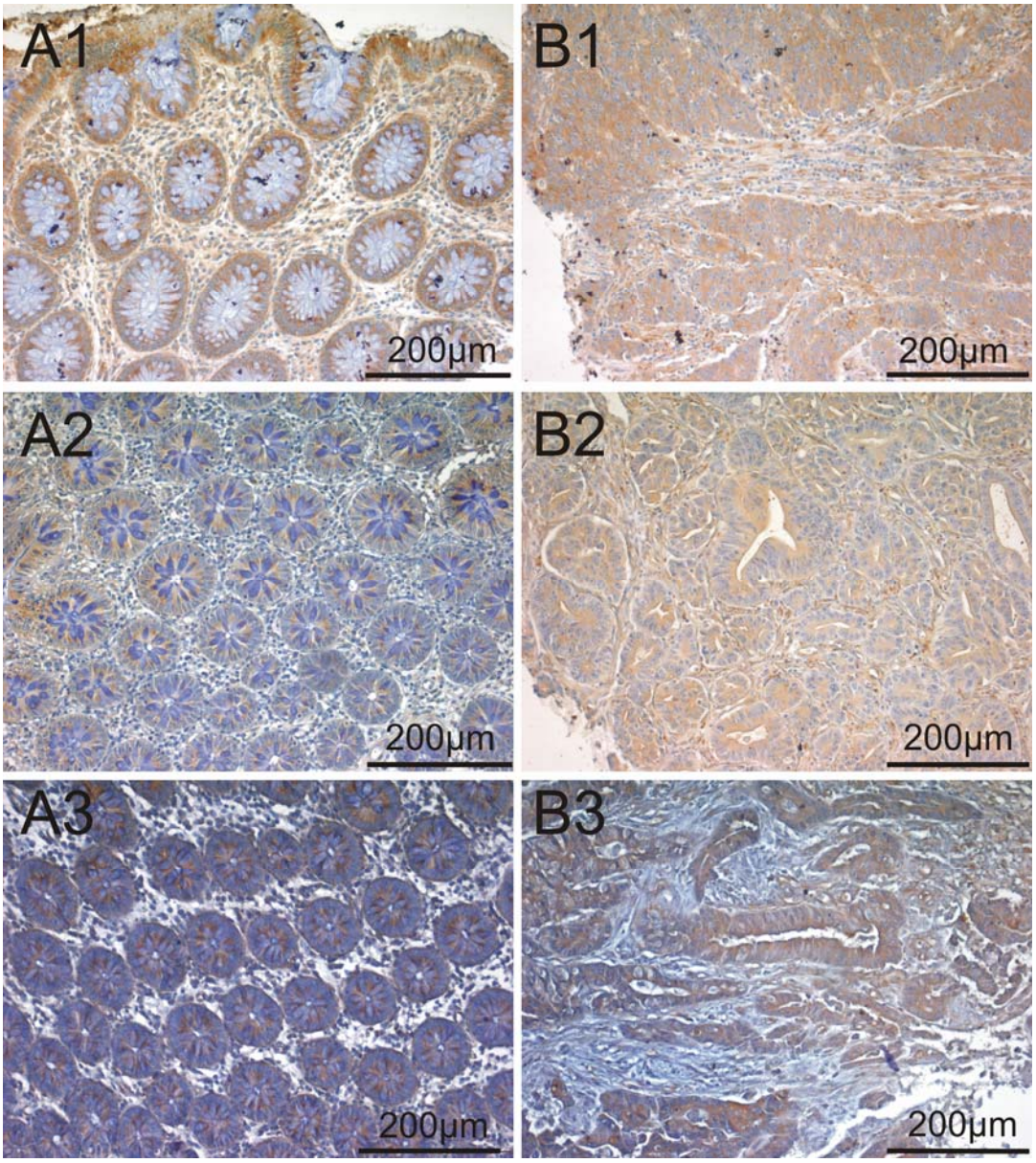


Abbildung 46: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in Normalgewebe (A) und Tumorgewebe (B) aus dem menschlichen Kolon. Detektion von CKIε durch den Antikörper 712. Immersionsfixation, Peroxidasereaktion, Farbstoff DAB. Vergr. 10fach. **(A1/B1):** Im Normalgewebe aus dem Kolon dieses Patienten ist eine moderate zytoplasmatische Färbung auf CKIε der Epithelzellen und der Becherzellen zu erkennen. Vom selben Patienten stammt das Tumorgewebe. Es handelt sich um ein kolorektales Karzinom WHO Grad 1. Die zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen ist vergleichbar mit der des Normalgewebes. **(A2/B2):** Die Epithelzellen des Normalgewebes und die Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms WHO Grad 2 dieses Patienten zeigen eine mittelmäßige zytoplasmatische Expression von CKIε. **(A3/B3):** Gezeigt sind Gewebeproben aus Normalgewebe und aus einem kolorektalen Karzinom WHO Grad 3 eines Patienten. Sowohl im Epithel des Normalgewebes, als auch in den Tumorzellen des Karzinoms ist eine starke Expression von CKIε nachweisbar, wobei die Expression in den Tumorzellen im Vergleich zum Normalgewebe etwas stärker erscheint.

Die Zellen des Oberflächenepithels aus dem Normalgewebe weisen alle eine mäßige oder starke zytoplasmatische Färbung auf CKIε auf. Die Expression von CKIε in den Zellen der kolorektalen Karzinome variiert etwas mehr. So findet man

einige Karzinome, deren Zellen eine eher schwache Markierung auf CKIε zeigen, bei den meisten ist die CKIε spezifische Färbung jedoch mäßig oder stark. Dabei fällt auf, dass diese Expressionsstärke vom Tumorstadium unabhängig zu sein scheint. Vergleicht man die Gewebeschnitte der kolorektalen Karzinome mit dem jeweils korrespondierenden Gewebeschnitt aus Normalgewebe, lassen sich drei Klassen identifizieren. Bei 15 Patienten ist kein Unterschied in der Expression von CKIε festzustellen. Bei 7 Patienten erscheint die CKIε spezifische Färbung im Tumorgewebe etwas stärker als im Normalgewebe. Bei 8 Patienten zeigt sich eine leicht schwächere Markierung auf CKIε im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Wiederum scheint dabei das Tumorstadium unerheblich zu sein. Außerdem ist zu erwähnen, dass die zum Teil festgestellten Expressionsunterschiede zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe nur minimal und oft nicht eindeutig erkennbar sind. In Abbildung 46 sind Normalgewebe und Tumorgewebe von drei Patienten jeweils verschiedener Stadien dargestellt, die auch für diese gesamte Untersuchung repräsentativ sind.

5. Diskussion

Die Isoform CKIε phosphoryliert eine große Zahl verschiedener Schlüsselproteine, welche in diversen biologischen Prozessen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose oder zirkadianer Rhythmik eine wichtige Rolle spielen. Daher wurden Deregulationen von CKIε mit der Entstehung von Krankheiten, insbesondere von Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht (Knippschild et al. 2005).

In dieser Arbeit wurde mittels proteinbiochemischer Methoden und immunhistochemischer Analysen eine Charakterisierung der Expression und Lokalisation von CKIε in verschiedenen Geweben und Organen gesunder, junger adulter BALB/c Mäuse durchgeführt, um neue Hinweise über mögliche Funktionen von CKIε unter physiologischen Bedingungen zu erhalten.
Des Weiteren wurde immunhistochemisch die Expression von CKIε in Gewebe muriner Mammakarzinome und in Gewebe humaner kolorektaler Karzinome untersucht, was neue Anhaltspunkte für den Einfluss von CKIε in der Karzinogenese dieser Tumorentitäten erbrachte.

5.1 Expression von CKIε in unterschiedlichen Organen

Die zu Beginn durchgeführten Western Blot-Analysen erbrachten den Nachweis einer ubiquitären Expression von CKIε. Dabei zeigte sich eine besonders hohe Expression in den Organen Lunge und Gehirn.
Es ist anzumerken, dass bei den Western Blot-Analysen die untersuchten Organe als Ganzes betrachtet wurden und dass die verschiedenen Zellpopulationen der Organe nicht einzeln untersucht werden konnten. Daher ist es auch nicht möglich, die Expression und die Lokalisation von CKIε in den diversen Zelltypen der Gewebe und Organe durch Untersuchungen von Proteinlysaten der ganzen Organe zu charakterisieren.

5.2 Mögliche Rolle von CKIε im Muskelgewebe

Die immunhistochemischen Analysen konnten eindeutig eine Expression von CKIε im überwiegenden Teil der Zellen der quergestreiften Muskulatur, sowie im gesamten glatten Muskelgewebe nachweisen. In den CKIε positiven Skelettmuskelfasern zeigte sich dabei ein inhomogenes Expressionsmuster, das dem Querstreifungsmuster des Skelettmuskels entspricht, was durch die Bauweise der Myofibrillen hervorgerufen wird. Dieses Ergebnis spricht für eine Interaktion von CKIε mit Teilen des muskulären Zytoskeletts und Myofilamenten.
Dies wird dadurch unterstützt, dass unter den bekannten CKI-Substraten auch Proteine des Zytoskeletts wie Spectrin, Troponin und Myosin sind (Simkowski and Tao 1980). Myosin ist ein essentieller Baustein der Muskulatur und für die Kontraktionsfähigkeit von großer Bedeutung. Myosinfilamente sind in der Skelettmuskulatur bandenartig angeordnet und wechseln sich mit Banden von Aktinfilamenten ab. Troponin ist als Begleitprotein des Aktins ebenfalls Bestandteil der quergestreiften Muskulatur (Lüllmann-Rauch 2006a). Die regelmäßige Anordnung von Myosin und Troponin, mit welchen CKIε vermutlich interagiert, könnte eine Erklärung für das bandenartige Expressionsmuster von CKIε im Skelettmuskel sein. Welche Funktionen CKIε möglicherweise durch die Interaktion mit Bausteinen des Muskelgewebes übernimmt und ob CKIε dadurch einen Einfluss auf die Muskelkontraktion hat, müssen weitere Untersuchungen klären.
Eine andere Möglichkeit wäre, dass CKIε regulierende Aufgaben in der Energieversorgung der Muskulatur hat. Dafür spricht die Tatsache, dass CKI in der Lage ist, die Glykogensynthase des Skelettmuskels zu phosphorylieren und dadurch zu inhibieren (Flotow and Roach 1989). Die Glykogensynthase ist ein essentielles Enzym für die Synthese von Glykogen, dem Energiereservestoff der Muskulatur.

5.3 Mögliche Rolle von CKIε im Immunsystem

Das humane Immunsystem kann in die angeborene oder unspezifische Abwehr und in die erworbene oder spezifische Abwehr untergliedert werden, die sich beide funktionell ergänzen und eng miteinander verknüpft sind. Die Aufgabe der unspezifischen Abwehr, die von Geburt an aktiv ist, ist die Sofortverteidigung gegen Krankheitserreger, sowie die Initiierung einer spezifischen Immunantwort. Neben humoralen Faktoren sind vor allem natürliche Killerzellen (NK-Zellen), neutrophile Granulozyten und Makrophagen in der unspezifischen Abwehr von Bedeutung (Lüllmann-Rauch 2006a). Makrophagen sind im ganzen Körper verteilt anzutreffen. Die immunhistochemischen Analysen zeigen eine überwiegend starke, teilweise auch mäßige Expression von CKIε in Makrophagen. In erster Linie wurden die Makrophagen in den lymphatischen Organen und die Alveolarmakrophagen der Lunge untersucht (siehe Kapitel 4.2.3.3 und Kapitel 4.2.3.4). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass CKIε einen Einfluss auf die physiologischen Funktionen der Makrophagen hat und eine Rolle in der unspezifischen Abwehr spielt.

Bereits zuvor wurde in Studien gezeigt, dass es bei der Granulozytendifferenzierung zu einer Expressionsabnahme von CKIε kommt (Okamura et al. 2004a). In Monozyten, den Vorläuferzellen der Makrophagen, wurde CKIε auf RNA-Ebene nachgewiesen (Okamura et al. 2004a). Dies sind ebenfalls Tatsachen, die auf mögliche Funktionen von CKIε in diesem Teil des Immunsystems hinweisen.

In der spezifischen Abwehr spielen die Lymphozyten die Hauptrolle. Sie können vereinfacht in B- und T-Lymphozyten eingeteilt werden. Sie haben unterschiedliche Funktionen, sind lichtmikroskopisch jedoch nicht zu unterscheiden. Die immunhistochemische Untersuchung der lymphatischen Organe lieferte kein einheitliches Expressionsmuster von CKIε der hier konzentriert zu findenden Lymphozyten.

Im Thymus findet man Vorläufer der T-Lymphozyten, so genannte Thymozyten. Im Rindenbereich finden sich größtenteils Thymozyten, die keine Expression von CKIε zeigen, es sind aber auch vereinzelte Thymozyten schwach CKIε positiv. Die Thymozyten in der Rinde vermehren sich stark, reifen und erhalten ihre

Immunkompetenz. Im Mark, in dem die Thymozyten bereits ausgereifte T-Lymphozyten sind, sind ebenfalls nur vereinzelt Thymozyten schwach auf CKIε angefärbt. Nach diesen Resultaten ist davon auszugehen, dass CKIε im Reifungsprozess der T-Lymphozyten eine Rolle spielen könnte und möglicherweise im Proliferations- und Vermehrungsprozess dieser Zellen involviert ist.

Die weiße Pulpa der Milz stellt das lymphatische Gewebe dieses Organs dar. Die Lymphozyten lassen hier meist keine Expression von CKIε erkennen (siehe Abbildung 16). Im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe sind es nur vereinzelte Lymphozyten, die eine schwache Markierung auf CKIε aufweisen. In den Lymphknoten lassen sich deutlich die veschiedenen Zonen unterscheiden. In der B-Zone lässt sich in den Primärfollikeln keine Expression von CKIε nachweisen. In diesem Bereich finden sich reife, naive B-Lymphozyten, die nicht proliferieren und noch nicht in Differenzierungsprozesse eingetreten sind. Die Mantelzone, die das Keimzentrum der Sekundärfollikel umgibt und die ebenfalls naive, ruhende Lymphozyten enthält, stellt sich ebenso CKIε negativ dar. In den Keimzentren hingegen ist der Nachweis einer mäßigen CKIε-Expression möglich. In ihnen finden Proliferation, Differenzierung und auch Apoptose von B-Lymphozyten statt. In der T-Zone, in der fast nur T-Lymphozyten anzutreffen sind, ist durchgehend eine schwache Expression von CKIε nachweisbar. Die Resultate der immunhistochemischen Untersuchung des Lymphknotens legen somit nahe, dass CKIε im Bereich der spezifischen Abwehr sowohl an den Proliferations-, Differenzierungs- und Apoptoseprozessen der B-Lymphozyten beteiligt ist, als auch in der Modulation der Funktionen der T-Zellen eine Rolle spielt. T-Helfer-Zellen sezernieren Zytokine und beeinflussen so Vorgänge der Immunabwehr. Zytotoxische T-Zellen sezernieren Perforine und Granzyme, die zum Tod der Zielzelle führen, sowie Zytokine, um Makrophagen zu aktivieren (Lüllmann-Rauch 2006a), weshalb die Rolle von CKIε hier im sekretorischen Prozess zu finden sein könnte.

Es ist keine genaue Aussage über die Rolle von CKIε in der spezifischen Abwehr möglich. Es ist anzunehmen, dass CKIε an der T-Zellfunktion beteiligt ist. In B-Zellen scheint dies nicht der Fall zu sein. Durch Northern Blot-Analysen konnte CKIε-RNA in Lymphozyten nachgewiesen werden, wobei hier nicht zwischen

B- und T-Lymphozyten unterschieden wurde (Okamura et al. 2004a). Ingesamt scheint die Rolle von CKIε im System der unspezifischen Abwehr ausgeprägter zu sein, als im System der spezifischen Abwehr. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass CKIε auf RNA-Ebene mittels Northern Blot-Analysen sowohl in hämatopoetischen Stammzellen, als auch in Monozyten detektiert wurde und durch den Nachweis, dass CKIε in der Granulozytendifferenzierung eine essentielle Rolle spielt (Okamura et al. 2004a). Die möglichen weiteren exakten Funktionen von CKIε im Immunsystem sind allerdings noch unklar und es wären eine Reihe genauerer Untersuchungen nötig, um sie klären.

5.4 Mögliche Rolle von CKIε in sekretorischen Prozessen

Studien brachten HRR25, das Homolog zu CKIε in Hefen, mit der Regulation von Membrantransportprozessen in Verbindung (Murakami et al. 1999) und auch die zu CKIε sehr eng verwandte Isoform CKIδ interagiert mit Memranstrukturen und Transportvesikeln (Behrend et al. 2000; Milne et al. 2001). Das lässt vermuten, dass auch CKIε eine Rolle bei Membran- und Vesikeltransport spielen könnte.
Der Nachweis einer starken Expression von CKIε in den Osteoblasten, bei welchen es sich um aktiv sezernierende Zellen mit großem Golgi-Apparat, vielen freien Ribosomen und gut entwickeltem endoplasmatischem Retikulum handelt, untermauert diese These. Auch die deutliche Anfärbung des inneren Segments der Photorezeptorzellen im Auge auf CKIε ist ein Hinweis, der zu dieser Annahme führt. Es ist das stoffwechselaktive Segment der Photorezeptorzellen. Es ist reich an Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum und ist Ort der Synthese und Sekretion des Sehpigments (Lüllmann-Rauch 2006a). CKIε könnte somit sowohl an den sekretorischen Abläufen, als auch an den Syntheseprozessen des Sehpigments beteiligt sein. Außerdem ist eine Funktion von CKIε an der Stoffaufnahme möglich. Studien in Hefen konnten nachweisen, dass CKI für die Endozytose eine wichtige Rolle spielt (Marchal et al. 2002). Weitere Untersuchungen müssen folgen, um dies zu klären.
In den Endothelzellen der Gefäße, in denen auch CKIε exprimiert wird, könnte CKIε ebenfalls eine Rolle in Sekretionsprozessen spielen, da es zu den Aufgaben

dieser Zellen gehört, verschiedene Proteine, Proteoglykane und Gerinnungsfaktoren an der Oberfläche zu exprimieren und/ oder zu sezernieren.
Im gesamten Organismus gibt es viele Zellarten mit sekretorischen Funktionen, spezialisiert darauf sind jedoch die Drüsenzellen. Dies sind einzelne oder in Verbänden zusammenhängende Epithelzellen, die ein Sekret mit biologischer Funktion ausschütten. Wird das Sekret direkt an die Oberfläche abgegeben oder über einen Gang, dann spricht man von exokriner Sekretion. Wird es ans umgebende Gewebe oder in die Blutbahn geleitet, dann handelt es sich um die so genannte endokrine Sekretion und das Sekret wird als Hormon bezeichnet, was im folgenden Kapitel besprochen wird.
Die Expression von CKIε ist in den verschiedenen Drüsen und Drüsenzellen nicht einheitlich. So zeigen die Pneumozyten Typ II (siehe Abbildung 19 B) und größtenteils auch die Becherzellen eine positive Färbung auf CKIε, während die Paneth-Zellen des Dünndarms (siehe Abbildung 22 B) nur vereinzelt eine schwache Markierung auf CKIε aufweisen. Die verschiedenen Drüsenzellen des Magens unterscheiden sich deutlich in der Stärke der CKIε-Expression. Ähnlich vielseitig ist das Expressionsmuster bei den Drüsenorganen Leber, exokrines Pankreas, Speicheldrüsen, Prostata und Brustdrüse. Außer in den serösen Anteilen der Speicheldrüsen (siehe Abbildung 24) konnte überall CKIε detektiert werden, die Expressionsstärke variiert zwischen den Organen jedoch zum Teil deutlich.
Diese Expressionsunterschiede von CKIε können damit zu begründen sein, dass die diversen Drüsenzellen und Drüsenorgane zum einen unterschiedliche Sekrete synthetisieren und zum anderen teilweise verschiedene Sekretionsmechanismen besitzen. CKIε scheint an den Prozessen der Sekretsynthese, an intrazellulären Transportvorgängen und an den Sekretionsmechanismen durchaus beteiligt zu sein. An welchen genau, und welche Funktion CKIε im Detail dabei hat, müssen weitere Untersuchungen klären.
Was die Annahme einer wesentlichen Rolle von CKIε speziell in sekretorischen Vorgängen ebenfalls noch unterstützt, ist die allgemein starke Expression von CKIε in den Drüsenausführungsgängen (siehe Abbildung 24 B, 25 B, 26, 34), die häufig nicht nur das Sekret ableiten, sondern auch selbst noch sekretorische Funktion haben.

5.5 Mögliche Rolle von CKIε in hormonellen Prozessen

Endokrine Drüsen geben Hormone ins umgebende Gewebe oder ins Blut ab. Da in allen für diese Arbeit untersuchten endokrinen Organen CKIε detektiert werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass CKIε in die Regulation hormoneller Prozesse, wie die Hormonbiosynthese, den intrazellulären Transport und die Hormonsekretion involviert ist.

In der Neurohypophyse ist die Expression von CKIε schwächer als in der Adenohypophyse (siehe Abbildung 28). Dies kann damit zusammenhängen, dass es sich hier um neuronales Gewebe handelt, aber auch damit, dass hier keine Hormonsynthese stattfindet. Die dennoch eindeutige Detektion von CKIε könnte ein Hinweis sein, dass CKIε eine Rolle in der in der Neurohypophyse stattfindenden, exozytotischen Hormonsekretion spielt.

Die verschiedenen Schichten der Nebennierenrinde zeigen unterschiedlich starke Färbungen auf CKIε (siehe Abbildung 27). Das könnte dadurch zu begründen sein, dass in den Schichten jeweils unterschiedliche Zelltypen zu finden sind oder dass verschiedene Hormone produziert werden. Ebenso könnte dieses Ergebnis durch unterschiedliche Aktivitätsgrade der Schichten zu erklären sein. Die etwas inhomogen erscheinende Färbung der Zona glomerulosa und der Zona fasciculata könnte dadurch bedingt sein, dass diese Schichten Steroidhormone synthetisieren und ihre Zellen durch Lipideinschlüsse gekennzeichnet sind.

Das Nebennierenmark ist neuronalen Ursprungs. Hier werden die Hormone Noradrenalin und Adrenalin synthetisiert und in Sekretionsgranula gespeichert. Die Untersuchung mit dem CKIε spezifischen Antikörper 712 ergab ein heterogenes Expressionsmuster für CKIε. Neben Zellen mit starker Markierung finden sich auch Zellnester, die keinen Nachweis von CKIε erbringen. Dies könnte bedeuten, dass sich diese Zellen in einem inaktiven Zustand befinden. Außerdem könnte das heterogene Markierungsmuster durch verschiedene Zelltypen im Mark zu erklären sein.

Bei der Schilddrüse fällt auf, dass vor allem in den sezernierenden Epithelien der aktiven Follikel CKIε nachweisbar ist, während die Epithelien der inaktiven Follikel nur eine schwache oder häufig auch gar keine Markierung auf CKIε zeigen

(siehe Abbildung 29). Dies könnte für eine Beteiligung von CKIε an der intralysosomalen Proteolyse des Thyreoglobulins sprechen.

Die Resultate der immunhistochemischen Analysen der endokrinen Organe liefern Hinweise für eine entscheidende Rolle von CKIε in der Regulation der Hormonsekretion. Sie stehen zudem in Einklang mit der regulierenden Funktion in der Vesikelbildung und im Vesikeltransport, die für Mitglieder der CKI-Familie postuliert wurde (Behrend et al. 2000; Dubois et al. 2002; Gross and Anderson 1998; Gross et al. 1997; Knippschild et al. 2005; Lohler et al. 2009; Murakami et al. 1999; Pyle et al. 2000; Wolff et al. 2006)

Auch in den Fettgewebszellen konnte im Zytoplasma eine deutliche Expression von CKIε nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11). Dies kann als Hinweis für einen Einfluss von CKIε auf die hier ablaufenden Prozesse der Lipogenese und der Lipolyse gedeutet werden. Diese Prozesse werden hormonell reguliert. Während die Lipogenese durch das Hormon Insulin gefördert wird, wird die Lipolyse durch Adrenalin und Glucagon stimuliert (Lüllmann-Rauch 2006b). Neben möglichen Aufgaben in diesen Prozessen sind auch regulatorische Funktionen von CKIε in der Hormonsynthese und der Hormonsekretion der Adipozyten wahrscheinlich. Adipozyten synthetisieren und sezernieren unter anderem die Adipokine und Hormone wie Leptin, Adiponektin und Estrogen. Es wurde beschrieben, dass die CKI-Isoform CKIγ2 durch Estrogen stimuliert werden kann, was zu einer Aktivitätssteigerung führt (Mishra et al. 2004). Eine solche hormonelle Stimulation wäre auch für CKIε denkbar. Um dies zu untersuchen, müssen weitere Analysen folgen.

5.6 Mögliche Rolle von CKIε im neuronalen Informationsaustausch

Es gibt inzwischen mehrere Hinweise, dass CKIε im komplexen neuronalen System und im neuronalen Informationsaustausch von Bedeutung ist. Studien konnten CKI mit neurodegenerativen Krankheiten in Verbindung bringen. Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass CKI das Signaltransduktionsmolekül DARPP-32 phosphoryliert, das in der dopaminergen Signalübertragung eine essentielle Rolle spielt (Desdouits et al. 1995).

Bis auf zwei Ausnahmen (Körnerzellschicht des Kleinhirns, Bindegewebshüllen der Nerven) konnte CKIε in allen untersuchten Bereichen des Nervensystems nachgewiesen werden. Insbesondere die Perikarya der Neurone zeigten überwiegend eine starke CKIε-Expression. Das Perikaryon versorgt alle Ausläufer des Neurons mit den nötigen Syntheseprodukten, wie zum Beispiel Neurotransmitter. Es ist das Zentrum der Biosynthese im Neuron. Die starke Markierung der Perikarya auf CKIε könnte darauf hinweisen, dass CKIε in hier ablaufende Syntheseprozesse involviert ist.

In den Axonen wurde CKIε ebenfalls detektiert. Sie dienen der Weiterleitung der elektrischen Erregung. Außerdem werden im Axon über den antero- und retrograden Transport Proteine und Organellen transportiert. Diese Transportvorgänge sind Aufgabe des neuronalen Zytoskeletts, das aus Mikrotubuli, Aktinfilamenten und aus Neurofilamenten besteht (Lüllmann-Rauch 2006b). Es wurde beschrieben, dass eine Phosphorylierung der Neurofilamente das Axonkaliber modulieren kann (de Waegh et al. 1992). Für CKI-Isoformen im Huhn wurde nachgewiesen, dass sie mit Neurofilamenten assoziieren können. Die zu CKIε weitgehend identische Isoform CKIδ ist in der Lage, α/β-Tubulin und zahlreiche andere Mikrotubuli-assoziierte Proteine zu phosphorylieren (Behrend et al. 2000; Wolff et al. 2005). CKIε könnte im Axon ähnliche Funktionen haben wie CKIδ. Es wäre auch durch weitere Untersuchungen zu klären, ob CKIε mit Neurofilamenten assoziieren oder diese phosphorylieren kann und so möglicherweise das Axonkaliber beeinflussen kann. Es ist wahrscheinlich, dass CKIε im axonalen Transport eine Rolle spielt.

Die deutliche Markierung auf CKIε in der Neurohypophyse, wo besonders viele Enden neurosekretorischer Nervenfasern zu finden sind, deutet darauf hin, dass

CKIε auch an der synaptischen Signalübertragung beteiligt sein könnte. Diese Vermutung wird durch den Nachweis gestärkt, dass CKI in der über NMDA-Rezeptoren vermittelten, glutamatergen synaptischen Signalübertragung als negativer Regulator fungiert (Chergui et al. 2005). Es konnte auch gezeigt werden, dass CKI in neuronalen Zellen Proteine des SNARE-Komplexes phosphorylieren kann und so Protein-Protein-Interaktionen und die synaptische Vesikel-Exozytose beeinflusst (Dubois et al. 2002; Lin and Scheller 2000; Pyle et al. 2000), Wolff et al. 2006).

Auch die Kerngebiete des ZNS zeigen eine positive Farbreaktion auf CKIε. Dieses Resultat spricht für eine Beteiligung von CKIε an spezifischen Prozessen in diesen Gebieten. Beispielsweise ist das System der zirkadianen Rhythmik im Kerngebiet des Hypothalamus angesiedelt und Studien konnten belegen, dass CKIε ein wichtiges Regulatorprotein dieses zirkadianen Systems ist (Ebisawa 2007; Miyazaki et al. 2001; Vielhaber et al. 2000).

Insgesamt liefern die Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen des Nervensystems Hinweise auf eine ganze Reihe möglicher regulatorischer Funktionen von CKIε im komplexen neuronalen Informationsaustausch. Genauere Aussagen lassen sich aber nicht treffen. Dazu müssen spezifischere Untersuchungen, die auch die unterschiedlichen Regionen und Zelltypen stärker berücksichtigen, folgen.

5.7 Mögliche Rolle von CKIε in Zellumsatzprozessen

In Epithelien findet ein ständiger Zellumsatz statt. Dazu gehören Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose. Dieser Umsatz wird durch eine Vielzahl von Faktoren streng reguliert. Gleichzeitig kommt es stetig zu Zellneubildungen, die von Stammzellen ausgehen. Die Geschwindigkeit der Zellerneuerung ist je nach Epithel verschieden (Lüllmann-Rauch 2006b). Interessanterweise zeigen vor allem die Oberflächenepithelien mit hoher Zellumsatzgeschwindigkeit, wie das respiratorische Epithel, das Vaginalepithel (siehe Abbildung 39) oder das Epithel im Verdauungstrakt (siehe Abbildung 20, 22, 23) eine sehr starke Expression von CKIε. Hingegen im Urothel, wo die Zellerneuerung sehr langsam abläuft, ist die

Färbung auf CKIε nur schwach. Diese Ergebnisse sprechen für eine mögliche Beteiligung von CKIε an den verschiedenen Komponenten des Zellumsatzes.
Bereits erbrachte Nachweise einer Beteiligung von CKIε an apoptotsichen Signalwegen unterstreichen diese Hinweise. So wirkt CKI bei der p75-vermittelten Apoptose als negativer Regulator (Beyaert et al. 1995). Auch bei der Fas-vermittelten Apoptose, wo neben CKIα und CKIδ vor allem CKIε beteiligt ist, kommt es durch CKI zu einer Apoptosehemmung (Desagher et al. 2001).
Als ein essentieller Regulator von Zellwachstum, Zellproliferation und Zelldifferenzierung gilt der Wnt-Signalweg (Huelsken and Birchmeier 2001; McKay et al. 2001; Peifer and Polakis 2000). Die Tatsache, dass CKIε über verschiedene Mechanismen und auf verschiedenen Ebenen den Wnt-Signalweg beeinflusst (Bryja et al. 2007; Lee et al. 2001b; Peters et al. 1999), stärkt ebenfalls die Vermutung, dass CKIε eine Rolle in den diversen Zellumsatzprozessen spielt.
Dafür spricht auch die starke Expression von CKIε in den Spermatogonien und den Spermatozyten des Hodens. In den Spermatogonien zeigt sich dabei sowohl eine Markierung auf CKIε im Zytoplasma, als auch im Kern. Die Spermatogenese wird durch das Hormon Testosteron stimuliert. Die Wirkung des Testosterons könnte eine Erklärung für dieses Expressionsmuster sein. Testosteron wird im Zytoplasma der Spermatogonien durch die 5α-Reduktase in Dihydrotestosteron umgewandelt. Dihydrotestosteron bindet an einen Rezeptor und es kommt zu einer Translokation in den Zellkern, wo es wiederum über weitere Interaktion mit verschiedenen Elementen zur Aktivierung eines Transkriptionskomplexes kommt (Keller et al. 1996). CKIε könnte somit neben den bereits genannten Proliferations- und Differenzierungsprozessen auch in dieser hormonell gesteuerten Signalkaskade eine Rolle spielen. Dabei könnte CKIε auf der Ebene der subzellulären Kompartimentierung von Bedeutung sein, was die Expression von CKIε in Kern und Zytoplasma erklären würde. Dass eine solche Funktion für CKIε möglich ist, zeigt das Beispiel des Transkriptionsfaktors NFAT1. Hier beeinflusst CKI die Regulation des Kerntransports durch Phosphorylierung der für den nukleären Import essentiellen primären Region (Okamura et al. 2004b). Außerdem kann die starke Expression in den Keimzellen des Hoden auf eine Rolle von CKIε in der meiotischen Zellteilung hinweisen. Dafür spricht auch das Expressionsmuster, das sich im Ovar zeigt, wo CKIε in den Follikeln und in den

Oozyten deutlich nachweisbar ist (siehe Abbildung 36). Es ist bereits bekannt, dass mehrere CKI-Isoformen für eine korrekte Chromosomensegregation und eine fehlerlos ablaufende Meiose von Bedeutung sind (Gross et al. 1997; Horiguchi et al. 2005; Petronczki et al. 2006). Inwieweit CKIε hier regulatorische Aufgaben übernimmt, muss noch genauer untersucht werden.

5.8 Mögliche Ursachen für Expressionsunterschiede zwischen CKIδ und CKIε

Wenn man die Ergebnisse dieser Arbeit vergleicht mit den Ergebnissen der Charakterisierung der Expression und Lokalisation von CKIδ in Organen der Maus (Lohler et al. 2009), so zeigt sich, dass sie zu einem großen Teil sehr ähnlich sind. Dies war aufgrund der großen Homologie zwischen den beiden Isoformen CKIδ und CKIε zu erwarten. Dennoch ergaben sich in einigen Organen und Zelltypen auch Expressionsunterschiede (siehe Tabelle 16). Im Bereich Binde-, Stütz- und Muskelgewebe ergaben sich die deutlichsten Unterschiede im Knochen. So gelang weder in den Osteozyten, noch in den Osteoblasten der Nachweis von CKIδ (Lohler et al. 2009), während die Expression von CKIε hier schwach, bzw. stark war. Im glatten Muskelgewebe zeigte sich für CKIε eine homogene, mäßige Expression, für CKIδ hingegen war sie inhomogen mit negativen und schwach CKIδ positiven Zellen (Lohler et al. 2009). Bei den Gefäßen ergab sich die einzige Expressionsdifferenz bei den HEV, in deren Endothel CKIδ kaum nachweisbar war (Lohler et al. 2009), CKIε jedoch relativ deutlich. In den Verdauungsorganen konnte CKIδ weder im Epithel des Ösophagus, noch in den Parietalzellen des Magens oder in den Becherzellen und Paneth-Zellen des Darmes detektiert werden (Lohler et al. 2009), wo hingegen CKIε meist eindeutig exprimiert wurde. Nur schwach auf CKIε, dafür aber größtenteils stark auf CKIδ färbten sich im Verdauungstrakt nur die Nebenzellen des Magens an. Des Weiteren ergaben sich Expressionsunterschiede zwischen CKIδ und CKIε in den Speicheldrüsen, dem exokrinen Pankreas und der Leber. So war in den Speicheldrüsen CKIε nur in den mukösen, CKIδ nur in den serösen Drüsenanteilen nachweisbar. In den Azinuszellen des exokrinen Pankreas, wo sich für CKIε ein heterogenes

Expressionsmuster mit einer schwachen CKIε-Expression zeigte, wird CKIδ durchgehend mittelgradig exprimiert und die Gallengänge der Leber, in denen eine mäßige Detektion von CKIε möglich war, sind für CKIδ negativ (Lohler et al. 2009). Bei den Harnorganen ergaben sich Expressionsdifferenzen bei den Deckzellen des Urothels, die für CKIδ negativ, für CKIε hingegen eindeutig positiv sind, und beim Epithel der Sammelrohre in der Niere, wo die spezifische Färbung für CKIε nur schwach, die für CKIδ aber mäßig bis stark ausfällt. Ebenfalls Unterschiede in zwei verschiedenen Zelltypen traten bei den weiblichen Geschlechtsorganen auf. Sowohl Oozyten, als auch die Thekazellen des Ovars, in denen jeweils ein leichter Nachweis von CKIε gelang, zeigen keine Expression von CKIδ. Im Nervensystem fällt auf, dass die Purkinje-Zellen im Kleinhirn einen mäßigen Nachweis von CKIδ erkennen lassen und die Gliazellen für CKIδ negativ sind (Lohler et al. 2009). Für CKIε stellt sich das Expressionsmuster hier gerade umgekehrt dar. Ein weiteres Organ, in dem es Abweichungen der CKIε-Expression von der CKIδ-Expression gab, ist das Auge. Im Irisstroma und in der Choroidea gelang der Nachweis einer mittelmäßigen Expression von CKIε. Eine Detektion von CKIδ ist in diesen beiden genannten Bereichen des Auges nicht gelungen. In der inneren Körnerschicht und in der Ganglienzellschicht dagegen ist die Expression von CKIδ mäßig bzw. stark (Lohler et al. 2009). Für CKIε war in der Ganglienzellschicht nur eine schwache Markierung erkennbar, die innere Körnerschicht war komplett CKIε negativ.

Die Gegenüberstellung der Expressionsmuster und das Aufzeigen der Expressionsunterschiede der beiden Isoformen CKIδ und CKIε verdeutlichen, dass trotz der großen Homologie zwischen diesen beiden Kinasen nicht davon ausgegangen werden darf, dass sie in allen Bereichen die gleiche Lokalisation und gleiche Funktionen haben. Es ist wahrscheinlich, dass gerade in den Zelltypen, in denen sich die Expressionsmuster deutlich unterscheiden, CKIδ und CKIε auch unterschiedliche Rollen übernehmen. Im Rahmen weiterer, spezifischerer Untersuchungen speziell der Zelltypen, in denen eindeutig Differenzen in der Expression der beiden Isoformen festgestellt wurden, könnten Anhaltspunkte für genauere Aussagen zu diesem Thema gewonnen werden.

5.9 Mögliche Rolle von CKIε in der Entstehung des Mammakarzinoms

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Derzeit erkranken in Deutschland etwa 57000 Frauen jährlich daran (Batzler et al. 2008).

In den immunhistochemischen Analysen des murinen Mammakarzinomgewebes konnte gezeigt werden, dass die Expression von CKIε in sämtlichen untersuchten Proben im Gewebe des invasiven Karzinoms verglichen mit dem Normalgewebe deutlich reduziert ist. Bei den invasiven Karzinomen handelt es sich um schlecht differenzierte oder undifferenzierte Karzinome. Nur bei einem Drittel der Tiere fand man auch Gewebe von nicht invasivem Karzinomgewebe. Auch in den Gewebeproben aus nicht invasiven Karzinomen ergab sich im Vergleich zum Normalgewebe in den meisten Fällen eine leichte Expressionminderung von CKIε. Zieht man die Resultate des nicht invasiven Gewebes mit in Betracht, können die Untersuchungen insgesamt darauf hinweisen, dass es möglicherweise eine Korrelation zwischen Differenzierungsgrad des Karzinoms und der Expression von CKIε gibt. Um diese Annahme zu bestätigen, müssen weitere Untersuchungen mit größerem Probenkollektiv, sowie mit einer jeweils ausreichenden Anzahl Proben von Karzinomen aller Differenzierungsgrade folgen.

Insgesamt stehen die Ergebnisse der für diese Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Analysen im Einklang mit Ergebnissen anderer, in der Literatur beschriebener Studien. So konnte in Gewebe humaner Mammakarzinome eine hohe Zahl somatischer Mutationen im CKIε-Gen nachgewiesen werden (Fuja et al. 2004). Betrachtet man diese Resultate zusammen mit der Tatsache, dass CKIε im Wnt-Signalweg regulierende Funktionen einnimmt (Aberle et al. 1997; Bryja et al. 2007; Ikeda et al. 1998; Peters et al. 1999) und auch in der Regulation apoptotischer Prozesse involviert ist, liegt die Vermutung nahe, dass Deregulationen von CKIε an der Entstehung des Mammakarzinoms beteiligt sind. Auf welchem Weg CKIε in die Karzinogenese eingreift, muss noch geklärt werden. Eine Möglichkeit könnte sein, dass es durch eine Deregulation der Expression und/ oder der Aktivität von CKIε zu Fehlern in Apoptosesignalwegen kommt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Mutationen und Deregulationen von CKIε zu Veränderungen in der Wnt-Signalkaskade führen und es auf diesem Wege zur Entwicklung eines Mammakarzinoms kommt.

Zwar zeigen die Komponenten des Wnt-Signalwegs APC, β-Catenin und Axin im Brustkrebs im Gegensatz zu kolorektalen Karzinomen keine hohen Mutationsraten (Brown 2001), Wnt-1 wurde jedoch in Mäusen als Brustonkogen identifiziert (Nusse 2005). Zudem wurde für einige Komponenten des Wnt-Signalwegs, darunter Wnt-1 und β-Catenin, sowie für die Zielgene c-myc und Cyclin D1 eine erhöhte Expression im Brustkrebs beschrieben (Lin et al. 2000; Wong et al. 2002). Somit könnten Deregulationen im Wnt-Signalweg zumindest für einige Brustkrebsfälle ursächlich sein.

Zudem besteht die Möglichkeit, dass CKIε auch die Fähigkeit zur Tumorinvasion fördert und das Metastasierungspotenzial von Mammakarzinomen beeinflusst. Für CKIγ2 konnte gezeigt werden, dass es mit dem metastatis-associated protein 1 short form (MTA1s) in Krebszellen von Mammakarzinomen interagieren und dieses auch phosphorylieren kann (Mishra et al. 2004). Deregulationen von MTA1s werden wiederum mit einem erhöhten Metastasierungspotenzial, mit erhöhtem Erkrankungsrisiko und erhöhtem Rezidivrisiko für Brustkrebs in Verbindung gebracht (Young et al. 2006). Es ist wahrscheinlich, dass CKIε ähnliche Funktionen wie CKIγ2 erfüllt. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass sämtliche CKI-Isoformen in der Lage sind, das Nonmetastatic Protein 23, Homolog 1 (nm23-H1) an Ser^{125} zu phosphorylieren. Die höchste Phosphorylierungsaktivität zeigte dabei die Isoform CKIε. Nm23-H1 ist ein Protein, das mit Mammakarzinomen in Verbindung gebracht wird und als Metastasensuppressorprotein gilt. Die Phosphorylierung des Ser^{125} scheint Voraussetzung für die Bildung eines Komplexes zwischen nm23-H1 und h-prune zu sein. Dieser Komplex führt zu einer Mobilitätssteigerung der Tumorzellen und somit zu einem höheren Metastasierungspotential im Mammakarzinom (Garzia et al. 2008). Weitere Untersuchungen müssen folgen, um die genauen und möglichen weiteren Funktionen von CKI auf diesem Gebiet zu klären.

5.10 Mögliche Rolle von CKIε in der kolorektalen Karzinogenese

Deregulationen der Expression von CKIε werden mit verschiedenen Karzinomen, wie Mammakarzinom (Fuja et al. 2004) oder Pankreaskarzinom (Brockschmidt et al. 2008) in Verbindung gebracht. Es konnte auch bereits gezeigt werden, dass es in hyperproliferierendem Kolonepithel zu einer erhöhten Expression und Aktivität von CKIε kommt (Umar et al. 2006). Das zeigt, dass Expressionsveränderungen von CKIε zur Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten beitragen können.

Die immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit ergaben Expressionsunterschiede von CKIε im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Bei 8 der insgesamt 30 Patienten wurde eine leicht verminderte Expression von CKIε festgestellt, bei 7 zeigt sich eine leichte Erhöhung der CKIε-Expression. Bei den übrigen 15 Patienten konnte keine Veränderung der Expression von CKIε nachgewiesen werden. Diese Veränderungen der CKIε-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe deuten darauf hin, dass eine Deregulation der Expression von CKIε die kolorektale Karzinogenese beeinflussen kann. Dass diese Veränderungen nicht einheitlich sind, kann darauf zurückzuführen sein, dass das kolorektale Karzinom durch Deregulationen in einer Vielzahl verschiedener Signaltransduktionswege entstehen kann, an denen CKIε nur zum Teil beteiligt ist.

In kolorektalen Karzinomen findet man häufig Deregulationen im Wnt-Signalweg oder auch im p53-Signalweg. Da CKIε sowohl mit p53 interagieren kann (Dumaz et al. 1999; Knippschild et al. 1997), als auch im Wnt-Signalweg über verschiedene Mechanismen involviert ist (Bryja et al. 2007; Lee et al. 2001b; Umar et al. 2006), wären dies mögliche Wege, über die CKIε auf die kolorektale Karzinogenese Einfluss nehmen kann.

Im untersuchten Patientenkollektiv sind von Tumorstadium G1 bis G3-4 alle Stadien vertreten, jedoch nicht in jeweils gleicher Anzahl. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen lassen keine Korrelation von Expressionsänderung von CKIε und Tumorstadium erkennen.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Veränderung der Expression von CKIε und dem Tumorstadium beweisen und eventuell Aussagen zum Krankheitsverlauf treffen zu können, müssen weitere Untersuchungen mit einem

größeren Patientenkollektiv folgen, in dem die verschiedenen Tumorstadien in ähnlicher und ausreichend großer Anzahl vertreten sind.
Auch Untersuchungen der Aktivität von CKIε in kolorektalen Karzinomen, sowie Analysen auf Protein- und RNA-Ebene könnten zu weiteren Hinweisen zur Bedeutung von CKIε in der kolorektalen Karzinogenese führen.

5.11 Zusammenfassende Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Überblick über die spezifische Expression und Lokalisation von CKIε in verschiedenen Organen und Geweben unter physiologischen Bedingungen. Dies erbringt Nachweise für eine nähere Charakterisierung möglicher spezifischer Funktionen von CKIε *in vivo* und stellt die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Rolle von CKIε in diesen Geweben.
Die Analysen der Expression von CKIε in Tumorgewebe liefern ebenfalls neue Anhaltspunkte für eine Involvierung und mögliche Rolle von CKIε in der Krankheitsentstehung und stellen die Basis für weiterführende Untersuchungen von CKIε in diesem Bereich dar.

6. Zusammenfassung

Die Casein Kinase Iε (CKIε) gehört zur ubiquitär exprimierten Serin/Threonin-spezifischen Casein Kinase I (CKI)-Familie, deren Mitglieder an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt sind. Deren Deregulation wurde auch mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht.

Ziel dieser Arbeit war es, zunächst die Expression und Lokalisation von CKIε in verschiedenen Organen und Geweben junger adulter BALB/c Mäuse zu charakterisieren, um Rückschlüsse auf mögliche physiologische Funktionen von CKIε ziehen zu können.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war der Nachweis von Veränderungen der Expression von CKIε in Tumoren, um dadurch mögliche neue Hinweise auf den Einfluss von CKIε in der Tumorentstehung und Tumorprogression zu bekommen.

Die durchgeführten Western Blot-Analysen zeigten, dass CKIε in allen untersuchten Organen junger adulter BALB/c Mäuse exprimiert wird, ihr Expressionslevel sich jedoch in den verschiedenen Organen unterscheidet. Die darauf folgenden immunhistochemischen Analysen erlaubten eine genaue Charakterisierung der unterschiedlichen Expression und Lokalisation von CKIε unter physiologischen Bedingungen in den verschiedenen Organen und Geweben der Maus. CKIε wurde in Binde-, Stütz- und Muskelgewebe ebenso nachgewiesen, wie in Gewebe der Kreislauforgane, der lymphatischen Organe, der Atmungsorgane, des Verdauungstrakts, in exokrinen und endokrinen Drüsenorganen, im Urogenitaltrakt, in Gewebe von Teilen des Nervensystems und im Auge.

Die stark positive Markierung auf CKIε in Epithelien mit hohem Zellumsatz, wie im Verdauungstrakt, im Hoden oder in den Atmungsorganen sprechen für eine Beteiligung von CKIε in Zellproliferations- und Differenzierungsprozessen. Der Nachweis von CKIε in exokrinen und endokrinen Drüsenzellen liefert Hinweise auf eine Rolle von CKIε in der Proteinbiosynthese, in intrazellulären Transportvorgängen und in Sekretionsmechanismen. Das Expressionsmuster in den untersuchten Teilen des Nervensystems deutet darauf hin, dass CKIε im neuronalen Informationsaustausch unter anderem in die Neurotransmittersynthese oder die Transmitterausschüttung involviert sein könnte. Auch für eine Beteiligung

von CKIε an der Regulation der zirkadianen Rhythmik liefern die Untersuchungsergebnisse Hinweise.

Um mögliche Expressionsveränderungen von CKIε in Tumoren nachweisen zu können, wurden ebenfalls immunhistochemische Analysen durchgeführt. Zur Untersuchung der CKIε-Expression im Mammakarzinom wurden Gewebeproben aus Normal- und Tumorgewebe von SV40 T-Ag (großes Tumorantigen von Simian Virus 40) transgenen Mäusen des Stammes NP8 herangezogen. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CKIε in allen untersuchten invasiven Mammakarzinomen reduziert ist.

Die CKIε-Expression in kolorektalen Karzinomen wurde anhand von Gewebeproben von Normal- und Tumorgewebe aus Patienten analysiert. Hier zeigte sich, dass es sowohl Tumore mit unveränderter Expression gab, als auch Tumore mit erhöhter oder reduzierter Expression von CKIε.

Zusammenfassend geben unsere Daten einen Überblick über die zelltyp-spezifische Expression von CKIε in verschiedenen Organen unter physiologischen Bedingungen. Dies liefert Anhaltspunkte für mögliche zelltyp-spezifische Funktionen von CKIε und stellt die Grundlage für zukünftige Untersuchungen von CKIε in diesen Geweben dar.

Die immunhistochemischen Untersuchungen im Tumorgewebe erbrachten den Nachweis, dass es in den untersuchten Tumoren zu Veränderungen der Expression von CKIε kommt. Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass Deregulationen von CKIε zur Tumorentstehung beitragen können. Sie sind eine wichtige Basis für weitere Analysen von CKIε in Tumoren und identifizieren CKIε als mögliches Zielgen in der Entwicklung neuer Medikamente.

7. Literaturverzeichnis

1 Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A and Kemler R: beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. EMBO J 16: 3797-3804 (1997)

2 Agostinis P, Pinna L A, Meggio F, Marin O, Goris J, Vandenheede J R and Merlevede W: A synthetic peptide substrate specific for casein kinase I. FEBS Lett 259: 75-78 (1989)

3 Alappat E C, Volkland J and Peter M E: Cell cycle effects by C-FADD depend on its C-terminal phosphorylation site. J Biol Chem 278: 41585-41588 (2003)

4 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, Winoto A, Tang W J and Peter M E: Phosphorylation of FADD at serine 194 by CKIalpha regulates its nonapoptotic activities. Mol Cell 19: 321-332 (2005)

5 Albornoz A, Yanez J M, Foerster C, Aguirre C, Pereiro L, Burzio V, Moraga M, Reyes A E and Antonelli M: The CK1 gene family: expression patterning in zebrafish development. Biol Res 40: 251-266 (2007)

6 Alsheich-Bartok O, Haupt S, Alkalay-Snir I, Saito S, Appella E and Haupt Y: PML enhances the regulation of p53 by CK1 in response to DNA damage. Oncogene 27: 3653-3661 (2008)

7 Batzler W U, Giersiepen K, Hentschel S, Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Kieschke J, Kraywinkel K, Meyer M, Stabenow R and Stegmaier C. Krebs in Deutschland 2003 – 2004 Häufigkeiten und Trends. R. Koch-Institut. Berlin, Lübeck, Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: 54-57 (2008)

8 Behrend L, Stoter M, Kurth M, Rutter G, Heukeshoven J, Deppert W and Knippschild U: Interaction of casein kinase 1 delta (CK1delta) with post-Golgi structures, microtubules and the spindle apparatus. Eur J Cell Biol 79: 240-251 (2000)

9 Behrens J, von Kries J P, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R and Birchmeier W: Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature 382: 638-642 (1996)

10 Beyaert R, Vanhaesebroeck B, Declercq W, Van Lint J, Vandenabele P, Agostinis P, Vandenheede J R and Fiers W: Casein kinase-1 phosphorylates the p75 tumor necrosis factor receptor and negatively regulates tumor necrosis factor signaling for apoptosis. J Biol Chem 270: 23293-23299 (1995)

11 Boutros M and Mlodzik M: Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. Mech Dev 83: 27-37 (1999)

12 Brockschmidt C, Hirner H, Huber N, Eismann T, Hillenbrand A, Giamas G, Radunsky B, Ammerpohl O, Bohm B, Henne-Bruns D, Kalthoff H, Leithauser F, Trauzold A and Knippschild U: Anti-apoptotic and growth-stimulatory functions of CK1 delta and epsilon in ductal adenocarcinoma of the pancreas are inhibited by IC261 in vitro and in vivo. Gut 57: 799-806 (2008)

13 Brown A M: Wnt signaling in breast cancer: have we come full circle? Breast Cancer Res 3: 351-355 (2001)

14 Brown R W and Chirala R: Utility of microwave-citrate antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. Mod Pathol 8: 515-520 (1995)

15 Brunati A M, Marin O, Bisinella A, Salviati A and Pinna L A: Novel consensus sequence for the Golgi apparatus casein kinase, revealed using proline-rich protein-1 (PRP1)-derived peptide substrates. Biochem J 351 Pt 3: 765-768 (2000)

16 Bryja V, Schulte G, Rawal N, Grahn A and Arenas E: Wnt-5a induces Dishevelled phosphorylation and dopaminergic differentiation via a CK1-dependent mechanism. J Cell Sci 120: 586-595 (2007)

17 Budini M, Jacob G, Jedlicki A, Perez C, Allende C C and Allende J E: Autophosphorylation of carboxy-terminal residues inhibits the activity of protein kinase CK1alpha. J Cell Biochem 106: 399-408 (2008)

18 Bustos V H, Ferrarese A, Venerando A, Marin O, Allende J E and Pinna L A: The first armadillo repeat is involved in the recognition and regulation of beta-catenin phosphorylation by protein kinase CK1. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 19725-19730 (2006)

19 Carmel G, Leichus B, Cheng X, Patterson S D, Mirza U, Chait B T and Kuret J: Expression, purification, crystallization, and preliminary x-ray

analysis of casein kinase-1 from Schizosaccharomyces pombe. J Biol Chem 269: 7304-7309 (1994)

20 Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker M H, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabattini E, Feudale E and et al.: Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. J Pathol 171: 83-98 (1993)

21 Cegielska A, Gietzen K F, Rivers A and Virshup D M: Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis. J Biol Chem 273: 1357-1364 (1998)

22 Chen L and Deng C X: Roles of FGF signaling in skeletal development and human genetic diseases. Front Biosci 10: 1961-1976 (2005)

23 Chergui K, Svenningsson P and Greengard P: Physiological role for casein kinase 1 in glutamatergic synaptic transmission. J Neurosci 25: 6601-6609 (2005)

24 Clevers H: Wnt breakers in colon cancer. Cancer Cell 5: 5-6 (2004)

25 Cobb M H and Rosen O M: 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: 12472-12481 (1983)

26 Cohen P: The origins of protein phosphorylation. Nat Cell Biol 4: E127-130 (2002)

27 Conti C J, Gimenez-Conti I B, Benavides F, Frijhoff A F W and Conti M A. "Atlas of Laboratory Mouse Histology." from http://www.ctrgenpath.org/static/atlas/mousehistology/. (2004, September 2008).

28 Craig A, Jones J R F, Kenneth J A, Curt D and Kenneth W G: The Regulation of Renal and Extrarenal Renin Gene Expression in the Mouse In: CRC Press (Hrsg) Cellular and Molecular Biology of the Renin-angiotensin System, 33-58 (1993)

29 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: Microwave antigen retrieval in immunocytochemistry: a study of 80 antibodies. J Clin Pathol 47: 448-452 (1994)

30 Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stannek P, Glinka A and Niehrs C: Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. Nature 438: 867-872 (2005)

31 de Waegh S M, Lee V M and Brady S T: Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. Cell 68: 451-463 (1992)

32 DeMaggio A J, Lindberg R A, Hunter T and Hoekstra M F: The budding yeast HRR25 gene product is a casein kinase I isoform. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 7008-7012 (1992)

33 Deppert W and Pates R: Cell surface location of simian virus 40-specific proteins on HeLa cells infected with adenovirus type 2-simian virus 40 hybrid viruses Ad2+ND1 and Ad2+ND2. J Virol 31: 522-536 (1979)

34 Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, Magnenat E, Vilbois F, Hochmann A, Journot L, Antonsson B and Martinou J C: Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. Mol Cell 8: 601-611 (2001)

35 Desdouits F, Cohen D, Nairn A C, Greengard P and Girault J A: Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase I in vitro and in vivo. J Biol Chem 270: 8772-8778 (1995)

36 Dhillon N and Hoekstra M F: Characterization of two protein kinases from Schizosaccharomyces pombe involved in the regulation of DNA repair. Embo J 13: 2777-2788 (1994)

37 Divisi D, Di Tommaso S, Salvemini S, Garramone M and Crisci R: Diet and cancer. Acta Biomed 77: 118-123 (2006)

38 Dubois T, Kerai P, Learmonth M, Cronshaw A and Aitken A: Identification of syntaxin-1A sites of phosphorylation by casein kinase I and casein kinase II. Eur J Biochem 269: 909-914 (2002)

39 Dumaz N, Milne D M and Meek D W: Protein kinase CK1 is a p53-threonine 18 kinase which requires prior phosphorylation of serine 15. FEBS Lett 463: 312-316 (1999)

40 Ebisawa T: Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: human sleep disorders and clock genes. J Pharmacol Sci 103: 150-154 (2007)

41 Elias L, Li A P and Longmire J: Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent and -independent protein kinase in acute myeloblastic leukemia. Cancer Res 41: 2182-2188 (1981)

42 Emoto K, Yamashita S and Okada Y: Mechanisms of heat-induced antigen retrieval: does pH or ionic strength of the solution play a role for refolding antigens? J Histochem Cytochem 53: 1311-1321 (2005)

43 Fish K J, Cegielska A, Getman M E, Landes G M and Virshup D M: Isolation and characterization of human casein kinase I epsilon (CKI), a novel member of the CKI gene family. J Biol Chem 270: 14875-14883 (1995)

44 Flajolet M, He G, Heiman M, Lin A, Nairn A C and Greengard P: Regulation of Alzheimer's disease amyloid-beta formation by casein kinase I. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 4159-4164 (2007)

45 Flotow H and Roach P J: Synergistic phosphorylation of rabbit muscle glycogen synthase by cyclic AMP-dependent protein kinase and casein kinase I. Implications for hormonal regulation of glycogen synthase. J Biol Chem 264: 9126-9128 (1989)

46 Flotow H, Graves P R, Wang A Q, Fiol C J, Roeske R W and Roach P J: Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action. J Biol Chem 265: 14264-14269 (1990)

47 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: Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. Am J Pathol 161: 1315-1323 (2002)

48 Fuja T J, Lin F, Osann K E and Bryant P J: Somatic mutations and altered expression of the candidate tumor suppressors CSNK1 epsilon, DLG1, and EDD/hHYD in mammary ductal carcinoma. Cancer Res 64: 942-951 (2004)

49 Garzia L, D'Angelo A, Amoresano A, Knauer S K, Cirulli C, Campanella C, Stauber R H, Steegborn C, Iolascon A and Zollo M: Phosphorylation of

nm23-H1 by CKI induces its complex formation with h-prune and promotes cell motility. Oncogene 27: 1853-1864 (2008)

50 Gietzen K F and Virshup D M: Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase I epsilon. J Biol Chem 274: 32063-32070 (1999)

51 Graves P R, Haas D W, Hagedorn C H, DePaoli-Roach A A and Roach P J: Molecular cloning, expression, and characterization of a 49-kilodalton casein kinase I isoform from rat testis. J Biol Chem 268: 6394-6401 (1993)

52 Graves P R and Roach P J: Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta. J Biol Chem 270: 21689-21694 (1995)

53 Green C L and Bennett G S: Identification of four alternatively spliced isoforms of chicken casein kinase I alpha that are all expressed in diverse cell types. Gene 216: 189-195 (1998)

54 Gross S D, Hoffman D P, Fisette P L, Baas P and Anderson R A: 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: 711-724 (1995)

55 Gross S D, Simerly C, Schatten G and Anderson R A: A casein kinase I isoform is required for proper cell cycle progression in the fertilized mouse oocyte. J Cell Sci 110 (Pt 24): 3083-3090 (1997)

56 Gross S D and Anderson R A: Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. Cell Signal 10: 699-711 (1998)

57 Grozav A G, Chikamori K, Kozuki T, Grabowski D R, Bukowski R M, Willard B, Kinter M, Andersen A H, Ganapathi R and Ganapathi M K: Casein kinase I {delta}/{varepsilon} phosphorylates topoisomerase II{alpha} at serine-1106 and modulates DNA cleavage activity. Nucleic Acids Res (2008)

58 Herold G: Gastroenterologie. In: Herausgeber (Hrsg) Innere Medizin, 369-498 (2006)

59 Ho Y, Mason S, Kobayashi R, Hoekstra M and Andrews B: 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: 581-586 (1997)

60 Hoekstra M F, DeMaggio A J and Dhillon N: Genetically identified protein kinases in yeast. II: DNA metabolism and meiosis. Trends Genet 7: 293-297 (1991)

61 Hoekstra M F, Dhillon N, Carmel G, DeMaggio A J, Lindberg R A, Hunter T and Kuret J: Budding and fission yeast casein kinase I isoforms have dual-specificity protein kinase activity. Mol Biol Cell 5: 877-886 (1994)

62 Horiguchi R, Yoshikuni M, Tokumoto M, Nagahama Y and Tokumoto T: Identification of a protein kinase which phosphorylates a subunit of the 26S proteasome and changes in its activity during meiotic cell cycle in goldfish oocytes. Cell Signal 17: 205-215 (2005)

63 Huelsken J and Birchmeier W: New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. Curr Opin Genet Dev 11: 547-553 (2001)

64 Hunter T: Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. Cell 80: 225-236 (1995)

65 Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S and Kikuchi A: 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: 1371-1384 (1998)

66 Ilyas M: Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. J Pathol 205: 130-144 (2005)

67 Izeradjene K, Douglas L, Delaney A B and Houghton J A: Casein kinase I attenuates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by regulating the recruitment of fas-associated death domain and procaspase-8 to the death-inducing signaling complex. Cancer Res 64: 8036-8044 (2004)

68 Kawakami F, Suzuki K and Ohtsuki K: A novel consensus phosphorylation motif in sulfatide- and cholesterol-3-sulfate-binding protein substrates for CK1 in vitro. Biol Pharm Bull 31: 193-200 (2008)

69 Kearney P H, Ebert M and Kuret J: Molecular cloning and sequence analysis of two novel fission yeast casein kinase-1 isoforms. Biochem Biophys Res Commun 203: 231-236 (1994)

70 Keller E T, Ershler W B and Chang C: The androgen receptor: a mediator of diverse responses. Front Biosci 1: d59-71 (1996)

71 Kim S H, Kook M C, Shin Y K, Park S H and Song H G: Evaluation of antigen retrieval buffer systems. J Mol Histol 35: 409-416 (2004)

72 Kimelman D and Xu W: beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. Oncogene 25: 7482-7491 (2006)

73 Knippschild U, Milne D M, Campbell L E, DeMaggio A J, Christenson E, Hoekstra M F and Meek D W: 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: 1727-1736 (1997)

74 Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Lohler J and Stoter M: The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. Cell Signal 17: 675-689 (2005)

75 Lee C, Etchegaray J P, Cagampang F R, Loudon A S and Reppert S M: Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. Cell 107: 855-867 (2001a)

76 Lee E, Salic A and Kirschner M W: Physiological regulation of [beta]-catenin stability by Tcf3 and CK1epsilon. J Cell Biol 154: 983-993 (2001b)

77 Lester S C: The Breast. In: Saunders (Hrsg) Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease, 7. Auflage, 1119-1154 (2004)

78 Lin R C and Scheller R H: Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. Annu Rev Cell Dev Biol 16: 19-49 (2000)

79 Lin S Y, Xia W, Wang J C, Kwong K Y, Spohn B, Wen Y, Pestell R G and Hung M C: 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: 4262-4266 (2000)

80 Liu C and Crawford J M: The Gastrointestinal Tract. In: Saunders (Hrsg) Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease, 7. Auflage, 797-875 (2004)

81 Lohler J, Hirner H, Schmidt B, Kramer K, Fischer D, Thal D R, Leithauser F and Knippschild U: Immunohistochemical characterisation of cell-type

specific expression of CK1delta in various tissues of young adult BALB/c mice. PLoS ONE 4: e4174 (2009)

82 Longenecker K L, Roach P J and Hurley T D: Three-dimensional structure of mammalian casein kinase I: molecular basis for phosphate recognition. J Mol Biol 257: 618-631 (1996)

83 Longenecker K L, Roach P J and Hurley T D: Crystallographic studies of casein kinase I delta toward a structural understanding of auto-inhibition. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 54 (Pt 3): 473-475 (1998)

84 Lowrey P L, Shimomura K, Antoch M P, Yamazaki S, Zemenides P D, Ralph M R, Menaker M and Takahashi J S: Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. Science 288: 483-492 (2000)

85 Lüllmann-Rauch R: Mikroskopische Anatomie. In: Thieme (Hrsg) Histologie, 2. Auflage, 237-592 (2006a)

86 Lüllmann-Rauch R: Allgemeine Histologie. In: Thieme (Hrsg) Histologie, 93-235 (2006b)

87 Manning G, Whyte D B, Martinez R, Hunter T and Sudarsanam S: The protein kinase complement of the human genome. Science 298: 1912-1934 (2002)

88 Marchal C, Dupre S and Urban-Grimal D: Casein kinase I controls a late step in the endocytic trafficking of yeast uracil permease. J Cell Sci 115: 217-226 (2002)

89 Marin O, Meggio F and Pinna L A: Design and synthesis of two new peptide substrates for the specific and sensitive monitoring of casein kinases-1 and -2. Biochem Biophys Res Commun 198: 898-905 (1994)

90 Marin O, Bustos V H, Cesaro L, Meggio F, Pagano M A, Antonelli M, Allende C C, Pinna L A and Allende J E: 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: 10193-10200 (2003)

91 Marine J C, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F and Lozano G: Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. Cell Death Differ 13: 927-934 (2006)

92 Masuda K, Ono M, Okamoto M, Morikawa W, Otsubo M, Migita T, Tsuneyoshi M, Okuda H, Shuin T, Naito S and Kuwano M: Downregulation of Cap43 gene by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein in human renal cancer cells. Int J Cancer 105: 803-810 (2003)

93 McKay R M, Peters J M and Graff J M: The casein kinase I family: roles in morphogenesis. Dev Biol 235: 378-387 (2001)

94 Milne D M, Looby P and Meek D W: Catalytic activity of protein kinase CK1 delta (casein kinase 1delta) is essential for its normal subcellular localization. Exp Cell Res 263: 43-54 (2001)

95 Mishra S K, Yang Z, Mazumdar A, Talukder A H, Larose L and Kumar R: Metastatic tumor antigen 1 short form (MTA1s) associates with casein kinase I-gamma2, an estrogen-responsive kinase. Oncogene 23: 4422-4429 (2004)

96 Miyazaki T, Hashimoto S, Masubuchi S, Honma S and Honma K I: Phase-advance shifts of human circadian pacemaker are accelerated by daytime physical exercise. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 281: R197-205 (2001)

97 Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O and Clevers H: XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos. Cell 86: 391-399 (1996)

98 Morgan J M, Navabi H, Schmid K W and Jasani B: Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate-mediated high-temperature antigen retrieval. J Pathol 174: 301-307 (1994)

99 Murakami A, Kimura K and Nakano A: 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: 3804-3810 (1999)

100 Nusse R: Cell biology: relays at the membrane. Nature 438: 747-749 (2005)

101 Okamura A, Iwata N, Nagata A, Tamekane A, Shimoyama M, Gomyo H, Yakushijin K, Urahama N, Hamaguchi M, Fukui C, Chihara K, Ito M and Matsui T: Involvement of casein kinase Iepsilon in cytokine-induced granulocytic differentiation. Blood 103: 2997-3004 (2004a)

102 Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Martinson H, Qin J, Virshup D M and Rao A: A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. Mol Cell Biol 24: 4184-4195 (2004b)

103 Panek H R, Stepp J D, Engle H M, Marks K M, Tan P K, Lemmon S K and Robinson L C: Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. Embo J 16: 4194-4204 (1997)

104 Partch C L, Shields K F, Thompson C L, Selby C P and Sancar A: Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 10467-10472 (2006)

105 Peifer M and Polakis P: Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. Science 287: 1606-1609 (2000)

106 Peters J M, McKay R M, McKay J P and Graff J M: Casein kinase I transduces Wnt signals. Nature 401: 345-350 (1999)

107 Petronczki M, Matos J, Mori S, Gregan J, Bogdanova A, Schwickart M, Mechtler K, Shirahige K, Zachariae W and Nasmyth K: Monopolar attachment of sister kinetochores at meiosis I requires casein kinase 1. Cell 126: 1049-1064 (2006)

108 Pileri S A, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Briskomatis A, Sabattini E, Ascani S, Santini D, Piccaluga P P, Leone O, Damiani S, Ercolessi C, Sandri F, Pieri F, Leoncini L and Falini B: Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. J Pathol 183: 116-123 (1997)

109 Pyle R A, Schivell A E, Hidaka H and Bajjalieh S M: Phosphorylation of synaptic vesicle protein 2 modulates binding to synaptotagmin. J Biol Chem 275: 17195-17200 (2000)

110 Regierer A C and Possinger K: Vorgehen beim nicht invasiven Karzinom. In: Deutscher Ärzte-Verlag (Hrsg) Das Mammakarzinom, Erste Auflage, 37-40 (2005)

111 Rivers A, Gietzen K F, Vielhaber E and Virshup D M: Regulation of casein kinase I epsilon and casein kinase I delta by an in vivo futile phosphorylation cycle. J Biol Chem 273: 15980-15984 (1998)

112 Roach P J and Wang Y H: Identification of phosphorylation sites in peptides using a microsequencer. Methods Enzymol 201: 200-206 (1991)

113 Robinson L C, Hubbard E J, Graves P R, DePaoli-Roach A A, Roach P J, Kung C, Haas D W, Hagedorn C H, Goebl M, Culbertson M R and et al.: Yeast casein kinase I homologues: an essential gene pair. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 28-32 (1992)

114 Robinson L C, Menold M M, Garrett S and Culbertson M R: Casein kinase I-like protein kinases encoded by YCK1 and YCK2 are required for yeast morphogenesis. Mol Cell Biol 13: 2870-2881 (1993)

115 Rowles J, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J and Cobb M H: Purification of casein kinase I and isolation of cDNAs encoding multiple casein kinase I-like enzymes. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 9548-9552 (1991)

116 Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S and Bhoola K: Colon cancer: genomics and apoptotic events. Biol Chem 385: 449-464 (2004)

117 Santos J A, Logarinho E, Tapia C, Allende C C, Allende J E and Sunkel C E: The casein kinase 1 alpha gene of Drosophila melanogaster is developmentally regulated and the kinase activity of the protein induced by DNA damage. J Cell Sci 109 (Pt 7): 1847-1856 (1996)

118 Schulze-Garg C, Lohler J, Gocht A and Deppert W: A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland. Oncogene 19: 1028-1037 (2000)

119 Shi S R, Key M E and Kalra K L: 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: 741-748 (1991)

120 Shi S R, Cote R J and Taylor C R: Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. J Histochem Cytochem 45: 327-343 (1997)

121 Sillibourne J E, Milne D M, Takahashi M, Ono Y and Meek D W: Centrosomal anchoring of the protein kinase CK1delta mediated by attachment to the large, coiled-coil scaffolding protein CG-NAP/AKAP450. J Mol Biol 322: 785-797 (2002)

122 Simkowski K W and Tao M: Studies on a soluble human erythrocyte protein kinase. J Biol Chem 255: 6456-6461 (1980)

123 Stoter M, Bamberger A M, Aslan B, Kurth M, Speidel D, Loning T, Frank H G, Kaufmann P, Lohler J, Henne-Bruns D, Deppert W and Knippschild U: Inhibition of casein kinase I delta alters mitotic spindle formation and induces apoptosis in trophoblast cells. Oncogene 24: 7964-7975 (2005)

124 Takano A, Hoe H S, Isojima Y and Nagai K: Analysis of the expression, localization and activity of rat casein kinase 1epsilon-3. Neuroreport 15: 1461-1464 (2004)

125 Tapia C, Featherstone T, Gomez C, Taillon-Miller P, Allende C C and Allende J E: Cloning and chromosomal localization of the gene coding for human protein kinase CK1. FEBS Lett 349: 307-312 (1994)

126 True L D: Quality control in molecular immunohistochemistry. Histochem Cell Biol 130: 473-480 (2008)

127 Tsai I C, Woolf M, Neklason D W, Branford W W, Yost H J, Burt R W and Virshup D M: Disease-associated casein kinase I delta mutation may promote adenomatous polyps formation via a Wnt/beta-catenin independent mechanism. Int J Cancer 120: 1005-1012 (2007)

128 Tuazon P T and Traugh J A: Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 23: 123-164 (1991)

129 Umar S, Wang Y, Morris A P and Sellin J H: Dual alterations in casein kinase 1{epsilon} and GSK-3{beta} modulate {beta}-catenin stability in hyperproliferating colonic epithelia. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol (2006)

130 Vancura A, Sessler A, Leichus B and Kuret J: A prenylation motif is required for plasma membrane localization and biochemical function of casein kinase I in budding yeast. J Biol Chem 269: 19271-19278 (1994)

131 Vielhaber E, Eide E, Rivers A, Gao Z H and Virshup D M: Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. Mol Cell Biol 20: 4888-4899 (2000)

132 Vogelstein B, Fearon E R, Hamilton S R, Kern S E, Preisinger A C, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits A M and Bos J L: Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med 319: 525-532 (1988)

133 Wang P C, Vancura A, Mitcheson T G and Kuret J: Two genes in Saccharomyces cerevisiae encode a membrane-bound form of casein kinase-1. Mol Biol Cell 3: 275-286 (1992)

134 Wang X, Hoekstra M F, DeMaggio A J, Dhillon N, Vancura A, Kuret J, Johnston G C and Singer R A: 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: 5375-5385 (1996)

135 Wang Y, Sun X, Wu J, Xu B E, Gu C, Wang H, Wang X, Tan F, Peng X, Qiang B, Yuan J and Luo Y: Casein kinase 1alpha interacts with RIP1 and regulates NF-kappaB activation. Biochemistry 47: 441-448 (2008)

136 Wei E K, Giovannucci E, Wu K, Rosner B, Fuchs C S, Willett W C and Colditz G A: Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. Int J Cancer 108: 433-442 (2004)

137 Welsch U: Geschlechtsorgane. In: Urban & Fischer in Elsevier (Hrsg) Sobotta Lehrbuch Histologie, 2. Auflage, 473-535 (2006a)

138 Welsch U: Gewebe. In: Urban & Fischer in Elsevier (Hrsg) Sobotta Lehrbuch Histologie, 2. Auflage, 86-206 (2006b)

139 Welsch U: Endokrine Organe. In: Urban & Fischer in Elsevier (Hrsg) Sobotta Lehrbuch Histologie, 2. Auflage, 407-448 (2006c)

140 Welsch U: Harnorgane. In: Urban & Fischer in Elsevier (Hrsg) Sobotta Lehrbuch Histologie, 2. Auflage, 449-472 (2006d)

141 Welsch U: Zentralnervensystem, Spinalganglien. In: Urban & Fischer in Elsevier (Hrsg) Sobotta Lehrbuch Histologie, 2. Auflage, 676 (2006e)

142 Williams J H, Mepham B L and Wright D H: Tissue preparation for immunocytochemistry. J Clin Pathol 50: 422-428 (1997)

143 Winter M, Milne D, Dias S, Kulikov R, Knippschild U, Blattner C and Meek D: Protein kinase CK1delta phosphorylates key sites in the acidic domain of murine double-minute clone 2 protein (MDM2) that regulate p53 turnover. Biochemistry 43: 16356-16364 (2004)

144 Wolff S, Xiao Z, Wittau M, Sussner N, Stoter M and Knippschild U: 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 (2005)

145 Wolff S, Stoter M, Giamas G, Piesche M, Henne-Bruns D, Banting G and Knippschild U: Casein kinase 1 delta (CK1delta) interacts with the SNARE associated protein snapin. FEBS Lett 580: 6477-6484 (2006)

146 Wong S C, Lo S F, Lee K C, Yam J W, Chan J K and Wendy Hsiao W L: Expression of frizzled-related protein and Wnt-signalling molecules in invasive human breast tumours. J Pathol 196: 145-153 (2002)

147 Xu S, Wong C C, Tong E H, Chung S S, Yates J R, 3rd, Yin Y and Ko B C: Phosphorylation by casein kinase 1 regulates tonicity-induced osmotic response element-binding protein/tonicity enhancer-binding protein nucleocytoplasmic trafficking. J Biol Chem 283: 17624-17634 (2008)

148 Yin H, Laguna K A, Li G and Kuret J: Dysbindin structural homologue CK1BP is an isoform-selective binding partner of human casein kinase-1. Biochemistry 45: 5297-5308 (2006)

149 Young K-C, Huang C-T, Lin S-L and Hsiao W-C: Two-Phased Alteration and Clinical Relevance of MTA1 and MTA1s Gene Expression: A Quantitative PCR Analysis in Breast Cancer Patients. Journal of Cancer Molecules 2: 79-84 (2006)

150 Yu S and Roth M G: Casein kinase I regulates membrane binding by ARF GAP1. Mol Biol Cell 13: 2559-2570 (2002)

151 Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J and He X: A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. Nature 438: 873-877 (2005)

152 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: 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: 12717-12724 (1995)

153 Zhang J, Gross S D, Schroeder M D and Anderson R A: Casein kinase I alpha and alpha L: alternative splicing-generated kinases exhibit different catalytic properties. Biochemistry 35: 16319-16327 (1996)

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung **1**:	Das humane Kinom (aus: (Manning et al. 2002)).	2
Abbildung **2**:	Schematische Darstellung der Casein Kinase I (CKI)-Isoformen der Säuger.	4
Abbildung **3**:	Kanonische Konsensussequenz für Casein Kinase I (CKI).	5
Abbildung **4**:	Schematische Darstellung der Entwicklung zum duktalen Carcinoma in Situ (DCIS) und zum infiltrierenden Karzinom (Abbildung von (Regierer and Possinger 2005)).	15
Abbildung **5**:	Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz (Abbildung nach (Herold 2006)).	17
Abbildung **6**:	Detektion von Casein Kinase Iε (CKIε) und β-Aktin in Proteinlysaten diverser Organe einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.	42
Abbildung **7**:	Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in Gefrierschnitten (A) und in Paraffinschnitten (B).	45
Abbildung **8**:	Vergleich der beiden Casein Kinase Iε (CKIε) spezifischen Antikörper 712 (A) und sc-25423 (B).	47
Abbildung **9**:	Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Knorpel einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	51
Abbildung **10**:	Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Knochen einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	51
Abbildung **11**:	Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Fettgewebe einer 5 Wochen alten BALB/c Maus.	52
Abbildung **12**:	Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Muskelgewebe einer 4 Wochen alten BALB/c Maus.	54
Abbildung **13**:	Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Gefäßendothel einer 6 Wochen alten BALB/c Maus.	55
Abbildung **14**:	Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Knochenmark einer 5 Wochen alten BALB/c Maus.	57

Abbildung **15**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Thymus einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 58
Abbildung **16**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Milz einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. 59
Abbildung **17**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 60
Abbildung **18**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Lymphknoten einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 60
Abbildung **19**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Lunge einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. 62
Abbildung **20**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Ösophagus einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. 64
Abbildung **21**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Magen einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. 65
Abbildung **22**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Dünndarm einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. 66
Abbildung **23**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Kolon einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 66
Abbildung **24**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in einer Speicheldrüse einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. 68
Abbildung **25**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Leber einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. 69
Abbildung **26**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Pankreas einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 71
Abbildung **27**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Nebenniere einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 72
Abbildung **28**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Hypophyse einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 74

Abbildung **29**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Schilddrüse einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 75
Abbildung **30**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Niere einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 78
Abbildung **31**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Harnblase einer 6 Wochen alten BALB/c Maus. 79
Abbildung **32**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Hoden einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. 81
Abbildung **33**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Nebenhoden einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. 82
Abbildung **34**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Prostata einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. 83
Abbildung **35**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Brustdrüse einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. 85
Abbildung **36**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Ovar einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 86
Abbildung **37**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Eileiter einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 87
Abbildung **38**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Uterus einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 88
Abbildung **39**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in der Vagina einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 89
Abbildung **40**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Kleinhirn einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 92
Abbildung **41**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Rückenmark einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. 93

Abbildung **42**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in einem Spinalganglion einer 5 Wochen alten BALB/c Maus. 94

Abbildung **43**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im enterischen Nervensystem einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 95

Abbildung **44**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) im Auge einer 4 Wochen alten BALB/c Maus. 98

Abbildung **45**: Immunhistochemischer Nachweis von T-Antigen (T-Ag) (A) und Casein Kinase Iε (CKIε) (B) jeweils in Normalgewebe (1), in Gewebe eines in situ Karzinoms (2) und in Gewebe eines invasiven Mammakarzinoms (3) der Maus M125. 103

Abbildung **46**: Immunhistochemischer Nachweis von Casein Kinase Iε (CKIε) in Normalgewebe (A) und Tumorgewebe (B) aus dem menschlichen Kolon. 106

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle **1**: In der Literatur beschriebene *in vitro* und *in vivo* Substrate der Casein Kinase I (CKI)-Familie. (zur Übersicht: (Knippschild et al. 2005)) 6

Tabelle **2**: Arbeitsschritte der maschinellen Einbettung mit Reagenzien, Einwirkzeit und Temperatur. 30

Tabelle **3**: Einteilung der Intensitätsgrade der Casein Kinase Iε (CKIε) spezifischen Farbreaktion. 36

Tabelle **4**: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in Binde-, Stütz- und Muskelgewebe. 50

Tabelle **5**: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den Kreislauforganen. 55

Tabelle **6**: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in lymphatischem Gewebe. 56

Tabelle **7**: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den Atmungsorganen. 61

Tabelle **8**: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den Verdauungsorganen. 63

Tabelle **9**: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den Anhangsdrüsen des Verdauungssystems. 67

Tabelle **10**: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den endokrinen Organen. 70

Tabelle **11**: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den Harnorganen. 76

Tabelle **12**: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den männlichen Geschlechtsorganen. 80

Tabelle **13**: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in den weiblichen Geschlechtsorganen. 84

Tabelle **14**: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in neuralem Gewebe. 91

Tabelle **15**: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) im Auge. 97

Tabelle **16**: Expressionsunterschiede zwischen Casein Kinase Iδ (CKIδ) und Casein Kinase Iε (CKIε) in verschiedenen Organen. 99

Tabelle **17**: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in Normalgewebe, in nicht-invasivem Tumorgewebe und in invasivem Tumorgewebe von Mäusen mit duktalem Mammakarzinom, sowie Tendenz der Expression von CKIε im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. 102

Tabelle **18**: Expression von Casein Kinase Iε (CKIε) in Normalgewebe und im Tumorgewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom, sowie Tendenz der Expression von CKIε im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. 105

10. Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Anja Utz versichere hiermit, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich habe keine Promotionsversuche an anderen Universitäten unternommen.

Es laufen keine Strafverfahren gegen mich.

Ulm, 20.05.2009.....

Datum, Unterschrift

Danksagung

Zuallererst danke ich Herrn Prof. Dr. Uwe Knippschild für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas und für die großartige, zeitintensive Betreuung, was das Gelingen dieser Arbeit erst möglich machte.

Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. Doris Henne-Bruns für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Abteilung anzufertigen.

Außerdem möchte ich Herrn PD Dr. Frank Leithäuser und Herrn Prof. Dr. Dietmar R. Thal dafür danken, dass sie mich bei der Beurteilung der Gewebeschnitte unterstützt haben.

Dank an Prof. Dr. Wolfgang Deppert für die zur Verfügungstellung der SV40 T-Ag transgenen Mäuse des Stammes NP8, die für diese Arbeit benötigt wurden.

Ein besonderer Dank geht auch an Heidrun Hirner, Arnhild Grothey, Nadine Süssner und Joachim Bischof für die hervorragende Unterstützung, die vielen hilfreichen Ratschläge und die Beantwortung all meiner Fragen. Dank ihnen habe ich so manches Problem während meiner Tätigkeit im Labor lösen können.

Bedanken möchte ich mich auch bei Helena Krist und Elena Yasovskaja, die mich immer mit einem Lächeln begrüßt haben und die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Ein großes Dankeschön geht an Annette Blatz und an Herrn Dr. Bernhard Schmidt, die meine Retter im Kampf mit der Computertechnik waren. Ihre kompetente Hilfe bei mikroskopischen Aufnahmen, Bildbearbeitung und Formatierung der Arbeit, wobei sie nie die Geduld mit mir verloren haben, hat mir sehr geholfen.

Ganz herzlich danke ich meinem Kommilitonen Holger Scharneck, der immer sehr hilfsbereit war und immer für eine nette, oft sehr unterhaltsame Arbeitsatmosphäre gesorgt hat. Holger hat mir stets ohne zu klagen zugehört und mich aus so manchem Tief wieder heraus gezogen. Während der Zeit im Labor ist er mir ein guter Freund geworden.

Zuletzt möchte ich mich noch bei allen Freunden und ganz besonders bei meiner Familie bedanken, die mich während meines Studiums immer unterstützt und tapfer so manche Stimmungsschwankung meinerseits ertragen haben.