

Autoregulation der Aktinsynthese durch Mikroinjektion von G-Aktin  
in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen

*Inaugural-Dissertation*

*zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

*des Fachbereichs Humanmedizin*

*der Justus-Liebig-Universität Giessen*

vorgelegt von Anke van der Does

aus Darmstadt

Giessen 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für Klinische Chemie,  
Klinische Immunologie und Humangenetik  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie  
Leiter: Prof. Dr. Dr. Katz  
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Katz

Gutachter: Prof. Dr. med. Bretzel

Tag der Disputation: 04.06.2003

Meinen Eltern und meinem Mann gewidmet, in Dankbarkeit  
für unermüdliche geistige, moralische und praktische Unterstützung

## Inhaltsverzeichnis

		<b>Seite</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Überblick	1
1.2	Zielsetzung der Arbeit	6
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>7</b>
2.1	Geräte	7
2.2	Materialien	8
2.3	Chemikalien	8
2.4	Nicht-kommerziell verfügbare Reagenzien und Zelllinien	9
2.5	Zellkultur / Medien und Stammlösungen	9
2.6	FITC-Phalloidin Färbung und Mikroinjektionsverfahren / Verwendete Puffer und Lösungen	11
2.7	Präparation der primären Hepatozyten	12
2.7.1	Herstellung der Hepatozytensuspension	13
2.7.2	Anlegen der Hepatozytenkultur	13
2.8	Anlegen und Überführung von FAO-Hepatomazellen auf Deckgläschen	14
2.9	Kultur von Endothelzellen	14
2.10	Herstellung von Mowiol-Lösung	14
2.11	Färbung von Aktinmikrofilamenten durch Fluorescein- markiertes Phalloidin	15
2.11.1	Anlegen einer Verdünnungsreihe von FITC-Phalloidin und Färbung von Aktinmikrofilamenten	15
2.11.2	Exponieren der Hepatozyten mit FITC-Phalloidin ohne Vorbehandlung	16
2.11.3	Darstellung der Aktinfilamente nach Sakisaka et al.	16
2.11.4	Darstellung der Ergebnisse in Anlehnung an Grolig	17
2.11.5	Darstellung der Aktinfilamente nach Watanabe	17
2.11.6	Darstellung der Aktinfilamente nach Hooser	17

		<b>Seite</b>
2.12	Kultur von Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen / Vorbereitung für die Mikroinjektion	18
2.13	Toxine	19
2.14	ADP-Ribosylierung von G-Aktin zur Mikroinjektion / Test des ADP-ribosylierten G-Aktins auf Toxinfreiheit	19
2.15	Mikroinjektion von ADP-ribosyliertem G-Aktin in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen und [ <sup>35</sup> S]-Methionin- Markierung der zellulären Proteine	21
2.15.1	Vorbereitung der Zellen für die SDS-Polyacrylamidgel- Elektrophorese	22
2.15.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	22
2.16	Immunpräzipitation von G-Aktin aus mikroinjizierten Zellen	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Aktinfilamenten	24
3.1.1	FITC-Phalloidin-Färbung	24
3.1.2	Abhängigkeit der Aktin-Darstellung von der FITC-Phalloidin- Konzentration	24
3.1.3	Exponieren der Hepatozyten mit FITC-Phalloidin	25
3.1.4	Verschiedene Verfahren zur Darstellung der Aktinfilamente in Hepatozyten	26
3.1.5	Darstellung des Zytoskeletts bei Hepatozyten und Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen durch FITC-Phalloidin	27
3.2	Effekte von C2-Toxin und Phalloidin auf das Zytoskelett von Hepatozyten, FAO-Hepatomazellen, Endothelzellen und Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen	27
3.2.1	Veränderungen des Aktinzytoskeletts während der Primärkultur von Hepatozyten	28

		<b>Seite</b>
3.2.2	Veränderungen des Aktinzytoskeletts in Hepatozyten unter C2-Toxin und Phalloidin	30
3.2.3	Veränderungen des Aktinzytoskeletts in FAO-Hepatomazellen unter C2-Toxin und Phalloidin	32
3.2.4	Veränderungen des Aktinzytoskeletts in Endothelzellen unter C2-Toxin und Phalloidin	34
3.2.5	Veränderungen des Aktinzytoskeletts in Hepatozyten- Hepatoma-Hybridzellen unter C2-Toxin und Phalloidin	36
3.3	Mikroinjektion von Toxinen in Hepatozyten-Hepatoma- Hybridzellen	37
3.4	Mikroinjektion von ADP-ribosyliertem G-Aktin in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen	38
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>46</b>
4.1	Etablierung der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Aktinfilamente	46
4.2	Autoregulation der Aktinsynthese	48
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>60</b>

## Abkürzungen

$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C2-I	Komponente I des C2-Toxins
C2-II	Komponente II des C2-Toxins
C2-Toxin	Botulinum C2-Toxin
Ci	Curie
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DABCO	1,4 Diazobizylo [2,2,2] -Oktan
dATP	2'-Desoxy-adenosin-5'triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-cytidin-5'triphosphat
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DTE	Dithioerythritol
E3-Zellen	Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen, Clon E3
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Bis(aminoethyl)-glycoether-N,N,N-tetraessigsäure
F-Aktin	filamentäres Aktin
FCS	foetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyant
fl	Femtoliter
g	Erdbeschleunigung
G-Aktin	globuläres Aktin
h	Stunde
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HEPES	2- [4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] -ethanolsulfonsäure
hPa	Hektopascal
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
M	Molar
mA	Milliampère
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
ms	Millisekunden
NAD	Nicotinamadenindinucleotid
NCS	Neonatales Kälberserum

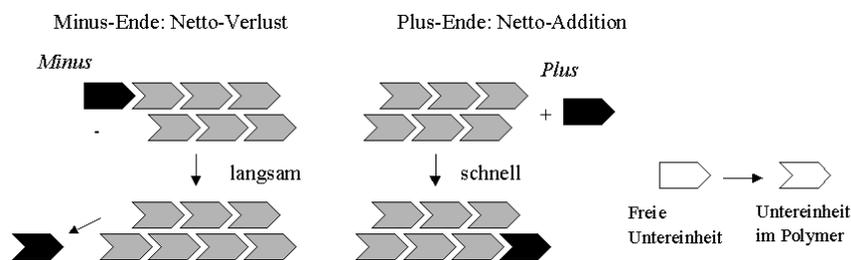
nm	Nanometer
nM	Nanomol
pg	Picogramm
pH	potentia hydrogenii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonucleinsäure
S	Schwefel
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris (hydroxymehtyl)-aminomethan
U	Unit
v	Volumen
w	Gewicht
x	mal
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

# 1 Einleitung

## 1.1 Überblick

Aktin und Tubulin repräsentieren wesentliche Proteine des Zytoskeletts. Allgemein bekannt ist die Beteiligung von Aktin und Myosin am Aufbau des kontraktile Systems von Muskelzellen. Wenig bekannt ist demgegenüber, daß Aktin auch eine der Hauptkomponenten des Zytoskeletts in Nichtmuskelzellen (Bershadsky und Vasiliev 1988, Feldmann 1989) ist, welche in verschiedene Bewegungsprozesse und die Strukturhaltung involviert sind. Die Funktionen des Aktins sind dabei im wesentlichen abhängig von der Polymerisation des monomeren globulären G-Aktins und der Depolymerisation des polymerisierten filamentären F-Aktins (Korn 1982, Pollard und Cooper 1986; Cooper 1991). Dies ist ein Prozeß, der als „treadmilling“ (Tretmühlmechanismus) bezeichnet wird (Neuhaus et al. 1983).

### Darstellung des „treadmilling“:



In diesem Gleichgewichtszustand werden die Untereinheiten am Plus-Ende aggregieren und sich mit derselben Rate am Minus-Ende ablösen, so daß das Polymer eine konstante Länge behält, wenn es auch einen Netto-Fluß von Untereinheiten durch das Polymer gibt, die sog. "**Tretmühle**".

Die Aktinfilamente, welche aus zwei umeinander gewundenen Aktin-Helices bestehen, weisen in ihrer Struktur eine Polarität auf. Am sogenannten stumpfen Ende werden überwiegend Aktin-Monomere im Rahmen der Polymerisation angelagert, während es am spitzen Ende zur überwiegenden Freisetzung von G-Aktin und somit zur Depolymerisation kommt. Obwohl sich die Länge des Polymers nicht ändert, werden als Nettoprozess einzelne G-Aktin-Moleküle von einem Ende des Filaments zum anderen verlagert. Diese

Polymerisation / Depolymerisation des Aktinzytoskeletts hat Einfluß auf verschiedene Stoffwechselfunktionen und ist an zellulären Pathomechanismen beteiligt. So zeigten Dabiri et al. 1990, daß die Aktinfilamente maßgeblich an der Ausbreitung von *Listeria monocytogenes* in der Wirtszelle beteiligt sind. Weiterhin ist bekannt, daß die Aktinfilamente die Gallesekretion beeinflussen und es bei einer Störung des G-Aktin/F-Aktin Gleichgewichtes zu einer intrahepatischen Cholestase kommt (Feldmann, 1989; Kawahara und French, 1990). Das Mikrofilamentsystem scheint außerdem in die hepatozelluläre Antwort auf hormonelle Stimulation involviert zu sein. Die Behandlung von Hepatomazellen mit Insulin, Glucagon, Thyroxin und Trijodthyronin bewirkt eine Stabilisierung der Aktinfilamente und eine gleichzeitige Abnahme des G-Aktin-Pools der Zellen (Rao et al., 1985; Theodoropoulos et al., 1992).

In Arbeiten der letzten Jahre wurde gezeigt, daß die Synthese von G-Aktin einer autoregulatorischen Kontrolle unterliegt, die auf dem Gleichgewicht zwischen G- und F-Aktin basiert (Reuner et al. 1991). Ähnliches findet man auch bei anderen Zytoskelettproteinen (Bershadsky und Vasiliev 1988). So unterliegt die Synthese des Tubulins ebenfalls einer autoregulatorischen Kontrolle, die von der Menge des nichtpolymerisierten Tubulins in der Zelle abhängt (Ben-Ze'ev et al. 1979; Cleveland et al. 1981). Experimente unter Verwendung von Colchicin und Taxol zeigten hierbei, daß eine Depolymerisation des zytoskelettären Tubulins und ein damit verbundener Anstieg der Tubulinmonomere, einen schnellen Abfall der Tubulin-mRNA und Tubulinsynthese zur Folge hatten. Behandelte man die Zellen dagegen mit Vinblastin, welches die Mikrotubuli zwar zerstört es aber hierbei zu einer Anhäufung von polymerisiertem Tubulin und nicht zu einem Anstieg von Tubulinmonomeren führt, so kam es nicht zu einer gesteigerten Tubulinsynthese. Dies spricht dafür, daß Tubulinmonomere die Tubulinsynthese regulieren. Außerdem kommt es bei der Mikroinjektion von depolymerisiertem Tubulin zu einer Unterdrückung der Tubulinsynthese (Cleveland et al. 1983). Dieser Effekt beruht darauf, daß die Tubulin-Monomere die Stabilität der polyribosomal gebundenen Tubulin-mRNA regulieren (Caron et al. 1985; Pachter et al. 1987; Bachurski et al. 1994).

Experimente mit Colchicin führten Gordon und Buxar (1997) an Endothelzellen der Kornea durch. Ihre Studien zeigen, daß eine kurze Inkubation (< 6 h) mit Colchicin in ähnlicher Weise eine Depolymerisation der Mikrotubuli und somit eine Zunahme des Pools der freien Tubulinmonomere bewirkt. Auch in diesem Fall kam es zur Hemmung der Neusynthese von Tubulinmonomeren. Nach längerer Inkubationszeit bilden sich dagegen Colchicin-Tubulinkomplexe, die nicht mehr der dynamischen Änderung der Mikrotubuli

zu Verfügung stehen. Aufgrund dessen kommt es hierdurch zu einer Steigerung der Tubulinsynthese. Die Colchicin-Tubulin-Komplexe lagern sich *in vitro* an die Mikrotubuli an und verhindern somit deren Wachstum (Vandecandelaere et al. 1994).

Mikrotubuli zeichnen sich durch eine dynamische Instabilität aus. Die Ursache hierfür beruht auf dem schnellen Austausch der Tubulinuntereinheiten zwischen polymerisierten und nichtpolymerisierten Tubulin (Mitchison und Kirschner, 1984; Cassimeris et al. 1987; Gelfand und Bershadsky, 1991; Cassimeris, 1993). Die dynamischen Eigenheiten und Funktionen des Tubulins werden mitbestimmt durch die relative Menge der verschiedenen Isoformen des Tubulins. Während die Synthese des  $\beta$ -Tubulins über die Stabilität der Tubulin-mRNA (nach dem obengenannten Vorgang) reguliert wird, scheint das  $\alpha$ -Tubulin seine Synthese durch Unterdrückung der Translation zu regeln, das heißt auf der Ebene der Übersetzung der Basensequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz der Proteine (Gonzalez-Garay und Cabral, 1996).

Zur Untersuchung der Synthese von Aktin und ihrer autoregulatorischen Kontrolle durch das G-Aktin/F-Aktin-Gleichgewicht kann man sich der Hilfe pflanzlicher oder bakterieller Toxine bedienen. Die ersten Hinweise auf eine Autoregulation der Aktinsynthese gewann man aus Untersuchungen mit dem F-Aktin depolymerisierenden Cytochalasin D (Tannenbaum und Brett, 1985; Tannenbaum, 1986). Die Cytochalasine sind eine von zahlreichen Pilzarten ausgeschiedene Familie von Stoffwechselprodukten. Sie lähmen verschiedene Formen der Zellbewegung in Vertebraten, zum Beispiel die Fortbewegung der Zellen, die Phagozytose, die Cytokinese, die Produktion von Mikrospeikes und Lamellopodien sowie die Faltung von Epithelschichten zu Röhren. Die Cytochalasine binden an das schnell wachsende stumpfe Ende der Aktin-Filamente an, wodurch sie die Anlagerung von Aktin-Molekülen verhindern. Cytochalasin D führte bei Hep-2-Zellen (Tannenbaum, 1986) und MEL-Zellen (Sympson und Geoghegan, 1990; Sympson et al., 1993) zu einer Zunahme der Aktinsynthese. Dagegen bewirkte die Zugabe von Cytochalasin D zu HeLa S3 Zellen (Ornelles et al., 1986) eine Abnahme der Aktinsynthese. Da die Wirkungsweisen von Cytochalasin D allerdings über die geschilderte Wirkung an Aktinfilamenten hinausgehen, macht dies den Einsatz des Toxins als Werkzeug bei zellbiologischen Untersuchungen des Aktins unübersichtlich. Aufgrund dessen werden in der vorliegenden Arbeit anstelle von Cytochalasin D die beiden Toxine Phalloidin und Botulinum C2-Toxin zur Untersuchung der Regulation der Aktinsynthese verwendet. Deren Wirkungsweise ist - soweit bislang bekannt - auf einen Mechanismus beschränkt, der im folgenden erläutert wird.

*Clostridium botulinum* C2-Toxin ribosyliert G-Aktin. Andere Bakterienproteine, die diese Funktion ebenso zeigen sind *Clostridium perfringens* Iota Toxin, *Clostridium spiriforme* Toxin und *Clostridium difficile* Toxin. Diese Toxine eignen sich daher als experimentelle Werkzeuge zur Untersuchung von Stoffwechsel- und Regulationsprozessen am Aktinzytoskelett (Aktories et al. 1986; Aktories und Wegner 1989).

Das Mykotoxin Phalloidin (ein hochgiftiges Alkaloid des grünen Knollenblätterpilzes) von *Amanita phalloides* stabilisiert Aktinfilamente im Gegensatz zu den vorgenannten clostridialen Toxinen stärker als alle anderen bekannten aktinbindenden Proteine, indem es an diese bindet und dadurch die Depolymerisation verhindert. Es kommt zu einer Verstärkung der Kontakte zwischen den Aktin-Helices. Dadurch kommt es unter anderem zu Funktionsstörungen der Zellmembran und zum Austreten wichtiger Zellenzyme. Phalloidin gelangt durch einen aktiven Transportmechanismus, vermutlich den Gallensäuretransporter (Frimmer 1987; Petzinger und Frimmer 1988), in die Zelle. Phalloidin verändert das F-Aktin/G-Aktin-Gleichgewicht stark zu der filamentären Form hin. Es kommt dadurch zu einer drastischen Reduktion des globulären Aktins (Cooper, 1987). Man spricht von der Herabsetzung der sogenannten kritischen Konzentration für die Aktin-Polymerisation. So stabilisiert z. B. das Einbringen von Phalloidin in Mausfibroblasten deren Aktinzytoskelett durch Anlagerung an F-Aktin. Die Abnahme des monomeren Aktins ist begleitet von einem Anstieg der Aktinsynthese (Serpinskaya et al. 1990).

Ein umgekehrter Effekt auf das G-Aktin/F-Aktin-Gleichgewicht läßt sich bei embryonalen Hühnerfibroblasten in Gegenwart von *Clostridium botulinum* C2-Toxin beobachten. Dieses verändert das G-Aktin/F-Aktin-Gleichgewicht zur monomeren Form hin (Reuner et al. 1987; Aktories et al. 1989). Benutzt man alternativ die beiden Antagonisten C2-Toxin und Phalloidin, so kann man eine autoregulatorische Kontrolle der Aktinsynthese an kultivierten Ratten-Hepatozyten demonstrieren (Reuner et al. 1991). C2-Toxin führt zu einem Anstieg der Aktinmonomere und zur reziproken Verminderung des F-Aktins. Mit Erhöhung des G-Aktin-/F-Aktin-Verhältnisses kommt eine Abnahme der Aktin-mRNA zustande, die eine Verminderung der Neusynthese von Aktin zur Folge hat. Den umgekehrten Effekt beobachtet man unter Phalloidineinfluß. Es kommt zu einer Abnahme des G-Aktin/F-Aktin-Verhältnisses und damit einhergehend zur Erhöhung des Aktin-mRNA-Spiegels, die ihrerseits mit einer Steigerung der Aktinsynthese verbunden ist. Wichtig für die Wahl des Zellmodells ist die Tatsache, daß sowohl C2-Toxin als auch Phalloidin in die Zellen gelangen. Dies gilt jedoch nur für einige Zellsysteme wie

beispielsweise Hepatozyten. Beim C2-Toxin, welches als binäres Toxin aus den Komponenten I und II besteht, bindet die Komponente II an die Zellmembran an und ermöglicht dadurch der toxischen Komponente I das Eindringen. C2-Toxin ist das potenteste bekannte binäre Toxin, das im Gegensatz zu anderen Botulinum-Toxinen allerdings nicht neurotoxisch wirksam ist. In vivo bewirkt das Toxin eine generelle Schrankenstörung. Es führt zu einer starken Zunahme der Gefäßpermeabilität und zu starkem Blutdruckabfall (Ohishi et al. 1980b; Simpson 1982). Ferner wird das Auftreten von hämorrhagischen Lungenödem nach Toxinapplikation beschrieben (Simpson 1982). Bei der Behandlung von Zellkulturen mit C2-Toxin kommt es aufgrund des Zusammenbruchs des Zytoskeletts zu einer äußeren Abrundung der Zellen (Ohishi et al., 1984). Die Komponente I des C2-Toxins besitzt ADP-Ribosyltransferaseaktivität (Simpson 1984), die zu einer ADP-Ribosylierung von G-Aktin führt. ADP-ribosyliertes G-Aktin seinerseits bindet an das stumpfe, schnell wachsende Ende der Aktin-Filamente. Dieser Vorgang verhindert die weitere Polymerisation, während es am spitzen, langsam wachsenden Ende des F-Aktins weiterhin zur Abspaltung von Aktin-Monomeren kommt, die ebenfalls ADP-ribosyliert werden. Dadurch kumuliert ADP-ribosyliertes G-Aktin im Zytosol, was als „Trapping“ bezeichnet wird. Infolgedessen kommt es zur Verminderung des F-Aktins und damit zum oben beschriebenen Zusammenbruch des Zytoskeletts (Reuner et al., 1987; Aktories et al., 1989).

Ein Anstieg des G-Aktins bzw. des G-Aktin/F-Aktin-Verhältnisses unter C2-Toxin führt zu einer Minderung der Aktin-mRNA (Reuner et al. 1995), wohingegen eine Abnahme des G-Aktins im G-Aktin/F-Aktin-Gleichgewicht durch Phalloidin einen Anstieg der Aktin-mRNA bewirkt mit der Folge einer gesteigerten Transkription (Reuner et al. 1991). Der zuerst genannte Effekt zeigte sich ebenfalls in Experimenten mit 3T3-Zellen und HeLa-Zellen, welche eine posttranskriptionale Abnahme der Aktinsynthese nach Behandlung mit C2-Toxin und *Latrunculin A* aufwiesen. *Latrunculin A* ist ein Metabolit des Roten Seeschwammes, welcher G-Aktin bindet und damit die Polymerisation verhindert (Bershadsky et al. 1995). Die physiologische Relevanz dieser Regulation wurde an Ratten-Hepatozyten und menschlichen Leukozyten gezeigt. In analoger Weise konnten andere Forschungsgruppen den Einfluß von Hormonen oder osmotischem Streß auf den zellulären G-Aktingehalt und auf die Regulation der Aktinsynthese in Primärkulturen von Ratten-Hepatozyten nachweisen (Rao et al. 1985; Theodoropoulos et al. 1992).

## 1.2 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden ob der intrazelluläre Spiegel an monomeren G-Aktin den entscheidenden Einfluß auf die Regulation der Aktinsynthese hat. Hinweise darauf gab es in Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit, wobei eine reziproke Korrelation zwischen dem monomeren G-Aktin und der Aktin-mRNA aufgezeigt wurde. Zunächst sollte mit fluoreszenzmikroskopischen Verfahren ein geeignetes Zellsystem gesucht werden, an dem die direkten zellmorphologischen Auswirkungen von Phalloidin, C2-Toxin bzw. mikroinjiziertem G-Aktin untersucht werden konnten. Dies sollte mit Hilfe von FITC-Phalloidin geschehen, welches selektiv an Aktinfilamente bindet. Man nahm an, die zu erwartenden Effekte am Aktinzytoskelett am besten an Hepatozyten bzw. Hybridzellen demonstrieren zu können. Es existierten eine Reihe von Arbeiten, die die Färbung von Aktinfilamenten der Hepatozyten oder anderer Zellen beschreiben (Zachary et al. 1986, Nickola und Frimmer 1986; Benkoel et al. 1992; Thibault et al. 1992). Mit Hilfe dieser Methoden galt es, die qualitativ beste für Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen zu erarbeiten. Weiterhin sollte fluoreszenzmikroskopisch das Verhalten des Aktinzytoskeletts von Hepatozyten in Primärkultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer untersucht werden. In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, daß mit ansteigender Kulturdauer, die Menge des neusynthetisierten F-Aktins zunimmt. Zunächst mußte eine Methode etabliert werden, mit der man fluoreszenzmikroskopisch die Veränderungen des Zytoskeletts in Zellen darstellen kann.

Schließlich sollte der Beweis dafür erbracht werden, daß der G-Aktin-Gehalt und nicht die F-Aktin-Konzentration der Zellen die Aktinsynthese reguliert. Hierzu sollte monomeres Aktin in Hepatozyten mikroinjiziert und anschließend die Aktinsynthese gemessen werden. In Vorversuchen hatte man herausgefunden, daß primäre Hepatozyten bei dem Vorgang der Mikroinjektion abstarben, so daß nunmehr für die Mikroinjektionsexperimente Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen vorgesehen wurden. Bei der Mikroinjektion mußte ADP-ribosyliertes G-Aktin verwendet werden, da sich im Vorfeld gezeigt hatte, daß G-Aktin durch spontane Polymerisation die Mikroinjektionsnadel verstopft (P. Pohlmeier 1998).

Zusammenfassend ließ sich durch Mikroinjektion von ADP-ribosyliertem G-Aktin in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen die postulierte G-Aktin-abhängige Autoregulation der Aktinsynthese nachweisen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

BAS IIIs Detektor, **Fuji Photo**, Japan

Begasungsbrutschrank B 5061 EK/O2 der Firma **Heraeus**, Hanau

Centricon® -30 Mikrokonzentrator der Firma **Amicon**, Beverly, USA

Halbmikroosmometer „Typ M Nr. 21.20“ der Firma **Knauer**, Berlin

Hybridisierungsöfen „400 H“ der Firma **Bachofer**, Reutlingen

Liquid Szintillation Analyzer „1900 TR“ der Firma **Packard**

Mikroliterzentrifuge „3850“ der Firma **Hettich**, Tuttlingen

Mikroliterzentrifuge Biofuge A von **Heraeus**, Hanau

Mikroskop Typ „Axiovert 35“ der Firma **Carl Zeiss**, Oberkochen, mit Mikromanipulator 5170 und einem Mikroinjektor 5242 der Firma **Eppendorf**, Hamburg

pH-Meter „CG820 mit Elektrode „N 5900 A“ der Firma **Schott** Geräte, Hofheim a. Ts.

Phasenkontrastmikroskop Typ „Axiovert 10“ der Firma Carl Zeiss, Oberkochen

Rüttler für Mikroliterreaktionsgefäße „Reaktionsmischer 3000“ von **Eppendorf**, Hamburg

Scanner GT 6000 der Firma **Epson**

Spektrophotofluorometer Aminco-Bowman, **Colora**, Lorch in Deutschland

Sterilbank Lamin Air HB 2448 der Firma **Heraeus**, Hanau

TINA Bild-Software, **Raytest**, Straubenhardt

Tischautoklav „Typ 23“ der Firma **Melag**, Berlin

Ultraschall-Homogenisator Labsonic U mit Nadelschwingsonde 40 T, der Firma **B. Braun**, Melsungen

Ultraspec III-Spektralphotometer von **Pharmacia**, Freiburg

Ultrazentrifuge „L2-65B“ mit Rotor „Type 50 Ti“ und Ultrazentrifugationsröhrchen der Firma **Beckman**, München

Verstärkerfolien „Cronex-Quanta III“ der Firma **DuPont de Nemours**, Bad Homburg

## 2.2 Materialien

**Falcon/Becton-Dickinson**, Heidelberg: Polystyrol-Gewebekulturschalen, Polystyrol-Gewebekulturflaschen

**Kalensee, Gießen**: Rubber-Policeman

Röntgenfilm „X-Omat AR 5“ der Firma **Kodak**, Rochester, N. Y./ USA

**Zinsser-Analytic, Frankfurt**: Aqua safe - Szintillator

**Zürcher Beuteltuchfabrik**, Zürich/Schweiz: Nylonnetz „Scrynel NY 79 HD“

## 2.3 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen (von der Qualität p.a. oder reinst):

**Amersham Buchler**, Braunschweig: [<sup>32</sup>P-dCTP], [<sup>35</sup>S]-Methionin

**Bio-Rad Laboratories**, München: Proteinbestimmungs-Kit (nach Bradford) zur Bestimmung des Gehaltes an zellulären Proteinen

**Boehringer, Mannheim**: ATP, BSA, (Fraktion V), FCS, HAT-Medium, Kollagenase, Medium 199 (Earle, ohne NaHCO<sub>3</sub>, mit Glutamin), NCS

**Fluka**, Neu-Ulm: EDTA, Glycin, Guanidiniumthiocyanat, Isoamylalkohol

**Gibco**, Eggenstein/Karlsruhe: Medium 199 und Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT) Medium, Trypsin-EDTA

**Hoechst AG**, Frankfurt: Mowiol 4-88

**ICN Biomedicals**, Meckenheim: monoklonaler Aktin-Antikörper von der Maus (IgG, kappa Leichtketten)

**Merck**, Darmstadt: β-Mercaptoethanol, Borsäure, Bromphenolblau, CaCl<sub>2</sub>, DMSO, Ethanol, Formaldehyd, Formamid, HEPES, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HPLC-Methanol, Imidazol-HCl, Isopropanol, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Natriumacid, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaN<sub>3</sub>, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Saccharose, Sucrose, Triton X-100

**Messer**, Griesheim: Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>)

**Riedel de Haën**, Seelze: Chloroform, Methanol

**Roth**, Karlsruhe: EGTA, Glycerin

**Seromed**, Berlin: foetales Kälberserum

**Serva**, Heidelberg: BSA, Dexamethason, Insulin, Methionin freies Medium 199 (MEM), Penicillin G Natriumsalz, SDS

**Sigma**, München:  $\alpha$ -Aktin (Kaninchenskelettmuskel), 4-Chloronaphtol mit Diaminobenzidin, Desoxyribonucleinsäure Natriumsalz, DTE, Gelantine, 8-Hydroxychinolin, NaOH, Natriumacetat, Natriumcitrat, N-Lauroyl-Sarkosin-Natriumsalz, FITC-Phalloidin, Phenol (wassergesättigt), PMSF, Polyvinylpyrrolidon, Protein G-Sepharose 4 fast flow, Rhodamin-Phalloidin, Saponin, Streptomycinsulfat, Tris

**Wako**, Neuss: Collagenase

Alle übrigen Chemikalien waren von analytischer oder molekularbiologischer Qualität und wurden im entsprechenden Fachhandel bezogen.

## 2.4 Nicht-kommerziell verfügbare Reagenzien und Zelllinien

Folgende Zellsysteme und Toxine wurden verwendet:

Die Komponenten I und II von Clostridium botulinum C2-Toxin, nach Ohishi et al. (1980) präpariert und aktiviert (Prof. Dr. K. Aktories, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Freiburg).

Globuläres  $\alpha$ -Skelettmuskelaktin vom Kaninchen nach der Methode von Spudich und Watt (1971) hergestellt (Prof. Dr. K. Aktories, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Freiburg).

E3-Zellen, FAO-Hepatomazellen (Prof. Dr. E. Petzinger, Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Universität Gießen).

Endothelzellen aus der Arteria pulmonalis des Schweins (Prof. Dr. N. Suttorp, ehem. Medizinische Klinik der Universität Gießen)

## 2.5 Zellkultur / Medien und Stammlösungen

*Calcium-freie Krebs-Ringer Stammlösung :*

120 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, mit 5% CO<sub>2</sub> auf pH 7.35 eingestellt.

*Präperfusionsmedium:*

0.25 mM EGTA in Calcium-freier Krebs-Ringer-Lösung , mit 5% CO<sub>2</sub> pH auf 7.35 eingestellt.

*Perfusionsmedium:*

5 mM HEPES/NaOH, 4 mM CaCl<sub>2</sub> , 380 mg/l Kollagenase in Calcium-freier Krebs Ringer-Lösung, mit 5% CO<sub>2</sub> pH auf 7.35 eingestellt.

*Waschmedium:*

10 mM HEPES/NaOH pH 7.35, 144 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l BSA.

*Kulturmedium M 199:*

9.8 g/l M 199-Pulver, 2 g/l BSA, 10 mM Hepes/NaOH, pH 7.35, nach Zugabe von 19.6 mM NaHCO<sub>3</sub> mit 5% CO<sub>2</sub> erneut auf pH 7.35 eingestellt.

*Antibiotikastammlösung*

6.4 g/l Penicillin G und 11.7 g/l Streptomycinsulfat gelöst in 0.9%iger (w/v) NaCl-Lösung

*Standardmedium*

Kulturmedium 199 mit 0.5 nmol/l Insulin, 5 nmol/l Dexamethason und 1 %iger (v/v) Antibiotikastammlösung.

*HAT-Medium*

Kulturmedium 199 mit 2% (v/v) HAT (50x), 0.5 nmol/l Insulin, 5 nmol/l Dexamethason, 1% (v/v) Antibiotikastammlösung und 10% (v/v) FCS

Die Osmolarität aller Medien wurde durch Zugabe von H<sub>2</sub>O oder NaCl auf 275-285 mosm/l eingestellt. Anschließend wurden die Lösungen und Medien steril filtriert (Porengröße 0.2 µm) und in autoklavierte Glasflaschen abgefüllt.

## 2.6 FITC-Phalloidin Färbung und Mikroinjektionsverfahren / Verwendete Puffer und Lösungen

### *Hepes-Puffer:*

9.77 g/l Medium 199, 10mM Hepes/NaOH, pH 7.2

### *Methionin freies Medium :*

9.4 g/l MEM , 10mM Hepes, 2 g/l BSA, 2mM NaHCO<sub>3</sub>, (pH 7.3, 280 mosmol/l).

### *PBS-Puffer:*

137 mM NaCl, 2.74 mM KCl, 8.0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (pH 7.4)

### *G-Aktin Puffer:*

0.2 mM ATP, 0.5 mM β-Mercaptoethanol, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub> und 2 mM Tris-HCl (pH 7.4).

### *Puffer G:*

0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.25 mM ATP, 5mM Tris-HCl, pH 7.5

### *10x Probenpuffer für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese:*

10% (w/v) SDS, 10% (w/v) Sucrose, 10% (v/v) Glycin und 1 Spatelspitze Bromphenolblau in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5).

### *Zellaufnahmepuffer:*

60% (v/v) H<sub>2</sub>O, 20 % (v/v) 10x Probenpuffer und 20% (v/v) 0.5 M DTE

### *Lysis-Puffer:*

0.9% (w/v) NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5

### *Mikrofilamentstabilisierungspuffer nach Traas (Traas et al. 1987):*

10 mM EGTA, 5mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM PIPES-KOH, pH 6.9

### *Lösung A nach Watanabe ( Watanabe et al. 1991):*

50 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA, pH 7.0

*Laemmli-Puffer* (Laemmli 1970):

90  $\mu$ l dest. H<sub>2</sub>O, 30  $\mu$ l 10 x Laemmli und 30  $\mu$ l 0.5 M DTE

*Immunpräzitationspuffer*:

10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% (w/v) Desoxycholat, 1% (v/v) Triton X-100 und 0.1% (w/v) SDS

*Lösung A*:

40 mM NaF, 0.05 % Triton X-100, 10 mM EDTA, 100 mM Natriumkaliumphosphat, pH 7.0.

## 2.7 Präparation der primären Hepatozyten

Die Präparation isolierter Hepatozyten erfolgte nach der Methode von Berry und Friend (1969). Vor der Entnahme der Leber wurden die Ratten durch intraperitoneale Injektion von 60 mg Pentobarbital/kg KG narkotisiert. Die Perfusion der Leber und die Herstellung der Hepatozytensuspension erfolgte unter aseptischen Bedingungen. Die Isolierung der Hepatozyten wurde in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt:

### *a) nicht-rezirkulierende in-situ Perfusion*

Nach Öffnen der Bauchhöhle wurde die Leber über eine Kanüle in der Vena portae mit 50 - 100 ml Präperfusionsmedium so lange gespült, bis sie blutleer war. Zur Druckentlastung wurde in die Vena cava inferior unterhalb der Einmündung der Venae renales eine Kanüle eingeführt.

### *b) rezirkulierende in-situ Perfusion*

Die anschließende Perfusion über die Vena portae mit dem collagenasehaltigen Perfusionsmedium diente zum Auflösen des Zellverbandes. Dazu wurde das aus der Kanüle in der Vena cava inferior austretende Perfusionsmedium über ein Schlauchsystem in ein Sammelgefäß zurückgeleitet. Thorakal mußte die Vena cava inferior durch eine Ligatur unterbunden werden, um so einen Rückfluß des Perfusionsmediums zum Herzen zu verhindern. Aus dem Sammelgefäß wurde das Medium in einen Oxygenator gepumpt, dort auf 37°C temperiert und mit Carbogen oxygeniert. Der Zusatz von Carbogen zum Medium gewährleistete eine ausreichende Sauerstoffsättigung sowie durch das entstandene

Bikarbonat-Puffersystem einen konstanten pH-Wert im Medium von 7.40. Vom Oxygenator wurde das Medium über ein Schlauchsystem unter einem Druck von 10 - 15 cm Wassersäule in die Vena portae zur Leber zurückgeführt.

### **2.7.1 Herstellung der Hepatozytensuspension**

Nach etwa 10minütiger Perfusion mit Kollagenase wurde die Leber aus dem Tier herauspräpariert und in eine Schale mit Waschmedium überführt. Durch Aufreißen der Kapsel und vorsichtiges Schwenken erfolgte die Herausspülung der Zellen aus dem Gewebeverband. Bindegewebe und Kapselbestandteile wurden durch vorsichtiges Zupfen entfernt. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Nylonnetz (Porengröße 79 µm) filtriert und so von Bindegewebsresten und Zellaggregaten befreit. Durch mehrfaches Waschen und Zentrifugieren (3 min bei 15 g) wurden Nichtparenchymzellen und Zelltrümmer mit dem Überstand entfernt, während die Hepatozyten unter diesen Bedingungen bevorzugt sedimentierten. Dieser Reinigungsvorgang mußte ein- bis dreimal wiederholt werden. Danach war der Überstand weitgehend klar. Das Hepatozytensediment wurde im vierfachen Volumen (20 % (w/v) Suspension) Waschmedium resuspendiert.

### **2.7.2 Anlegen der Hepatozytenkultur**

Die Kultivierung der Hepatozyten erfolgte unter aseptischen Bedingungen. Die Hepatozytensuspension (20 % w/v) wurde mit Kulturmedium (unter Zusatz von 5 µM Insulin, 50 µM Dexamethason und 1 % (v/v) Antibiotikastammlösung) im Verhältnis 1:15 verdünnt. Von dieser Hepatozytensuspension wurden je 3 ml (ca.  $2.5 \times 10^6$  Zellen) in Falcon<sup>®</sup> Gewebekulturschalen von 60 mm Durchmesser pipettiert. Das Kulturmedium enthielt während der ersten 4 h der Inkubation zusätzlich 5 % (v/v) neonatales Kälberserum, um die Anheftung der Zellen auf dem Schalenboden zu verbessern. Der erste Mediumwechsel wurde 4 h nach Kulturbeginn vorgenommen. Weitere Medienwechsel erfolgten jeweils nach 24 h. Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und wasserdampfgesättigter Luft mit einem Anteil von 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert.

## **2.8 Anlegen und Überführung von FAO-Hepatoma-Zellen auf Deckgläschen**

Zunächst wurden Deckgläschen mit Kollagen beschichtet, um später eine bessere Haftung der Zellen darauf zu gewährleisten, und in Kulturschalen gegeben. Die Beschichtung mit Kollagen erfolgte indem auf jedes Deckgläschen ein Tropfen Kollagen gegeben und der Überstand wieder entfernt wurde, so daß danach nur noch ein dünner Film Kollagen übrigblieb, der trocknen konnte.

Die FAO-Hepatomazellen wurden in 250 ml Falcon<sup>®</sup>-Kulturflaschen in Standardmedium mit 15 % (v/v) FCS gehalten. Zum Transport auf neue Flaschen oder Schalen erfolgte ein Absaugen des Standardmediums aus den Kulturflaschen und danach die Zugabe von je 500 µl Trypsin-EDTA-Lösung (0.05/0.02%). Die Flaschen wurden ein paarmal geschwenkt, das Trypsin danach absaugt und der gleiche Vorgang nochmals durchgeführt. Anschließend wurden die Flaschen für 2 - 3 min in den Brutschrank gegeben, damit sich die Zellen in dieser Zeit lösen konnten. Dann wurde je 1000 µl Kulturmedium in die Zellkulturflaschen eingefüllt, in denen die Zellen nun frei schwammen. Darauf erfolgte die Ausplattierung auf die vorbereiteten Kulturschalen, in denen sich die Deckgläschen befanden, damit die Zellen auf diesen anwachsen konnten.

## **2.9 Kultur von Endothelzellen**

Die Endothelzellen stammten aus der Arteria pulmonalis des Schweines. Sie wurden im gleichen Kulturmedium, unter den gleichen physikalischen Bedingungen gehalten wie die Hepatozyten und wuchsen auf Gelatine-beschichteten Kulturschalen an.

## **2.10 Herstellung von Mowiol-Lösung**

Die Mowiol-Lösung diente zum Einbetten und Konservieren, der auf Objektträgern befindlichen Zellen. In einen 50 ml Erlenmeyerkolben wurden 6 g Glycerin p.a. abgewogen. Nach Zugabe von 2.4 g Mowiol 4-88 zu 6 ml aqua dest. folgte eine zweistündige Inkubationszeit auf einem Rüttler bei Raumtemperatur. 12 ml Tris-Puffer, 0,2 M, pH 8.5 wurden der Mowiol-Lösung zugefügt. Dieses Gemisch wurde anschließend 10

min in einem Wasserbad von 50°C unter Rühren inkubiert. Danach erfolgte das Abfüllen in 2.2 ml Eppendorf-Cups und 15 min Zentrifugation bei 5000 G. Der Überstand wurde in Schnappdeckelgläser überführt und bei -20°C eingefroren (1 Jahr stabil). Um das Ausbleichen von Immunfluoreszenzpräparaten zu verzögern, wurde jeweils 1 ml Mowiol 100 mg DABCO (Sigma ) zugesetzt.

## **2.11 Färbung von Aktinmikrofilamenten durch Fluorescein-markiertes Phalloidin**

Die im folgenden beschriebenen Methoden der Aktinfilamentfärbung dienten zur Suche nach der besten Möglichkeit der Darstellung der Filamente in den Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen. Es war außerdem nicht klar, ob die alleinige Exposition mit FITC-Phalloidin schon genügen würde, die Filamente darzustellen und welche Konzentrationen von FITC-Phalloidin dafür gegebenenfalls benötigt würden. Die hierfür durchgeführten Vorversuche sind im Folgenden einzeln dargestellt.

### **2.11.1 Anlegen einer Verdünnungsreihe von FITC-Phalloidin und Färbung von Aktinmikrofilamenten**

Zunächst wurde 0.1 mg FITC-Phalloidin in 300 µl PBS gelöst. Die Stocklösung hatte eine Konzentration von 0.33 mg/ml und wurde durch Zugabe von PBS verdünnt, um verschiedene Konzentrationen von 300 µg/ml bis 0.3 µg/ml in Verdünnungsschritten von jeweils 1:3 absteigend zu erhalten. Folgende Arbeitsschritte wurden zur Färbung der Aktinmikrofilamente durchgeführt:

Primäre Hepatozyten wurden auf viereckigen, kollagenbeschichteten Deckgläschen adhären kultiviert, welche sich in mit Kulturmedium gefüllten Petrischalen befanden. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Deckgläschen in eine Glasschale überführt. Es folgte vorsichtiges Spülen der auf den Deckgläschen befindlichen Hepatozyten mit PBS bei Raumtemperatur und danach ebenfalls bei Raumtemperatur 30 min lang die Fixation mit 2.5% Formaldehyd in PBS + 0.2% Triton X-100. Die nächsten Arbeitsschritte waren: zweimaliges Waschen mit PBS à 5 min, 3 min Zellexponierung mit 50% Aceton bei 4°C, 5 Minuten lang Exponierung mit 100 % Aceton bei 4°C und dann nochmals 3 Minuten lang mit 50% Aceton bei 4°C. Dann folgten: 5minütiges Spülen mit PBS, Auftragen des FITC-

Phalloidins auf die Deckgläschen ( je 30  $\mu\text{l}$  in den oben genannten Konzentrationen ) und Inkubation in dunkler, feuchter Kammer für 30 min. Anschließend wurde 3 x 10 min mit PBS gewaschen und dann 30 Sekunden mit Bidest gespült. Darauf folgten: Auftragung von Mowiol 4-88 mit DABCO versetzt auf Objektträger, vorsichtiges Auflegen der mit Hepatozyten beschichteten Deckgläschen auf das Mowiol ( mit Hepatozyten zum Objektträger gerichtet), Trocknen bei ca. 8°C für 10 Stunden und anschließendes Mikroskopieren. (Ergebnis unter 3.1.2)

### **2.11.2 Exponieren der Hepatozyten mit FITC-Phalloidin ohne Vorbehandlung**

Dieses zweite Verfahren wurde angewandt, um zu sehen ob Hepatozyten auch ohne Vorbehandlung FITC-Phalloidin aufnehmen, es also zu einer Darstellung der Aktinfilamente kommt. Es wurden erneut Hepatozyten verwendet, die in Kulturmedium auf Deckgläschen angewachsen waren. Nach der Überführung der Deckgläschen in kleinere Behälter wurde dort FITC-Phalloidin in folgenden Konzentrationen zugesetzt: 10  $\mu\text{g/ml}$ , 3  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ . Das FITC-Phalloidin wurde direkt in geringe Mengen Kulturmedium gegeben und die Zellen danach 30 min in einer dunklen Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf erfolgten kurzes Spülen mit PBS, Eindecken in Mowiol und Trocknen bei Raumtemperatur. (Ergebnis unter 3.1.3)

### **2.11.3 Darstellung der Aktinfilamente nach Sakisaka et al.**

Ein weiterer Versuch zur Darstellung der Aktinfilamente in Hepatozyten erfolgte nach der Methode von Sakisaka et al. (1988). Hierbei wurden die auf Deckgläschen befindlichen Hepatozyten 1 min lang in 0.2 % Triton X-100 in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Dann folgte eine 10 minütige Fixation mit 3.7 % Paraformaldehyd in PBS. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei - 20 °C Methanol ausgesetzt und danach zweimal je 5 min mit PBS gewaschen. Im Anschluß wurden die Zellen in Konzentrationen von 100  $\mu\text{g/ml}$ , 30  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$  FITC- Phalloidin gelöst in Aqua dest. eine Stunde lang in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert, danach 2 x mit PBS gewaschen und schließlich in Mowiol eingebettet. Dieses Verfahren wurde mit Hepatozyten sowie mit FAO-Hepatomazellen durchgeführt. (Ergebnis unter 3.1.4)

#### **2.11.4 Darstellung der Aktinfilamente in Anlehnung an Grolig**

Bei einer weiteren Darstellung der obengenannten Zelllinien (Hepatozyten und FAO-Hepatomazellen) wurde in Anlehnung an die Methode von Grolig (1990) vorgegangen, die dieser an Pflanzenzellen anwendete. Fixation und Färbung erfolgten in einem Schritt. Zunächst wurde das Fixierungsgemisch bestehend aus 1.5 % (w/v) Formaldehyd und 0.05 % (w/v) Glutardialdehyd in Mikrofilamentstabilisierungspuffer nach Traas et al. (1987) bei einem pH von 6.9 hergestellt.

Als weitere Arbeitsschritte folgten: Absaugen des Zellkulturmediums, 10 min Waschen der Zellen in Traas-Puffer, dann gleichzeitige Fixation und Färbung. Es wurden je 95  $\mu$ l des Fixierungsgemisches verwendet und diesem 5  $\mu$ l FITC-Phalloidin in Konzentrationen von 10, 3.0 bzw. 1.0  $\mu$ g /ml beigefügt. Die Zellen inkubierten für 10 min. Danach folgten vorsichtiges Absaugen der Lösung mit Filterpapier, dann 5 min Einwirken des Stabilisierungspuffers, Entfernen des Puffers mittels mit Filterpapiers und Einbetten der Deckgläschen in Mowiol. (Ergebnis unter 3.1.4)

#### **2.11.5 Darstellung der Aktinfilamente nach Watanabe**

Ein weiteres Verfahren, das wie die vorangehenden keine optimalen Ergebnisse lieferte, wurde nach Watanabe et al. 1991 durchgeführt. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen kurz in Lösung A (nach Watanabe, siehe Kapitel 2.6) gespült. Dann schloß sich eine 10 minütige Inkubation bei 0°C in 200  $\mu$ M Lysolecithin in Lösung A an und eine 3 minütige in 100 % Aceton bei -10°C. Es folgten 5 min Spülung mit Lösung A, darauf 30 min Exposition mit FITC-Phalloidin gelöst in Aqua dest. zu Konzentrationen von 100, 10 und 1  $\mu$ g/ml in einer dunklen, feuchten Kammer, dann 3 x Waschen mit Lösung A (nach Watanabe) für jeweils 5 min und Einbetten in Mowiol. (Ergebnis unter 3.1.4)

#### **2.11.6 Darstellung der Aktinfilamente nach Hooser**

Mit der Darstellung der Aktinfilamente nach Hooser et al. (1991) konnte letztendlich eine geeignete Methode zur Darstellung der Aktinfilamente in Hepatozyten und Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen gefunden werden. Diese Fluorescein (FITC)-Phalloidin-Färbung

von in Kultur vorliegenden Hepatozyten und Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen führte zu einer spezifischen Markierung der Aktinfilamente. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und danach für 10 min mit frisch hergestellter Lösung aus 3.7% (w/v) Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen ein zweites Mal für einige Sekunden mit PBS gewaschen um Reste des Paraformaldehyds zu entfernen und anschließend 1 min mit 0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Darauf folgte ein zweimaliges Waschen mit PBS. Das Aktinzytoskelett wurde mit FITC-Phalloidin (10µg/ml) 30 min in einer feuchten Kammer angefärbt und das ungebundene FITC-Phalloidin durch zweimaliges Waschen mit PBS à 10 min entfernt. Die gefärbten Zellen wurden danach dünn mit Mowiol beschichtet und mit Deckgläschen versehen. Mikroskopiert wurde an einem Zeiss Fluoreszenz-Mikroskop (Vergrößerung 630x) und photographiert unter Verwendung von Filmen von Kodak Tri-X Pan (33 DIN). (Ergebnis unter 3.1.5)

## **2.12 Kultur von Hepatozyten und Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen/ Vorbereitung für die Mikroinjektion**

Die Hepatozyten von ausgewachsenen weiblichen Wistar-Ratten (aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover) wurden mit Hilfe einer EGTA- und anschließenden Kollagenaseperfusion isoliert und gewaschen, mit M199 aufgenommen und in Falcon<sup>®</sup> Kulturschalen ausplattiert (Katz und Giffhorn 1983). Vor der Behandlung mit C2-Toxin oder Phalloidin wurden die Hepatozyten etwa 12 h lang in Primärkultur gehalten. Die Herstellung der Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen (Klon 1E3) erfolgte durch Fusion von isolierten Hepatozyten mit FAO-Hepatomazellen (Polokoff und Everson 1986). Aufgrund des weitgehenden Erhalts leberspezifischer Eigenschaften können sie als immortalisierte Hepatozyten angesehen werden (Katz et al, 1992). Die Hepatozyten-Hepatoma- Hybridzellen wurden in Falcon<sup>®</sup> Kulturflaschen kultiviert unter Zugabe von Medium 199, welches als Zusatz 10%iges Kälberserum, 0.5 nM Insulin, 5 nM Dexamethason, 60mg/100ml Penicillin und 120 mg/100ml Streptomycin enthielt. Nach 6-8 Passagen wurden spontan entdifferenzierte Zellen durch Behandlung mit HAT-Medium entfernt (Polokoff und Everson 1986). Aliquots konnten unter Zusatz von 0.1 ml DMSO zu 0.9 ml Zellsuspension bei -136°C oder in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Nach

schnellem Auftauen durch Erwärmen auf 37°C ließen sich die Zellen erneut anzüchten. DMSO wurde dann durch Mediumwechsel nach einem Tag aus der Kultur entfernt.

Für die Mikroinjektionsexperimente wurden die Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen auf Schalen mit einem Durchmesser von 3 cm ausplattiert. Sie wurden so lange in Kultur gehalten, bis sich ein annähernd konfluenter Monolayer gebildet hatte. Um das Auffinden und Wiedererkennen der Zellen zu erleichtern, wurde mit Hilfe eines Markierungskammes, bestehend aus fünf dünnen Stahlnadeln, ein Gitter in den Boden der Schale geritzt. Der Abstand zwischen den einzelnen Markierungslinien betrug etwa 100 µm. Vor der Mikroinjektion wurde der größte Anteil der Zellen mit einem kleinen Rubber Policeman unter mikroskopischer Kontrolle abgeschabt, so daß ein Rest von ungefähr 200-500 Zellen zur anschließenden Mikroinjektion in der Mitte der Schale übrigblieb. Die abgeschabten Zellen wurden durch Spülen mit Kulturmedium vom Schalenboden entfernt.

### **2.13 Toxine**

Die beiden Komponenten I und II von *Clostridium botulinum* C2-Toxin wurden nach Ohishi et al. (1980) präpariert und aktiviert. Die Endkonzentration der Komponente II (Bindungskomponente) betrug das zweifache der Konzentration von Komponente I (ADP-Ribosyltransferase) bei der Behandlung von intakten Zellen durch direkte Zugabe der Toxine in das Kulturmedium. Die Mikroinjektion wurde nur mit der katalytisch aktiven Komponente I des C2-Toxins durchgeführt. Lyophilisiertes Phalloidin wurde in H<sub>2</sub>O gelöst. Die verwendeten Toxinkonzentrationen werden bei der folgenden Darstellung der jeweiligen Experimente angegeben.

### **2.14 ADP-Ribosylierung von G-Aktin zur Mikroinjektion / Test des ADP-ribosylierten G-Aktins auf Toxinfreiheit**

Bei der ADP-Ribosylierung wird NAD in Nicotinamid und ADP-Ribose gespalten und die ADP-Ribose auf ein Zielprotein, im vorliegenden Fall das G-Aktin, übertragen. Globuläres α-Skelettmuskelaktin vom Kaninchen wurde nach der Methode von Spudich und Watt (1971) hergestellt und auf Eis aufbewahrt. Vor der ADP-Ribosylierung wurde G-Aktin über Nacht für 12 - 24 h bei 4°C gegen 2 x 1 Liter Puffer G (siehe Kapitel 3.2.1)

dialysiert. Die ADP-Ribosylierung wurde folgendermaßen durchgeführt: Als erstes erfolgte die Inkubation von 2 ml des G-Aktins (2mg/ml) auf Eis für 30 Minuten mit 10  $\mu$ l NAD (10 mM) und 5 $\mu$ l Clostridium perfringens Iota Toxin (200  $\mu$ g/ml), das als Enzym dient, welches die Reaktion katalysiert. Die Kühlung des Ansatzes war erforderlich, da es sonst zur Polymerisation des Aktins gekommen wäre. Die Reaktion wurde unter Zugabe von 40  $\mu$ l NAD (10 mM) für weitere 90 Minuten fortgesetzt.

Danach mußte das Iota Toxin aus dem Ansatz entfernt werden. Dies geschah durch zweimalige Inkubation des Reaktionsgemisches mit 200  $\mu$ l polyklonalem Anti-Iota-Toxin-IgG-Antikörper (Kaninchen), welcher an Cyanbromid aktivierte Sepharose 4b (Pharmacia, Freiburg, Germany) gebunden war. In zwei Schritten von jeweils 30 min wurde das Reaktionsgemisch mit jeweils 1 ml G-Puffer gewaschen. Die Gefäße wurden dabei in einem Überkopfschüttler gehalten und das Gemisch bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das ADP-ribosylierte G-Aktin durch Zentrifugation in einer Eppendorffzentrifuge (1 min bei 12000 Upm, Vorgang einmal wiederholen) von den übrigen Bestandteilen des Reaktionsgemisches getrennt und mittels Ultrafiltration sterilisiert. Darauf wurde die Lösung mit Hilfe eines Centricon®-30 Mikrokonzentrators auf 13 mg/ml konzentriert. Die Konzentration des ADP-ribosylierten G-Aktins wurde bestimmt durch Messung der optischen Dichte bei 290 nm unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{290} = 24,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Um sicher zu stellen, daß das ADP-ribosylierte Aktin kein Toxin mehr enthält, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Der Test auf Toxinfreiheit erfolgte durch [<sup>32</sup>P]-ADP-Ribosylierung. Das heißt das Phosphor des NAD wurde radioaktiv markiert. Sollte noch Toxin vorhanden sein, so würde dies als Katalysator dienen und mit dem unten angegebenen Muskelaktin reagieren. Zu 5  $\mu$ l des ADP-ribosylierten G-Aktins wurden 5  $\mu$ l Muskelaktin (100  $\mu$ g/ml), 2.5  $\mu$ l NAD (100  $\mu$ M) und 7.5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Der Ansatz wurde bei 37°C 30 min lang inkubiert. Nach Zugabe von 5  $\mu$ l Probenpuffer wurde der Ansatz gekocht, 10  $\mu$ l im SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographiert. Das ADP-ribosylierte G-Aktin wurde auf Eis aufbewahrt. In der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese erschien es als einzelne 43kDa-Bande. So wurde die Reinheit des Ansatzes überprüft, um sicher sein zu können, daß nur G-Aktin bei den folgenden Mikroinjektionsexperimenten verwendet würde. Wäre der Ansatz nicht toxinfrei gewesen, so hätte man im Autoradiogramm eine radioaktive Markierung der Aktinbande sehen müssen. Um einen Einfluß des G-Puffers oder eventuell verbliebener Reste des Toxins ausschließen zu können, wurde parallel zur Mikroinjektion des G-Aktins jeweils als

Kontrollansatz auch G-Aktin-freier Puffer G in die Zellen injiziert. Es erfolgten also jeweils zwei Ansätze, die immer parallel gleich behandelt wurden. Dies stellte eine zusätzliche Sicherheit für die Versuche dar.

### **2.15 Mikroinjektion von ADP-ribosyliertem G-Aktin in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen und [<sup>35</sup>S]-Methionin-Markierung der zellulären Proteine**

Die Mikroinjektion erfolgte nach der Methode von Müller et al. (1992). Kurz vor der Durchführung der Mikroinjektion wurde das Standardmedium aus den Kulturschalen entfernt und danach der auf 37°C temperierte HEPES-Puffer zugegeben, in welchem die Mikroinjektionen bei Raumtemperatur stattfanden.

Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen wurden in HEPES-gepuffertem Kulturmedium bei Raumtemperatur unter Verwendung folgender Geräte injiziert: Zeiss Axiovert 35 Mikroskop, Eppendorf Mikromanipulator 5170 und Mikroinjektor 5242. Die für die Injektion verwendeten Kapillaren hatten einen inneren Durchmesser von 0.5 µm. Sie wurden mit Hilfe eines Microloaders mit 3-4 µl der zu injizierenden Lösung gefüllt und dann in den Micromanipulator eingesetzt.

Der Haltedruck betrug 30 hPa, der Injektionsdruck 70 hPa und die Injektionsdauer 400 ms. Das Injektionsvolumen war etwa 50 fl, was 1% des Volumens der Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen ausmacht. Deren Zellvolumen entspricht etwa dem Volumen von Hepatozyten, welches von Wiener et al. (1968) mit ca. 5.000 µm<sup>3</sup> angegeben wird. Die Relation von injiziertem Volumen und Zellvolumen stimmt mit Angaben anderer Forschungsgruppen (Kreis 1986) überein. Aus diesen Beschreibungen geht hervor (Stacey und Allfrey 1976; Graessmann et al. 1980; Cleveland et al. 1983), daß man ein Volumen von bis zu 10% des initialen Zellvolumens injizieren kann, ohne daß die Zelle dabei einen wesentlichen Schaden erleidet. Die Konzentration des mikroinjizierten ADP-ribosylierten G-Aktins betrug 13 mg/ml. Diese Konzentration wurde gewählt, da sie den Gesamtaktin Gehalt der Zelle um etwa 10 % und den G-Aktin Gehalt um etwa 40 % anheben konnte. In Hepatozyten beträgt der Aktin Gehalt etwa 5-7 pg pro Zelle, wobei das G-Aktin 25 % des Gesamtaktin Gehaltes ausmacht (Snabes et al., 1981, Theodoropoulos et al., 1992). Dies kann man für die Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen ebenfalls annehmen.

Im Falle der Mikroinjektion von Phalloidin oder C2-Toxin in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen wurden wäßrige Toxin-Lösungen verwendet; für Phalloidin betrug die

Konzentration 1mg/ml und für die Komponente I des C2-Toxins 400 ng/ml. Nach der Mikroinjektion wurde der HEPES-Puffer von den Schalen gesaugt und die Zellen bei 37°C in Medium 199 für unterschiedlich lange Zeiten inkubiert, die bei der Darstellung der jeweiligen Ergebnisse (Kapitel 3.3) angegeben sind. Danach folgte zweimaliges Waschen der Zellen mit Methionin-freiem Medium (Serva, Heidelberg). Zur radioaktiven Markierung neusynthetisierter Proteine wurden auf jede 3 cm Schale 500 µl Methionin-freies Medium gegeben, welchem 2.5 mCi/ml [<sup>35</sup>S]-Methionin (> 1000 Ci/ml) zugesetzt wurde. Anschließend wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Darauf folgte das Absaugen des radioaktiven Mediums, zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS und das Einfrieren der Kulturschalen mit den Zellen bei - 20°C.

### **2.15.1 Vorbereitung der Zellen für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Für die Gel-Elektrophorese mußten die Proteine der injizierten Zellen und der nichtinjizierten Kontrollzellen aus derselben Schale gewonnen werden, ohne daß sich die Bestandteile von injizierten und nichtinjizierten Zellen vermischten. Dazu wurde auf die gefrorenen Zellen 10 µl Probenpuffer nach Laemmli (Laemmli 1970) aufgetragen. Mit einer Pipette wurden während des Schmelzvorgangs vorsichtig die Zellbestandteile der injizierten und nichtinjizierten Zellen getrennt voneinander aufgenommen. Um deren komplette Aufnahme vom Schalenboden zu gewährleisten war eine fünfmalige Wiederholung dieser Prozedur erforderlich. Vor der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben 5 min lang gekocht und anschließend 3 min bei 10 000 g zentrifugiert. Danach wurden Aliquots von 3 µl in je 3 ml Szintillator für wässrige Proben aufgenommen und ihre Radioaktivität in einem β-Counter gemessen. Die Proben wurden bei der SDS-Gelelektrophorese dann so aufgetragen, daß die der mikroinjizierten Zellen und die der dazugehörigen Kontrollzellen vergleichbare Mengen an Radioaktivität aufwiesen.

### **2.15.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese**

Die Auftrennung der radioaktiv markierten Proteine durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach Laemmli (1970) mit 11 %igen Gelen erfolgte mit einer vorgegebenen Stromstärke von 30-35 mA über eine Dauer von etwa 3 h. Anschließend wurden die Gele

mit Coomassie Blue für 20 min gefärbt und danach in Methanol/Eisessig entfärbt, wobei unspezifisch gebundene Radioaktivität herausgewaschen wurde. Nach Trocknung wurden sie auf einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR Film) je nach vorher gemessener Radioaktivität zwischen 12 und 72 h exponiert.

## **2.16 Immunpräzipitation von G-Aktin aus mikroinjizierten Zellen**

Für die Immunpräzipitation von Aktin aus Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen wurden ungefähr 5000 Zellen mit ADP-ribosyliertem G-Aktin mikroinjiziert. Anschließend wurden die zellulären Proteine nach der oben beschriebenen Vorgehensweise in 100 µl Immunpräzipitationspuffer aufgenommen. Nach Homogenisierung der Proben wurden die Lysate 1 h bei 100 000 x g zentrifugiert und das Aktin der Überstand-Fractionen immunpräzipitiert. Dies wurde folgendermaßen durchgeführt:

Das Aktin der Überstand-Fractionen wurde mit 1 µl Anti-Aktin-Antikörper (ICN) versetzt und für 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurden 30 µl Proteins den G-Sepharose-Kügelchen (Sigma) hinzugefügt, welche vorher zweimal in Lösung A gewaschen wurden. Nach einer weiteren Inkubation von 1 h bei 4°C auf einem Rollmischer erfolgte die Abtrennung der Kügelchen durch 3minütige Zentrifugation bei 10,000 g und Waschen des Aktinansatzes, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Zunächst wurde nur mit Lösung A gewaschen. Danach mit Lösung A und Zusatz von 1 % igem Triton X-100, anschließend mit Lösung A, die 0,5 M NaCl enthielt, und zum Abschluß wieder mit purer Lösung A. Danach wurden die Kügelchen mit 50 µl Laemmli Probenpuffer, der 3% SDS enthielt, gemischt, 10 min lang gekocht und danach 3 min bei 10,000 g zentrifugiert. Hierdurch wurde Aktin frei und konnte im SDS-Page aufgetrennt werden.

Die nach der Zentrifugation entstandenen Pellets wurden einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (10%) unterzogen, und das neusynthetisierte Aktin konnte autoradiographisch sichtbar gemacht werden durch Auflage des getrockneten Gels auf einen BAS IIIs Detektor (Fuji Photo, Japan). Die Quantifizierung gelang durch scannen des 43 kDa-Proteins Aktin mit Hilfe eines Epson GT 6000 Scanners und dem Gel-Image Programm von Pharmacia (Freiburg) unter Benutzung der TINA Bild-Software (Raytest, Straubenhardt).

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Aktinfilamenten**

##### **3.1.1 FITC-Phalloidin Färbung**

Zur Darstellung von Aktinfilamenten wurde die spezifische Bindung von Phalloidin an F-Aktin ausgenutzt. Durch Verwendung von FITC-markiertem Phalloidin konnten auf diese Weise die Aktinfilamente sichtbar gemacht werden. Im weiteren Verlauf der Experimente konnten so die Auswirkungen von C2-Toxin und Phalloidin auf das Aktinzytoskelett mikroskopisch demonstriert werden. Bei den Untersuchungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, sollte zunächst das am besten geeignete Zellsystem und die beste Methode zur Darstellung der Aktinfilamente ermittelt werden, um dann weitere Versuche zur Regulation der Aktinsynthese durchführen zu können. Im folgenden werden die Experimente dargestellt, die zum Erreichen des obengenannten Zieles nötig waren.

##### **3.1.2 Abhängigkeit der Aktin-Darstellung von der FITC-Phalloidin-Konzentration**

Bei der Austestung der benötigten FITC-Phalloidin-Konzentration kam es im ersten Experiment mit primären Hepatozyten nur zu unbefriedigenden Ergebnissen. Die auf Deckgläschen befindlichen Zellen wurden hierbei in Mowiol eingebettet, dessen Aushärtung bei Raumtemperatur erreicht werden konnte. Die Aktinfilamente ließen sich in entsprechend vorbehandelten Hepatozyten allerdings nicht spezifisch anfärben. Die Zellen erschienen gleichmäßig grün; nur die Zellmembranen zeigten eine etwas stärkere Fluoreszenz. Als Ursachen für diese Ergebnisse kamen folgende Möglichkeiten in Betracht: 1. Die Behandlung der Zellen mit Aceton und Fixierung mit Formaldehyd bzw. Triton X-100 hatte nicht dazu ausgereicht, die Membranen für FITC-Phalloidin zu permeabilisieren. Hiergegen spricht, daß die Hepatozyten über einen Gallensäuretransporter einen spezifischen Aufnahmemechanismus für Phalloidin besitzen und normalerweise durch diese Markierung Aktinfilamente gut dargestellt werden können (Frimmer und Petzinger 1977). 2. Das Spülen mit PBS war nicht ausreichend effektiv, so daß noch ungebundenes FITC-Phalloidin in den Zellen verblieb. 3. Die Konzentrationen von FITC-Phalloidin waren zu hoch, so daß es zu unspezifischen Bindungen von

Fluoreszenzfarbstoff in den Zellen kam. 4. Die Hepatozyten zeigten eine Autofluoreszenz, die die Fluoreszenz von FITC-Phalloidin überlagerte.

Um zu besseren Resultaten zu kommen, mußten in folgenden Experimenten diese möglichen Fehlerquellen untersucht und gegebenenfalls ausgeschlossen werden.

### **3.1.3 Exponieren der Hepatozyten mit FITC-Phalloidin**

Zunächst wurde untersucht, ob Hepatozyten eine ausreichende Permeabilität für FITC-Phalloidin in der verwendeten Konzentration aufwiesen. Bei der Inkubation der Hepatozyten mit FITC-Phalloidin ohne Vorbehandlung zeigte sich bei einer Konzentration von 10 µg/ml lichtmikroskopisch eine deutliche Bildung von Ausstülpungen der Zelloberfläche (Blebs). Watanabe und Phillips (1986) hatten nachgewiesen, daß sich an der Basis dieser Blebs eine Anhäufung von Aktinfilamenten befindet. Dies konnte in den vorliegenden Experimenten bestätigt werden, da die Zellmembran und die filamentären Strukturen in den Zellen eine hellere Fluoreszenz aufwiesen als das Zytoplasma. Bei einer Konzentration von 3 µg/ml zeigten sich demgegenüber nur wenige Blebs und die strukturellen Anfärbungen waren schwächer als bei der erstgenannten Konzentration. Dies nahm noch weiter ab bei der Konzentration von 1 µg/ml, bei der sich nur noch eine schwache und diffuse Anfärbung der Zellen zeigte. Die schwache Darstellung von Aktinfilamenten in Aceton-fixierten Zellen war offensichtlich nicht ausschließlich durch eine ungenügende Permeabilität der Hepatozyten für FITC-Phalloidin erklärbar, da sich bereits ohne Vorbehandlung Strukturen in den Zellen anfärbten. Darüber hinaus zeigten Kontrollzellen, welche keiner FITC-Färbung ausgesetzt waren, keine Eigenfluoreszenz.

Im weiteren Verlauf des Experimentes folgten leichte Abänderungen des unter 2.11.1 beschriebenen Protokolls mit Acetonfixierung. Auch eine Permeabilisierung durch Erhöhung der Triton X-100 Konzentration auf 1 % bzw. mit Hilfe von Digitonin 1mg/ml in PBS führte nicht zu einer befriedigenden Darstellung der Aktinfilamente in Hepatozyten. Daher wurde nach anderen Fixations- und Permeabilisierungsverfahren gesucht.

### 3.1.4 Verschiedene Verfahren zur Darstellung von Aktinfilamenten in Hepatozyten

Unter Verwendung der Methode von Sakisaka et al. (1988) (siehe 2.11.3) stellten sich die Aktinfilamente weder in Hepatozyten noch in FAO-Hepatomazellen dar. Es kam zur Anfärbung der Nuclei und vor allem der Nucleoli; ebenso war das Zytoplasma mit seinen Zellausläufern schwach zu erkennen. Die Tatsache, daß sich der Nucleus und Nucleolus so gut darstellten, beruht darauf, daß dort ebenfalls Aktin vorhanden ist. Hierauf wurde bereits durch Bachs et al. (1995) und Reuner et al. (1990) hingewiesen. In den genannten Arbeiten wurde festgestellt, daß Aktin in der Kernmatrix, der Kernhülle, dem Nucleolus und den Kernporen der Hepatozyten nachweisbar ist.

Die Darstellung von Aktinfilamenten nach dem Protokoll von Grolig (1990) führte zu einer diffusen Fluoreszenz der Zellen und Zellkerne bei den FAO-Hepatomazellen. Die Hepatozyten zeigten dagegen eine verstärkte Fluoreszenz der Zell-Zell-Kontakte und der Gallekanälchen bzw. sogenannter Hemicanaliculi, die dadurch entstehen, daß die in Kultur befindlichen Hepatozyten die Möglichkeit, komplette Gallekanälchen zu bilden, verlieren, da sie aus dem Gewebsverband herausgelöst sind. Bereits Nickola und Frimmer (1986) zeigten, daß es bei frisch isolierten Hepatozyten zur Darstellung der Hemicanaliculi des Gallengangssystems mittels FITC-Phalloidin kommt. Hier befindet sich besonders viel F-Aktin.

Die Tatsache, daß sich bei allen Markierungsverfahren in den Hepatozyten die Aktinfilamente nicht gut abgrenzen ließen, beruht darauf, daß sich die Filamente noch nicht organisiert hatten. Mit fortschreitendem Alter der Hepatozyten in Kultur, zeigte sich eine zunehmende Darstellbarkeit des filamentären Aktins.

Bei der Methode nach Watanabe et al. (1991) ergab sich in 48 h alten Hepatozyten eine diffuse Anfärbung des Zytoplasmas; ferner waren die Aktinfilamente abgrenzbar. Die Nucleoli stellten sich deutlicher dar als der Nucleus, allerdings nur bei der Konzentration des FITC-Phalloidins von 100 µg/ml. Bei den niedrigeren Konzentrationen zeigte sich unter Verwendung dieser Darstellungsmethode eine schwache Fluoreszenz ohne Darstellung von Strukturen der Zellen. Somit ist also bei dieser Technik eine erhebliche Konzentrationshöhe des FITC-Phalloidins nötig, um die Filamente adäquat darzustellen.

### **3.1.5 Darstellung des Zytoskeletts bei Hepatozyten und Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen durch FITC-Phalloidin**

Neben den oben beschriebenen Verfahren zur Färbung mit FITC-Phalloidin wurde weiterhin die Darstellung der Aktinfilamente nach der Methode von Hooser et al. (1991) eingesetzt, die zu deutlich besseren Ergebnissen der F-Aktin-Darstellung führte. Weiterhin wurde die Darstellung auch in anderen Zellsystemen untersucht, da zu Anfang noch nicht klar war welche Zellen für die geplanten Mikroinjektionsversuche geeignet sein würden. Hierbei wurden Aktinfilamente in Hepatozyten, Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen, FAO-Hepatomazellen und Endothelzellen dargestellt.

Da Hepatozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop keine Eigenfluoreszenz zeigten, konnte man sicher sein, daß die sich nach FITC-Phalloidin-Einwirkung einstellende Färbung durch die spezifische Bindung von FITC-Phalloidin an Aktin zustande gekommen war. Es wurden wiederum verschiedene Konzentrationen und deren unterschiedliche Wirksamkeit in bezug auf die Anfärbung der Aktinfilamente untersucht. Die verwendeten Konzentrationen reichten von 1.0 µg/ml bis 100 µg/ml FITC-Phalloidin in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Bei den Konzentrationen bis 10 µg/ml erkannte man nur ein diffuses Fluoreszenzsignal der Zellen, hingegen bei Konzentrationen von 15 - 30 µg/ml eine deutliche Darstellung der Nuclei sowie Nucleoli und des Zytoplasmas mit darin befindlichen filamentären Strukturen.

Es wurde schließlich eine Konzentration von 15 µg/ml FITC-Phalloidin für weitere Experimente gewählt, da diese eine befriedigende Fluoreszenz unter dem Mikroskop hervorrief. Die Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen stellten sich als runde bis polygonale Zellen dar, welche eine diffuse Anfärbung mit einer verstärkten Fluoreszenz der Zellmembran und filamentären Strukturen zeigten.

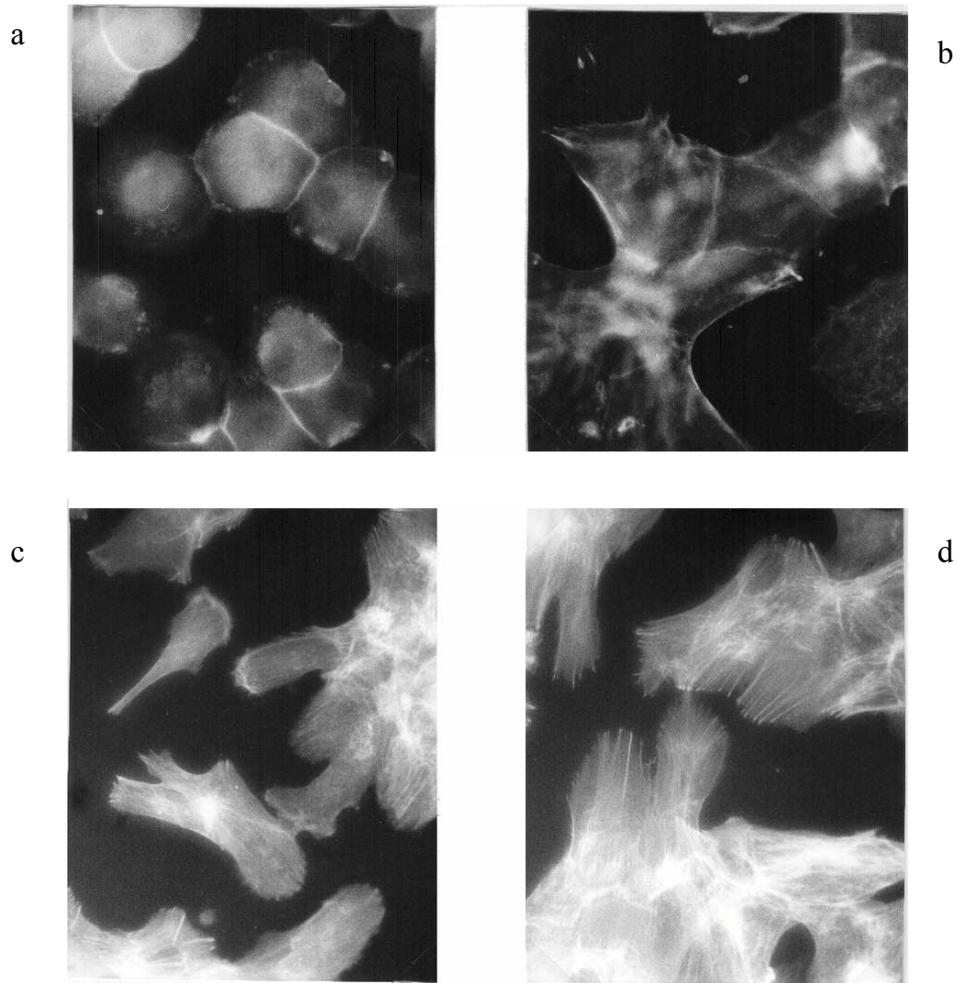
### **3.2 Effekte von C2-Toxin und Phalloidin auf das Zytoskelett von Hepatozyten, FAO-Hepatomazellen, Endothelzellen und Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen**

Nach Darstellung des Aktinzytoskeletts in unbehandelten Hepatozyten, FAO-Hepatomazellen und Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen ging es in den folgenden Experimenten um die Untersuchung der Auswirkung von C2-Toxin und Phalloidin auf das

Zytoskelett der verschiedenen Zellen. Aufgrund der Kenntnis, daß C2-Toxin das G-Aktin-/F-Aktin-Verhältnis erhöht und somit das monomere G-Aktin in der Zelle zunimmt, war eine Abnahme der Aktinfilamente zu erwarten. Umgekehrt sollte es unter Gabe von Phalloidin, welches eine Abnahme des G-Aktins bewirkt, zu einer Zunahme der Aktinfilamente kommen. Die zu erwartenden Veränderungen wurden an verschiedenen Zellen untersucht. Hierfür wurde zunächst ausgetestet in welchem Kulturstadium sich die Aktinfilamente in Hepatozyten am besten darstellen, um so die optimale Ausgangssituation für die Untersuchung der Auswirkungen von C2-Toxin und Phalloidin zu haben.

### **3.2.1 Veränderungen des Aktinzytoskeletts während der Primärkultur von Hepatozyten**

Während der ersten 1-3 h nach Aussaat verloren die Zellen ihre normale sphärische Form und hafteten unter allmählicher Abflachung auf dem Boden der Zellkulturschale an. Lichtmikroskopisch zeigten sich abgesehen von der scheinbaren Vergrößerung der Zellen keine Veränderungen im Vergleich zu den Hepatozyten zum Zeitpunkt 0. Die fluoreszenzmikroskopische Anfärbung von Aktin war diffus und zeigte eine Verstärkung entlang der Zellmembran, da sich hier besonders viele Aktinfilamente, vor allem im Bereich der Gallekanälchen befinden (Oda et al. 1974, French und Davies 1975). Nach 6 h waren die Zellmembranen nicht mehr so deutlich abzugrenzen. Nach 24 h hatten die Zellen Ausläufer entwickelt (Abb.1), und es kam zu einer leichten Filamentdarstellung mit der FITC-Phalloidin-Färbung. Die Filamentdarstellung nahm bis zu einer Kulturzeit von 72 h zu. Diese Zunahme der sogenannten Streßfilamente korreliert nach Reuner et al. (1996) mit dem Anstieg von F-Aktin in der Zeit zwischen 6 und 24 h Kultur. Der Anstieg des filamentären Aktins ist auf die Polymerisation von neusynthetisiertem G-Aktin zurückzuführen. Dies wurde in Vorexperimenten zur vorliegenden Arbeit durch Reuner et al. (1996) durch Inkorporation von [<sup>35</sup>S]-Methionin in Triton X-100 nichtlöslichem F-Aktin bewiesen. Innerhalb von 24 h steigt die Menge des neusynthetisierten F-Aktins im Vergleich zu frisch präparierten Hepatozyten auf 195% der Ausgangsmenge an (unveröffentlichte Ergebnisse).

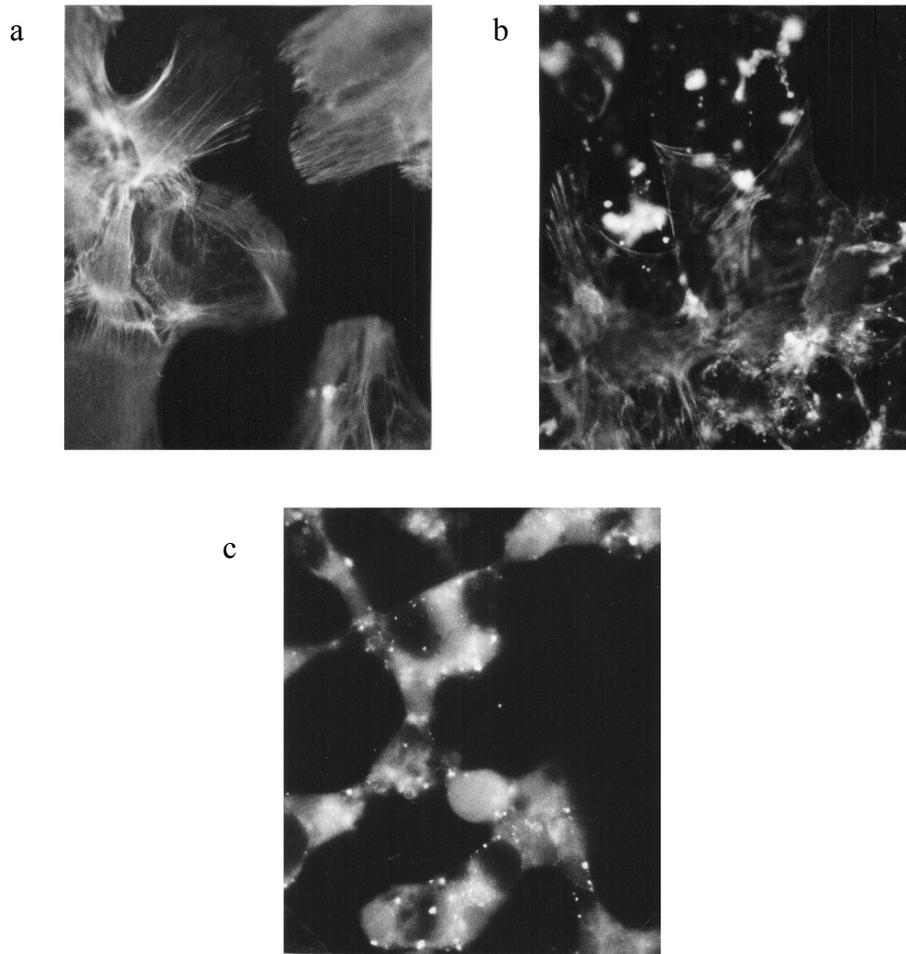


**Abb. 1 : FITC-Phalloidin-Färbung von primären Hepatozyten**

Die Zellen wurden isoliert, in Kultur gehalten und mit FITC-Phalloidin gefärbt, wie im Kapitel Methoden beschrieben. Die Abbildung zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen nach 3 h (a), nach 24 h ( b ), nach 48 h (c) und 72 h nach Aussaat (d). 1 cm = 3,9  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Veränderungen des Aktinzytoskeletts in Hepatozyten unter C2-Toxin und Phalloidin

Für diese Untersuchungen wurden 48 h alte Hepatozyten verwendet, da sich in diesem Stadium das Aktinzytoskelett mit FITC-Phalloidin am besten darstellte. Nach der Behandlung der Zellen mit C2-Toxin von *Clostridium botulinum* (Konzentration siehe Abb.2) kam es bereits nach 1 h zum Verschwinden der Streßfilamente. Im weiteren Verlauf bildeten sich Fluoreszenzspots im Zytoplasma (Abb.2) Diese waren deutlich größer als die Aktinplaques an den Zell-Zell-Kontakten. Nach 6 h waren die Zellen deutlich abgerundet, und die FITC-Phalloidin-Färbung war nur noch diffus über die ganzen Hepatozyten verteilt. Innerhalb der folgenden 24 h traten unter C2-Toxin keine weiteren Veränderungen auf. Im Gegensatz zu den Auswirkungen des C2-Toxins auf das Aktinzytoskelett kam es durch Inkubation der Hepatozyten mit Phalloidin (Konzentration siehe Abb. 2) bereits nach 3 h zu einer Aggregation der Aktinfilamente. Lichtmikroskopisch zeigte sich dies in Blebs. Unter FITC-Phalloidin-Färbung waren im Bereich des gesamten Zytoplasmas versprengte Fluoreszenzspots zu finden (Abb.2), welche aggregiertes Aktin darstellten. Dieser Effekt hielt bis zu 24 h an. Danach bildeten sich die Blebs bzw. Fluoreszenzspots wieder zurück. Die größeren Fluoreszenzflecke auf den Aufnahmen stellen Hintergrundartefakte bzw. zugrunde gegangene Zellen dar. Eine ähnliche Art von Zellausstülpungen, die mit den hier aufgetretenen Blebs zu vergleichen ist, entstand auch durch Cytochalasin D. Im Unterschied zu den Versuchen mit Phalloidin war an der Basis dieser Membranausstülpungen jedoch keine Akkumulation von Aktinmikrofilamenten zu sehen. (Prentki et al. 1997).

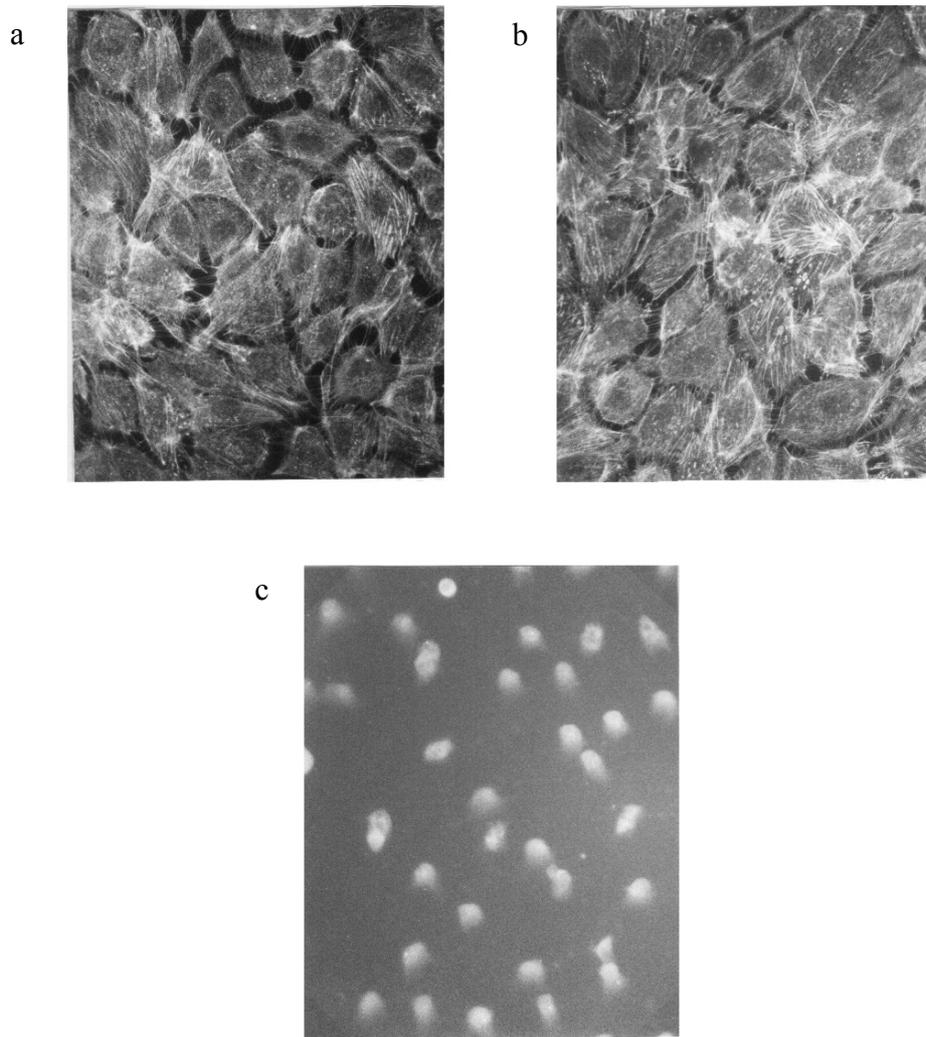


**Abb. 2: FITC-Phalloidinfärbung (15 µg/ml) von 48 h alten Hepatozyten unter Behandlung mit C2-Toxin und Phalloidin.**

Die Hepatozyten wurden vor der Toxinbehandlung für 48 h in Kultur gehalten (a). Anschließend wurden die Zellen für 8 h mit Phalloidin [ 10 µg/ml (b) ] bzw. C2-Toxin [ C2 I 200 ng/ml und C2 II 400 ng / ml (c) ] inkubiert. 1 cm = 3,9 µm.

### **3.2.3 Veränderungen des Aktinzytoskeletts in FAO-Hepatomazellen unter C2-Toxin und Phalloidin**

Ähnlich wie bei den Hepatozyten erfolgte bei den FAO-Hepatomazellen (48 h alt) eine Inkubation mit C2-Toxin und Phalloidin über einen Zeitraum von 6 Stunden. Unter der Inkubation zeigten die mit C2-Toxin behandelten Zellen lichtmikroskopisch eine starke Abrundung. Die mit Clostridium Toxin behandelten Zellen wiesen in Gegenwart von FITC-Phalloidin eine diffuse Fluoreszenz auf, und es ließen sich nach 6 h keine Filamente abgrenzen. (Abb.3) An den mit Phalloidin-behandelten Zellen waren im Vergleich zu unbehandelten Zellen lichtmikroskopisch keine Unterschiede festzustellen. Nach Zugabe von FITC-Phalloidin sah man jedoch, hauptsächlich am Zellrand, in den Phalloidin-behandelten Zellen im Vergleich zu den nichtbehandelten eine verstärkte Anfärbung der Aktin-Filamente.



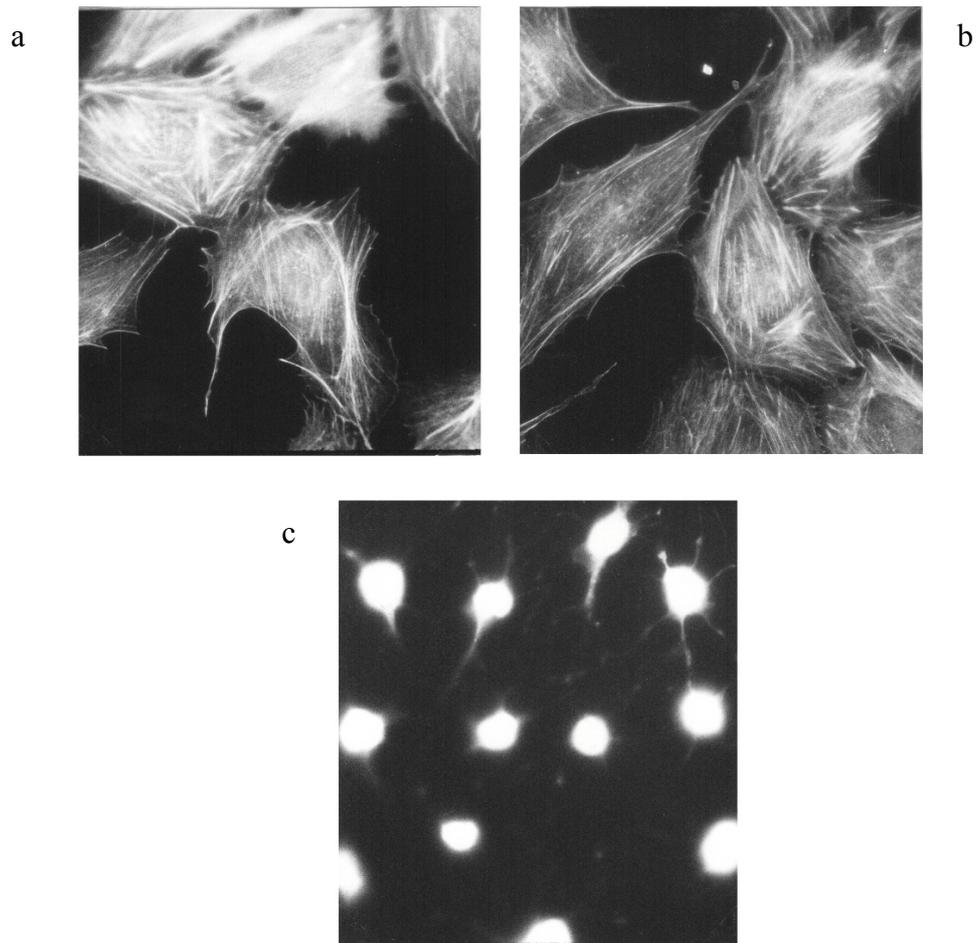
**Abb. 3: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von FAO-Hepatomazellen unter Behandlung mit C2-Toxin und Phalloidin**

Die FAO-Hepatomazellen wurden vor Toxinbehandlung 48 h in Kultur gehalten (a). Anschließend für 6 h mit Phalloidin ( 10  $\mu\text{g/ml}$ ) (b) und C2-Toxin ( Komponente I 200ng/nl, Komponente II 400 ng/ml) (c) inkubiert.

### 3.2.4 Veränderung des Aktinzytoskeletts in Endothelzellen unter C2-Toxin und Phalloidin

Bei der Exposition von Endothelzellen mit *Clostridium botulinum* C2-Toxin wurden leicht veränderte Konzentrationen der einzelnen Komponenten verwendet, C2 I in einer Konzentration von 250 ng/ml und C2 II in einer von 500 ng /ml. Die Phalloidinkonzentration von 10 µg/ml wurde beibehalten. Auch hier entsprachen die Veränderungen im Bereich der Aktinfilamentstruktur den vorhergehenden Ergebnissen der anderen Zelllinien. Nach Clostridium-Toxin-Einwirkung kam es zu einer starken Abrundung und schwachen homogenen Anfärbung der Zellen. Die Endothelzellen wirkten nach Einfluß von C2-Toxin wie „zusammengeschnürt“ und man konnte an den verbliebenen feinen Zellausläufern noch ihre vorherige Struktur erahnen (siehe Abb. 4) In Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe konnte für Endothelzellen gezeigt werden, daß diese unter dem Einfluß von C2-Toxin geschädigt werden und sich nach Inkubationszeiten von 12 h vom Schalenboden ablösen.

Nach Phalloidin-Einwirkung zeigte sich ein feines Filamentgeflecht, welches die Zellen durchzog und umspannte. Außerdem sah man, ähnlich wie bei den Kontrollzellen, Zellausläufer, die den Kontakt zu Nachbarzellen herstellten (Abb.4). Die Zellen waren von ihrer Struktur her mit den Kontrollzellen vergleichbar.

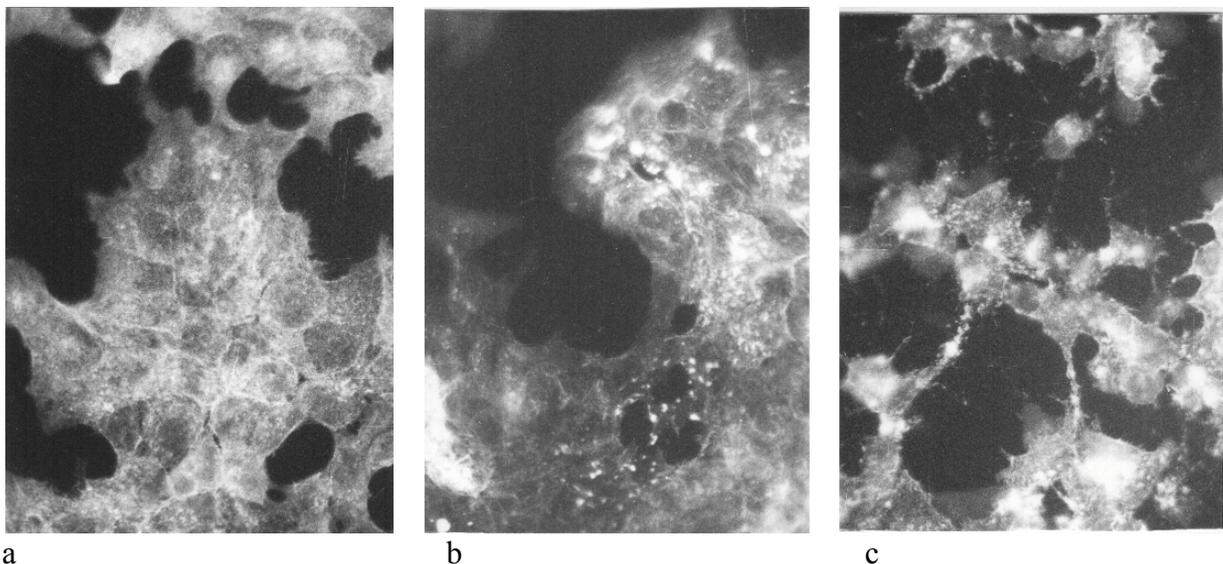


**Abb. 4 : Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Endothelzellen nach FITC-Phalloidin-Färbung unter Behandlung mit C2-Toxin und Phalloidin**

Die Endothelzellen (a) wurden jeweils 5 h lang mit den oben angegebenen Toxinkonzentrationen von Phalloidin (b) und C2-Toxin (c) inkubiert  $1 \text{ cm} = 3,9 \mu\text{m}$ .

### 3.2.5 Veränderungen des Aktinzytoskeletts in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen unter C2-Toxin und Phalloidin

Bei den Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen war nach Einwirkung von Clostridium-Toxin in den in der Abbildung 5 genannten Konzentrationen lichtmikroskopisch ebenfalls eine Abrundung der Zellen festzustellen; im Fluoreszenzmikroskop zeigte sich eine diffuse Anfärbung mit teilweise etwas verstärkter Darstellung der Zellmembranen. Nach Inkubation mit Phalloidin entstanden keine Ausstülpungen der Zelloberfläche wie bei den primären Hepatozyten, die Zellen ähnelten vielmehr den Kontrollzellen. Fluoreszenzmikroskopisch sah man jedoch deutliche Unterschiede. Die mit Phalloidin behandelten Zellen zeigten eine grobkörnige, über die gesamte Zelle verteilte Fluoreszenzanhäufung. Diese Fluoreszenzspots entsprachen stark stabilisierten Aktinfilamenten, die sich an diesen Stellen zusammenlagerten. Bei den Kontrollzellen fand sich hingegen eine diffuse Anfärbung mit verstärkter Fluoreszenz der Zellmembran (Abb.5).



**Abb. 5 : Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen unter Behandlung mit C2-Toxin und Phalloidin**

Die Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen (a) wurden für jeweils 12 h mit Phalloidin (10 µg/ml) (b) und C2-Toxin (C2 I 250 ng/ml , C2 II 500 ng/ml (c) ) inkubiert.

Faßt man die Ergebnisse der einzelnen Experimente mit den verschiedenen Zellarten zusammen, so wird deutlich, daß sich an Hepatozyten die Darstellung der Toxineinflüsse durch die etablierte FITC-Phalloidin-Färbung am besten dokumentieren ließ. Die verschiedenen Zellarten wiesen zwar ähnliche Veränderungen ihres Zytoskeletts auf, doch so prägnante Darstellungen der Aktin-Stress-Filamente, wie sie die 48 h alten Hepatozyten zeigten, waren bei den anderen Zellen nicht zu beobachten.

Da die primären Hepatozyten nicht mikroinjektionsstabil sind, wurde bei den fortführenden Experimenten auf die nächst verwandten Zellen, nämlich die Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen zurückgegriffen. Diese stellten sich als die günstigste Zelllinie dar, um die verschiedenen Auswirkungen von C2-Toxin und Phalloidin auf die Aktinfilamente zu untersuchen. Dies sollte bei den weiteren Experimenten genutzt werden.

### **3.3 Mikroinjektion von Toxinen in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen**

Zunächst sollte geprüft werden, ob die Mikroinjektion von C2-Toxin und Phalloidin in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen die gleiche Wirkung hat wie die Inkubation von Zellen mit den beiden Toxinen in Kulturmedium. Im weiteren war letztendlich die entscheidende Frage zu klären, ob monomeres G-Aktin der Regulator der Aktinsynthese ist.

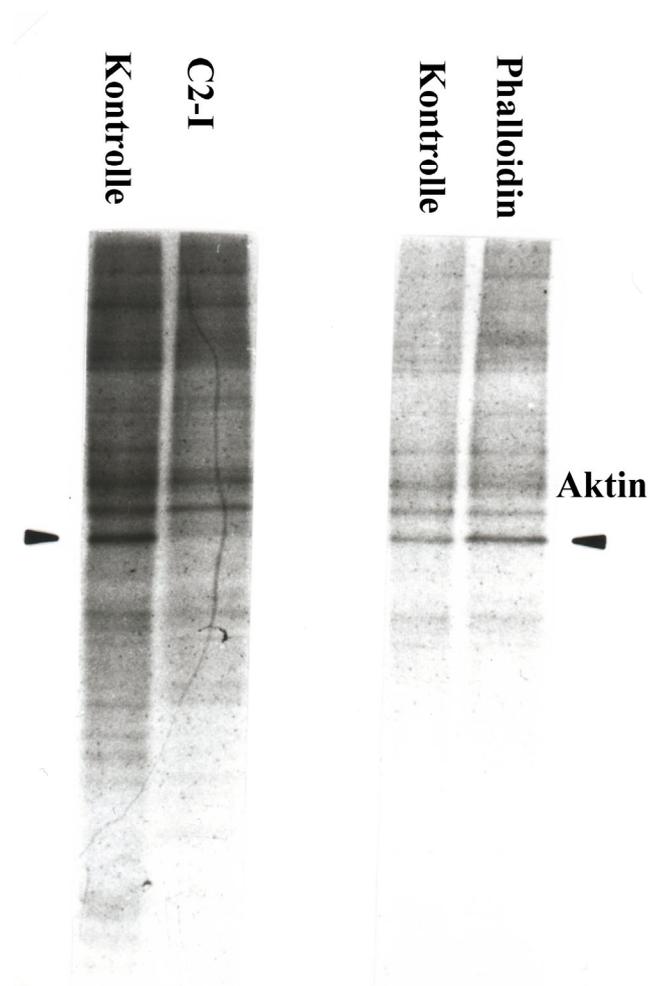
Die Mikroinjektion der G-Aktin ADP-ribosylierenden Komponente I von C2-Toxin in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen führte zu einer Abnahme der Aktinsynthese (Abb. 6) ähnlich der Verminderung, die beobachtet wurde, wenn beide Toxinkomponenten in das Kulturmedium der Zellen gegeben wurden (Abb.7). Dies zeigte sich in der schwächeren Intensität der 43 kDa-Bande auf den Autoradiographiefilmen, die durch Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin markiertem Aktin entsprach. Ein entgegengesetzter Effekt konnte nach Injektion von Phalloidin (Abb. 6) beobachtet werden, vergleichbar mit den Experimenten, in denen Phalloidin dem Medium von Hepatozyten-Zellkulturen zugesetzt war (Abb. 7).

### 3.4 Mikroinjektion von ADP-ribosyliertem Aktin in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen

Da in Vorversuchen der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, daß gereinigtes G-Aktin spontan polymerisiert und aufgrunddessen die Mikroinjektionsnadel verstopft, wurde zur Mikroinjektion anstelle von G-Aktin nicht polymerisationsfähiges ADP-ribosyliertes G-Aktin verwendet. Hierzu wurde das Kaninchen-Muskel-G-Aktin mit Hilfe von *Clostridium perfringens* Iota Toxin ADP-ribosyliert um die spontane Polymerisation von G-Aktin zu verhindern. In Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen führte die Mikroinjektion von ADP-ribosyliertem G-Aktin zu einem drastischen Abfall des neusynthetisierten Aktins, ohne daß dabei bemerkenswerte Veränderungen an anderen Zellproteinen festgestellt werden konnten. Die Proteinbanden, die auf den Autoradiographiefilmen nach Auftrennung der Zellen durch die SDS-Polacrylamidgel-Elektrophorese zu sehen waren, zeigten nur Veränderungen im Bereich der 43 kDa-Bande, die dem G-Aktin entspricht. Dieser Rückgang der Aktinsynthese begann bereits nach 1 h und dauerte wenigstens 19 h an (Abb.8). Im Gegensatz dazu beeinflusste die Mikroinjektion von ADP-Ribosylierungspuffer ohne G-Aktin bei im übrigen gleicher Vorbehandlung mit Iota Toxin, die Aktinsynthese nicht. Dies deutet darauf hin, daß der Effekt der Injektion dem ADP-ribosylierten G-Aktin zugeschrieben werden kann (Abb.8).

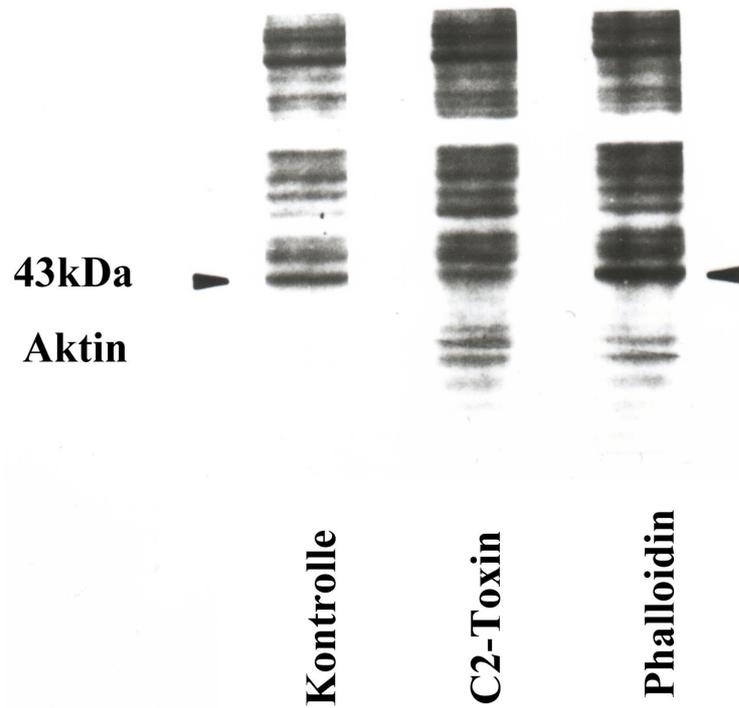
Um zu zeigen, daß es sich bei der 43 kDa-Bande auf den Autoradiogrammen nach Injektion von ADP-ribosyliertem G-Aktin wirklich um neu synthetisiertes Aktin handelte, wurde eine Immunpräzipitation von Aktin aus mikroinjizierten Zellen nach vorangegangener [<sup>35</sup>S]-Methioninmarkierung durchgeführt. Die mit ADP-ribosyliertem G-Aktin injizierten Zellen zeigten eine Verminderung der Aktinsynthese um ungefähr 65% im Vergleich zu Zellen, die mit ADP-Ribosylierungspuffer injiziert wurden und keine Abnahme der Aktinsynthese zeigten (Abb.9). Die Mikroinjektion von ADP-ribosyliertem G-Aktin in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen rief eine Abrundung der Zellen hervor (Abb. 10). Das Verhältnis von monomerem zu filamentärem Aktin wurde durch die Injektion mit dem ADP-ribosylierten G-Aktin erhöht, das als Capping-Protein wirkt und somit das Wachstum der F-Aktinfilamente hemmt. Dieses Capping-Protein bindet an das stumpfe Ende von Aktinfilamenten an, und verhindert so die weitere Polymerisation von Aktinmonomeren. Eine Depolymerisation am spitzen Ende des Aktinfilaments ist demgegenüber weiterhin möglich. Dies wird deutlich in der diffusen Anfärbung der Zellen nach Injektion mit ADP-ribosyliertem G-Aktin und der nachfolgenden Exposition mit

FITC-Phalloidin (Abb.10). Um auszuschließen, daß die gezeigten Effekte hauptsächlich auf der Verminderung von Aktinfilamenten als auf dem Anstieg der freien Aktinmonomere im Zytosol beruhen, wurden Zellen 18 h lang mit Phalloidin vorinkubiert, um die Aktinfilamente zu stabilisieren (Cooper 1987). Danach wurde die Mikroinjektion mit ADP-ribosyliertem G-Aktin wie bei den anderen Experimenten durchgeführt. Auch unter diesen Bedingungen verringerte sich die Aktinsynthese (Abb.11). Jedoch war die Abnahme der Aktinsynthese nach Injektion von ADP-ribosyliertem G-Aktin ohne Vorinkubation mit Phalloidin deutlich stärker (Abb. 11). Dies ist möglicherweise durch folgende additive Effekte zu erklären: 1. durch die Zunahme der freien Aktinmonomere im Zytosol der Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen und der daraus resultierenden autoregulatorischen Unterdrückung der Aktinsynthese und 2. durch das „Capping“ der Aktinfilamente mit Hilfe des ADP-ribosylierten G-Aktins.



**Abb. 6: Einfluß von mikroinjiziertem C2-Toxin und Phalloidin auf die Proteinsynthese in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen**

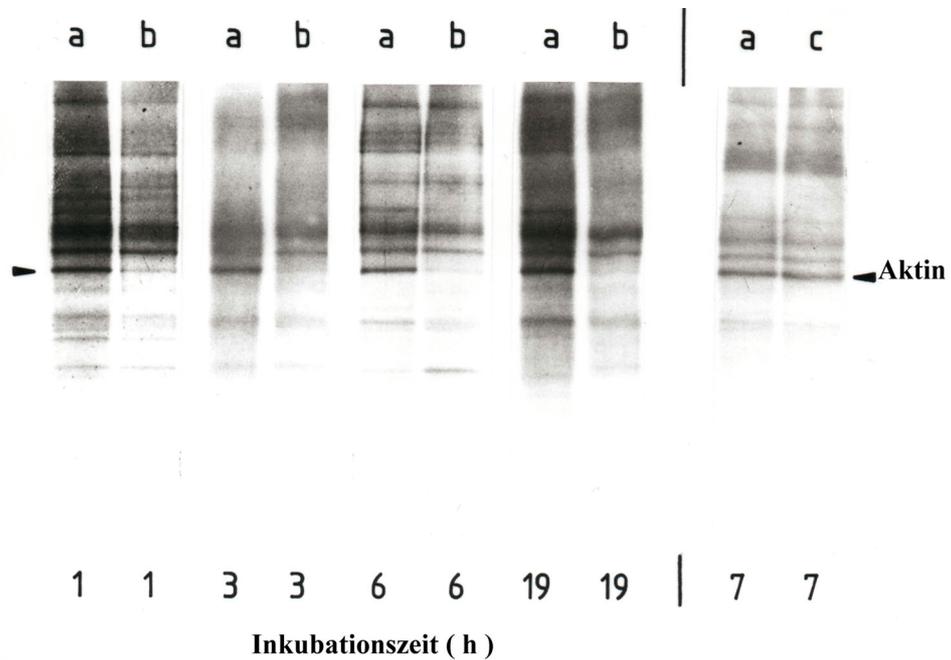
Es wurden ungefähr 500 Zellen mit der Komponente I von C2-Toxin (C2 I 400 ng/ml) und 500 Zellen mit Phalloidin (1 mg/ml) injiziert. Die Zellen wurden danach für 10 h inkubiert und anschließend mit [<sup>35</sup>S] Methionin radioaktiv markiert. Die Lysate wurden, wie im Kapitel Methoden beschrieben, mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Abbildung zeigt ein typisches Autoradiogramm.



**Abb. 7 : Einfluß von C2-Toxin und Phalloidin im Kulturmedium auf die Proteinsynthese von Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen**

Die beiden Toxine wurden direkt in das Kulturmedium gegeben, die Zellen für 10 h inkubiert und anschließend mit [<sup>35</sup>S] Methionin markiert.

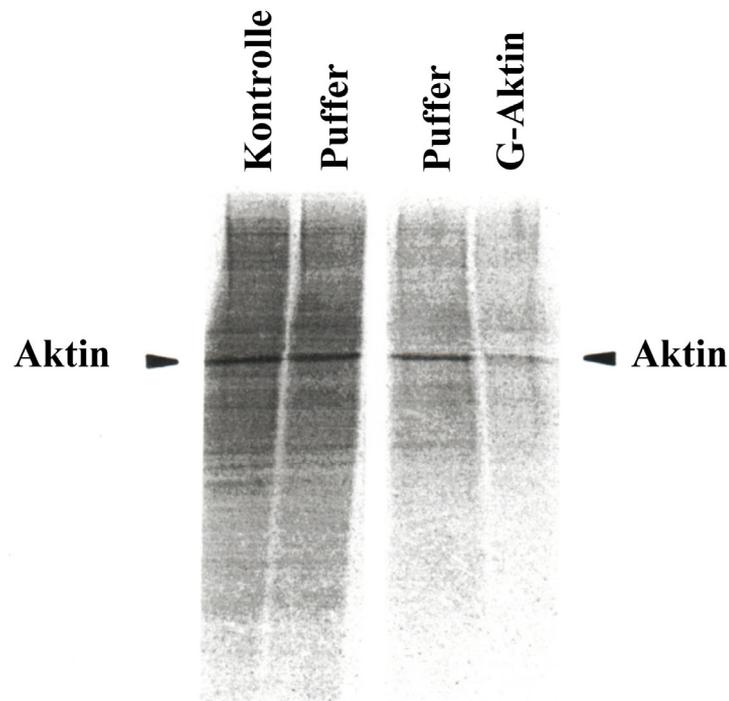
Die Lysate wurden, wie im Kapitel Methoden beschrieben, mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.



**Abb. 8: Einfluß von mikroinjiziertem G-Aktin auf die Proteinsynthese in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen**

Die Zellen wurden (a) als Kontrollzellen behandelt, oder (b) mit ADP-ribosyliertem G-Aktin

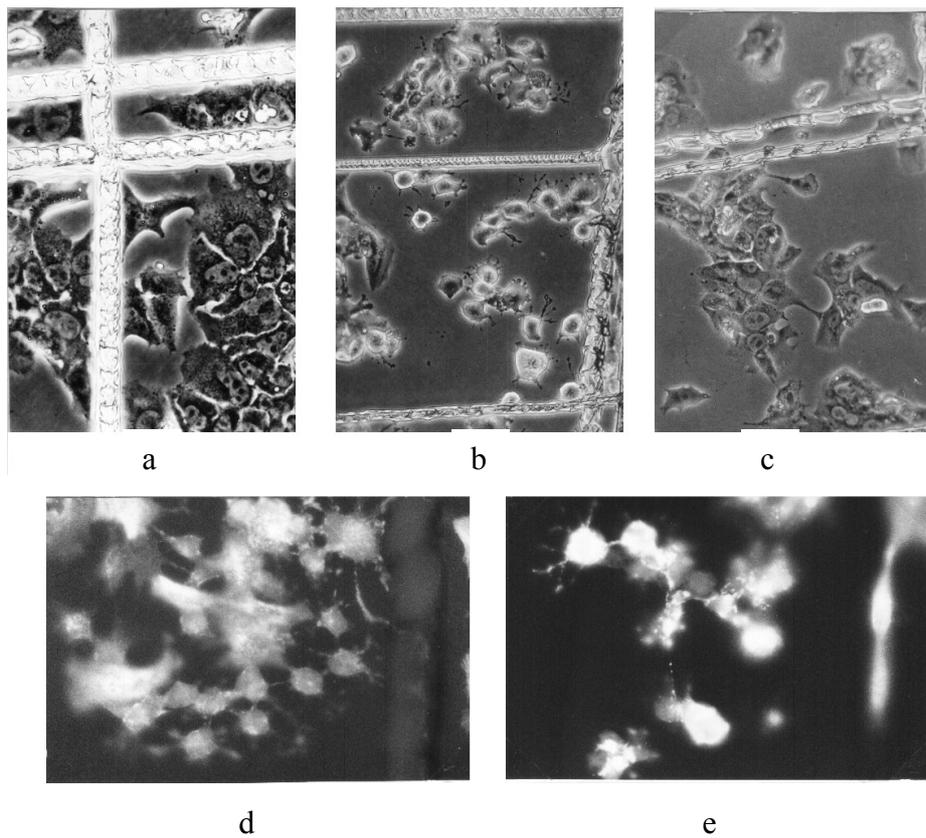
(13 mg/ml), oder (c) mit ADP-Ribosylierungspuffer injiziert. Danach wurden die Zellen entsprechend der auf dem Bild angegebenen Zeiten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die neusynthetisierten Proteine mit Hilfe von [ $^{35}$ S]-Methionin 1 h lang markiert und im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurde eine Autoradiographie erstellt. Das Aktin zeigte sich dann wie der Abbildung zu entnehmen.



---

**Abb. 9 : Immunpräzipitation von radioaktiv markiertem Aktin nach Mikroinjektion von ADP-ribosyliertem G-Aktin.**

Die Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen wurden mit ADP-ribosyliertem G-Aktin (13mg/ml) bzw. mit dem ADP-Ribosylierungspuffer als Kontrolle injiziert. Die Inkubationszeit betrug 3 h. Danach wurde das neu synthetisierte Protein mit [<sup>35</sup>S] Methionin markiert. Aktin wurde dann präzipitiert, wie im Kapitel Methoden beschrieben. Das Phosphoimaging-Ergebnis der Gelelektrophorese wird dargestellt. Die in der Abbildung als Kontrolle beschriftete Proteinauftrennung stellt nicht injizierte Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen dar als Kontrolle zur Injektion mit ADP-Ribosylierungspuffer.



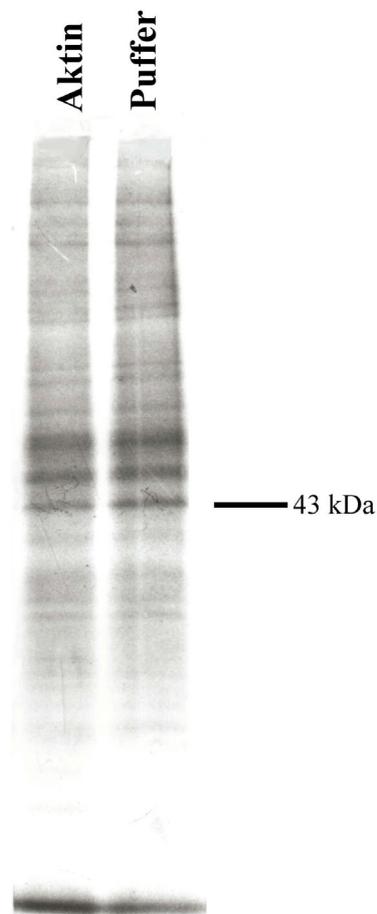
---

**Abb. 10 : Einfluß von mikroinjiziertem ADP-ribosyliertem G-Aktin auf die Zellform und auf das Zytoskelett**

Die Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen werden lichtmikroskopisch als Kontrollzellen dargestellt (a) sowie nach Mikroinjektion mit ADP-ribosyliertem G-Aktin (b) und mit Kontrollpuffer (c). Die Bilder (d) und (e) zeigen die mit FITC-Phalloidin angefärbten Zellen nach Injektion von ADP-ribosyliertem G-Aktin nach 3 und 5 h Inkubationszeit.

Bild b+c: 1 cm. = 35  $\mu$ m; Bild a: 1 cm = 2,5  $\mu$ m. Bild d + e: 1 cm = 3,9  $\mu$ m.

---



---

**Abb. 11: Einfluß von mikroinjiziertem G-Aktin auf die Proteinsynthese nach Vorbehandlung der Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen mit Phalloidin**

Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen wurden 18 h mit Phalloidin (10 µg/ml) vorinkubiert, um die Aktinfilamente zu stabilisieren. Danach wurden die Zellen mit ADP-ribosyliertem G-Aktin (13 mg/ml) bzw. mit ADP-Ribosylierungspuffer als Kontrolle mikroinjiziert. Nach der Mikroinjektion erfolgte eine erneute Inkubation für 5 h. Schließlich wurden die neusynthetisierten Proteine mit [<sup>35</sup>S] Methionin 1 h lang markiert. Das Aktin wurde anschließend wie in Abb.6 dargestellt.

## 4 Diskussion

Aktin kommt als wichtiges Protein in Eukaryontenzellen vor. In den Nichtmuskelzellen liegt es als monomeres G-Aktin und als filamentäres F-Aktin vor. Zwischen diesen beiden Formen besteht ein Gleichgewicht. Das Verhältnis der beiden Aktinformen reguliert die Neusynthese von Aktin. Bisher war nicht klar, ob die Aktinsynthese durch die zelluläre Konzentration von G-Aktin oder durch das G-Aktin/-F-Aktin-Verhältnis beeinflusst wird. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es: 1.) Zunächst ein Zellsystem zu etablieren, an dem man, mit der Hilfe von FITC-Phalloidin, die Regulationsmechanismen am Aktinfilamentsystem nach Inkubation mit C2-Toxin und Phalloidin beobachten kann. 2.) Demgegenübergestellt wurden die toxinunabhängigen Veränderungen des Aktinfilamentsystems von Primärhepatozyten im Kulturverlauf. 3.) Schließlich war es Aufgabe herauszufinden, ob der G-Aktin-Gehalt der Zellen das Regulationsprinzip für die Aktinsynthese ist, was durch die Mikroinjektion von ADP-ribosyliertem G-Aktin in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen erreicht werden sollte.

### 4.1 Etablierung der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Aktinfilamente

Zunächst sollten Bedingungen geschaffen werden, die es erlaubten, eine fluoreszenzmikroskopische Verlaufskontrolle von Veränderungen des Aktinzytoskeletts der Hepatozyten darzustellen, in Abhängigkeit von der Kulturdauer und dem Einfluß von C2-Toxin und Phalloidin. Es konnte gezeigt werden, daß C2-Toxin und Phalloidin deutlich antagonistische Effekte bezüglich des Aktinzytoskeletts bewirken. Es kam zu zeit- und konzentrationspezifischen Veränderungen der Aktinfilamente. In der Primärkultur von Hepatozyten bildeten sich nach etwa 24 Stunden Streßfilamente aus. Die im Verlauf einer Kultur bis zu 72 h zunehmend deutlicher hervortraten. Dies korrelierte mit einem Anstieg des F-Aktingehaltes und dem Anstieg der mRNA, was bereits in einer früheren Arbeit gezeigt worden war (P. Pohlmeyer, 1999). Unter dem Einfluss von C2-Toxin kam es zu einem Verschwinden der Streßfilamente und damit zu einem Anstieg des G-Aktins. Dies ist der ADP-Ribosyltransferase-Aktivität der C2 I-Komponente des C2-Toxins zuzuschreiben. Parallel dazu sank der Aktin-mRNA-Gehalt. Wie aus der obengenannten Arbeit hervorgeht, fiel nach weiterer Inkubationsdauer von > 72 h der G-Aktingehalt wieder ab und die Aktin-mRNA stieg auf Ausgangswerte wie bei den Kontrollzellen an. Es

ist bekannt, daß transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen in die Regulation der Aktinsynthese von Hepatozytenkulturen eingreifen. Reuner et al. (1995) haben gezeigt, daß die Abnahme von G-Aktin durch Phalloidin-Einwirkung von einem transkriptionellen Anstieg der Aktinsynthese gefolgt wurde, wohingegen der Anstieg von G-Aktin durch C2-Toxin-Einfluß eine verminderte Stabilität der mRNA zur Folge hatte ( Reuner et al.1995 ). Der letztgenannte Effekt konnte durch Untersuchungen an 3T3-Zellen und HeLa-Zellen bestätigt werden. Diese zeigen nach der Behandlung mit C2-Toxin und Latrunculin A eine posttranskriptionelle Abnahme der Aktinsynthese (Bershadsky et al.1995). Auf der anderen Seite ist die von G-Aktin unabhängige Zunahme der Aktin-mRNA während der Hepatozytenkultur wohl durch eine posttranskriptionelle Stabilisierung der mRNA bedingt (Jefferson et al.1984). Dies bestätigte sich in der vorliegenden Arbeit in den fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen der Rattenhepatozyten in Primärkultur. Hier kam es zu einer starken Zunahme der Filamente mit der Kulturdauer. Möglicherweise ist das Anhaften der Hepatozyten am Kulturschalenboden als Zell-Matrix-Kontakt ein Stimulus für die Ausbildung des Zytoskeletts ebenso, wie andere externe Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Zell-Zell-Kontakte Einfluß auf Veränderungen des Aktinzytoskeletts nehmen ( Clayton et al., 1985; Ben Ze'ey et al., 1988).

Die Diskrepanz zwischen der sehr deutlichen fluoreszenzmikroskopischen Abnahme der Streßfilamente unter C2-Toxin-Einwirkung und der nur gering ausgeprägten Abnahme des aus den Zellen extrahierbaren F-Aktins mag in der Tatsache begründet liegen, daß die FITC-Phalloidinfärbung nur eine semiquantitative Abschätzung des F-Aktins zuläßt.

Bezüglich der anderen verwendeten Zellsysteme (Endothelzellen und FAO-Hepatomazellen) ist festzuhalten, daß die Verminderung der Gesamtproteinsynthese nach Inkubation von C2-Toxin auf eine Hemmung der Genexpression durch den Zusammenbruch der Aktinfilamente zurückzuführen ist (Sklyarova et al., 1995). Dieser Zusammenbruch kommt in den fluoreszenzmikroskopischen Bildern nach C2-Toxin-Inkubation gut zur Darstellung.

Die Stabilisierung von F-Aktin und die damit verbundene Abnahme des G-Aktins nach Inkubation der Hepatozyten mit Phalloidin führte zu einer transkriptionalen Verstärkung der Aktinsynthese. Dies konnte autoradiographisch an der Zunahme des Einbaus von [<sup>35</sup>S]-Methionin in gleichzeitiger Intensivierung der Darstellung FITC-Phalloidin markierter Aktinfilamente dargestellt werden.

## 4.2 Autoregulation der Aktinsynthese

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, daß die Autoregulation der Aktinsynthese von in Kultur gehaltenen Hepatozyten sowohl auf transkriptionellen als auch auf posttranskriptionellen Mechanismen beruht. Diese hängen ab vom Anstieg des G-Aktins, verursacht durch C2-Toxin und dem Anstieg des F-Aktins, hervorgerufen durch Phalloidin (Reuner et al. 1995). Es konnte bisher nicht ausgeschlossen werden, daß die Toxine einen direkten Einfluß auf die Aktinsynthese haben. Darüber hinaus war auch nicht klar, ob der Gehalt von G-Aktin, F-Aktin oder das G-Aktin/F-Aktin Verhältnis tatsächlich selbst die Aktinsynthese in Hepatozyten reguliert (Reuner et al. 1995). Um zu beweisen, daß G-Aktin für diese Regulation verantwortlich ist, sollte der zelluläre Gehalt des monomeren Aktins durch Mikroinjektion in isolierte Zellen angehoben werden. In einem ähnlichen Experiment (Cleveland et al. 1983) konnte durch Mikroinjektion von Tubulin die Tubulinsynthese unterdrückt werden. Tubulin ist neben Aktin ein wichtiges Zytoskelettprotein. In anderen Untersuchungen wurde die Mikroinjektion von Rhodamin-markiertem Aktin oder Aktin-bindenden Proteinen durchgeführt, welche ebenfalls als gute experimentelle Werkzeuge fungieren. Dies wurde mit dem Ziel verfolgt das Aktinzytoskelett betreffende biochemische Prozesse zu analysieren (Kreis et al. 1982; Füchtbauer et al. 1983; Cooper et al. 1987; Symons und Mitchison 1991; Cao et al. 1992; Cao et al. 1993).

Bei den Versuchen zu der hier vorliegenden Arbeit ergab sich das Problem, daß die Konzentration des mikroinjizierten Aktins, die ausreichend gewesen wäre, den zellulären Aktin Gehalt anzuheben, eine Polymerisation in den Injektionsnadeln hervorrief. Selbst silikonisierte Nadeln waren sofort verstopft, wenn man sie in das Kulturmedium eintauchte. Um zu verhindern, daß G-Aktin in den Nadeln polymerisierte, wurde dieses mit Hilfe von *Clostridium perfringens* Iota Toxin ADP-ribosyliert (Aktories und Wegner 1989). Dieses Toxin diente als Katalysator, um die ADP-Ribosylierung von Aktin mit NAD zu beschleunigen. Das gebildete ADP-ribosylierte G-Aktin war erwartungsgemäß nicht mehr in der Lage zu polymerisieren. Die Aktinmonomere, die in dieser Weise behandelt wurden, passierten daher die Nadeln in Konzentration von 13 mg/ml.

Nachdem in vorangegangenen Arbeiten gezeigt worden war, daß die zelluläre Konzentration des Aktins ungefähr 5-7 pg pro Zelle beträgt (Snabes et al. 1981; Blikstad und Carlsson 1982; Heacock und Bamberg 1983) und 25% des gesamten Aktin Gehalts G-Aktin ist (Theodoropoulos et al. 1992), kann der Anstieg des monomeren Aktins bzw.

ADP-ribosylierten G-Aktins via Mikroinjektion auf ungefähr 10 % geschätzt werden, was das Gesamtaktin betrifft. In Bezug auf das G-Aktin entspricht dies einem Anstieg von 40 %. Dies geht konform mit Cleveland et al., die demonstrierten, daß der zelluläre monomere Tubulin-Level durch Mikroinjektion um 25-50% gesteigert werden kann. Allerdings verursachte die Mikroinjektion von 50 fl Puffer mit ADP-ribosyliertem G-Aktin sowie ohne dieses eine Ablösung der Primärhepatozyten vom Schalenboden innerhalb von 3 bis 6 h und nach weiterer Inkubation auch deren Tod. Das wurde bereits in Vorversuchen zu dieser Arbeit (P. Pohlmeier, 1999), aufgrund von Messungen der LDH, GOT und GPT im Medium vermutet. Die Erhöhung der Enzymaktivitäten konnte als Hinweise für den Zelltod angesehen werden. Als Ursache für das Absterben der Zellen wurde der Punktionsmechanismus angenommen und nicht die Volumenzunahme der Zelle durch das injizierte Volumen. Führte man nämlich den gleichen Punktionsversuch mit H<sub>2</sub>O durch, so starben die Hepatozyten ebenfalls ab. Das Injektionsvolumen erhöhte das eigentliche Zellvolumen nur um ca. 50 fl, das heißt um weniger als 2 %.

Da die Primärhepatozyten für die Mikroinjektion somit nicht geeignet waren, mußte ein anderes Zellsystem gefunden werden, mit dem die weiteren Mikroinjektionsversuche durchgeführt werden konnten. Im Gegensatz zu den Primärhepatozyten blieben die Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen unbeeinflusst von der Prozedur der Mikroinjektion. Diese Zellen, welche durch Fusion von Rattenhepatozyten in Primärkultur und FAO-Hepatomazellen hergestellt wurden, zeigen wesentliche Eigenschaften der Hepatozyten (Katz et al. 1992; Petzinger et al. 1994), so auch die Autoregulation der Aktinsynthese, wie sie in Hepatozyten abläuft. Sie können somit als Modell "immortalisierter Hepatozyten" angesehen werden. Hierauf gründet sich die Entscheidung, die Experimente der Mikroinjektion in diesem Zellsystem durchzuführen. Zur genaueren Untersuchung, ob der Regulationsmechanismus für die Aktinsynthese bei den Hybridzellen ähnlich dem von Primärhepatozyten ist, wurde die Abhängigkeit der Aktinsynthese vom G-Aktin/F-Aktin-Gleichgewicht in beiden Zelltypen verglichen. Vorversuche zur vorliegenden Arbeit hatten ergeben, daß die Behandlung von Primärhepatozyten mit C2-Toxin nach 2 h den G-Aktingehalt auf 157% ansteigen läßt und den F-Aktingehalt auf 59% vermindert. Ähnliche Effekte wurden beobachtet, wenn man die Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen diesem Toxin aussetzte. In beiden Fällen konnte man eine Abnahme der Aktin-mRNA um 50% feststellen. In der vorliegenden Arbeit kam es unter dem Einfluß von C2-Toxin zu einer Abrundung bzw. Verkleinerung beider Zelltypen. Löste man jedoch experimentell ein Anschwellen der Zellen durch Inkubation in einem hypotonen Medium aus, so zeigten

Theodoropoulos et al. 1992, daß es zu einer Zunahme der Aktin-mRNA kam. Veränderungen im Bereich des Zytoskeletts als Antwort auf Größenzunahme der Zelle haben somit einen positiven Einfluß auf die Aktinsynthese. Im Gegensatz zu C2-Toxin führte die Vergiftung mit Phalloidin bei beiden Zelltypen zu einem signifikanten Absinken von G-Aktin und einem gleichzeitigen Anstieg der Aktin-mRNA bis auf annähernd 250%. Die Effekte von beiden Toxinen waren Aktin-spezifisch, was durch den Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin in neusynthetisierte Proteine gezeigt werden konnte. Die Synthese von Aktin wurde somit in beiden Zellsystemen gleichermaßen beeinflusst, wohingegen die Synthese anderer Proteine nicht wesentlich durch C2-Toxin oder Phalloidin verändert wurde, weder bei Primärhepatozyten noch bei Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen. Die Mikroinjektion von ADP-ribosyliertem G-Aktin in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen führte zu in einer signifikanten Abnahme der Aktinsynthese, vergleichbar mit der Suppression der Tubulinsynthese nach Injektion von Tubulin in Zellen (Cleveland et al. 1983). In der gegenwärtigen Studie wurde ADP-ribosyliertes  $\alpha$ -Skelettmuskel-Aktin in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen injiziert, welche physiologischerweise  $\beta$ -Nichtmuskel-Aktin enthalten. Im Gegensatz zu anderen Beobachtungen (Leavitt et al. 1987; Lloyd et al. 1992) scheint die Autoregulation der Aktinsynthese in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen demzufolge nicht von einer spezifischen Aktin-Isoform wie zum Beispiel  $\beta$ - oder  $\alpha$ -Aktin abhängig zu sein. Es mußte ausgeschlossen werden, daß die hier gezeigten Effekte vom Abbau des F-Aktins durch Destabilisierung der Aktinfilamente mit Hilfe des ADP-ribosylierten G-Aktins am stumpfen Ende abhängen. Hierfür wurden die Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen mit Phalloidin vorinkubiert, um die Aktinfilamente im Vorfeld zu stabilisieren. Die nachfolgende Injektion von ADP-ribosyliertem Aktin unterdrückte die Aktinsynthese ebenfalls um annähernd 50 %. Jedoch war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt als die Abnahme der Aktinsynthese ohne Vorinkubation der Zellen mit Phalloidin. Daher ist anzunehmen, daß beide Vorgänge, der Anstieg des G-Aktin-Spiegels via Mikroinjektion und die Depolymerisation der Aktinfilamente durch Capping am stumpfen bzw. schnell wachsenden Ende, die Aktinsynthese unterdrücken. Folglich zeigt ADP-ribosyliertes G-Aktin einen ähnlichen Effekt auf die Aktinsynthese wie G-Aktin. Aus der vorliegenden Arbeit kann geschlossen werden, daß monomeres G-Aktin - eher als F-Aktin - der eigentliche Regulator für die Aktinsynthese in Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen ist und diese hinsichtlich der Aktinregulation als Modell für Hepatozyten und nichtmuskuläre Zellen verwendet werden können.

Diese Schlußfolgerung wurde durch weitere Studien anderer Arbeitsgruppen unterstützt. So verwendeten Lyubimova et al. (1997) *Swinholid A* und *Latrunculin A*, um an Balb/C-3T3-Zellen deren Einfluß auf die Regulation der Aktinsynthese zu untersuchen. *Swinholid A* stammt von einem Seeschwamm ab und hat eine hohe Potenz, Aktinfilamente zu durchtrennen. Außerdem besitzt es als bisher einzige bekannte Substanz die Fähigkeit, Aktin als dimere Form in vitro zu stabilisieren. Somit ist *Swinholid A* eine geeignete Substanz, um zwischen den Effekten zu unterscheiden, die durch eine Zunahme des G-Aktins und solchen die durch eine Reduktion des F-Aktins und Unterbrechung des Aktinzytoskeletts verursacht werden.

*Latrunculin A* ist ein Metabolit des roten Seeschwammes, welcher G-Aktin bindet und damit die Polymerisation verhindert. Es zeigte sich, daß es unter der Einwirkung von *Latrunculin A* zu einer Abnahme von neusynthetisiertem  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin kam, wohingegen die Behandlung der Zellen mit *Swinholid A* zu einer deutlichen Zunahme der Aktinsynthese führte. Dies läßt sich am ehesten dadurch erklären, daß in diesen Zellen das monomere G-Aktin durch die Bildung der dimeren Form so verringert wurde, daß es selbst in geringerer Menge vorlag als in den Kontrollzellen und es deswegen zu einer Zunahme der Aktinsynthese kam. Somit fand sich also auch in nachfolgenden Arbeiten eine Bestätigung für das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung, daß das monomere G-Aktin ein Regulationsprinzip für die Aktinsynthese ist. Offensichtlich unabhängig von dieser Regulation wurde im Rahmen der Proliferation von Hepatozyten zusätzlich eine vom G-Aktin-Gehalt der Zelle unabhängige Steigerung der Aktinsynthese beobachtet. Unter welchen Bedingungen der eine oder der andere Regulationsmechanismus zum Einsatz kommt, bleibt durch weitere Untersuchungen zu klären.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, zunächst eine Methode für die Anfärbung des Aktinzytoskeletts in primären Hepatozyten bzw. Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen zu entwickeln. Darüber hinaus sollte mit Hilfe der Mikroinjektion von Aktin in Zellen untersucht werden, ob die Regulation der Aktinsynthese in Hepatozyten durch die Konzentration von monomerem G-Aktin oder durch das G-Aktin/F-Aktin-Verhältnis reguliert wird.

Nach der Etablierung einer FITC-Phalloidin Färbung für primäre Hepatozyten konnte eine fluoreszenzmikroskopische Verlaufskontrolle der Veränderungen des Aktinzytoskeletts abhängig von der Zeit und dem Einfluß von C2-Toxin und Phalloidin eingerichtet werden. Hierbei kam es zu Diskrepanzen zwischen der bildlich darstellbaren und der meßbaren Dokumentation der G-Aktinergehalte. Dies könnte daran liegen, daß die FITC-Phalloidinfärbung keine exakt quantitative Methode darstellt.

Bezüglich der Aktinsyntheseregulation war durch vorangegangene Arbeiten bekannt, daß das G-Aktin/F-Aktin Verhältnis einen wichtigen Einfluß auf die Erhaltung des Zytoskeletts von Nichtmuskelzellen hat. Es war bisher allerdings nicht sicher, wie die Regulation der Aktinsynthese gesteuert wird. Mit Hilfe von Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen konnte gezeigt werden, daß nach Steigerung der zellulären G-Aktin-Konzentration durch Mikroinjektion von ADP-ribosyliertem G-Aktin die Aktinsynthese deutlich abnimmt. Um ausschließen zu können, daß der genannte Regulationseffekt vom Abbau des F-Aktins durch Blockierung der Aktinfilamente mit Hilfe des ADP-ribosylierten G-Aktins abhängig ist, wurden Zellen zunächst mit Phalloidin vorinkubiert. Dies bewirkte eine Stabilisierung der Aktinfilamente. Trotzdem kam es im Anschluß daran durch G-Aktin-Injektion ebenso, jedoch in geringerem Umfang, zu einer Abnahme der Aktinsynthese. Daher liegt die Vermutung nahe, daß beide Vorgänge, sowohl der G-Aktin-Anstieg durch Mikroinjektion, als auch die Depolymerisation der Aktinfilamente, die Aktinsynthese beeinflussen. Bei der Klärung der Frage, auf welcher Ebene die Regulation der Aktinsynthese stattfindet, kann durch diese Arbeit dem monomeren G-Aktin eine bestimmende Rolle bei der Regulation der Aktinsynthese zugeschrieben werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Aktories, K. and Wegner, A. (1989): ADP-ribosylation of actin by clostridial toxins J. Cell. Biol. **109**, 1385-1387
2. Aktories, K., Bärmann, M. Ohishi, I., Tsuyama, S., Jakobs, K. H. and Habermann, E. (1986): Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. Nature **322**, 390-392
3. Aktories, K., Reuner, K. H., Presek, P. and Bärmann (1989): Botulinum C2-Toxin treatment increases the G-actin pool in intact chicken cells: a model for the cytopathic action of actin-ADP-ribosylating toxins., M. Toxicon **27**, 989-993
4. Bachurski C.J., Theodorakis N.G., Coulson R.M.R., Cleveland D.W. (1994): An amino-terminal tetrapeptide specifies cotranslational degradation of  $\beta$ -tubulin but not  $\alpha$ -tubulin mRNAs. Mol. Cell. Biol. **14**, 4076-4086
5. Benkoel, L., J. Brisse, C. Capo, A.M. Benoliel, P. Bongrand, T. Garcia und A. Chamlian (1992): Localization of actin in normal human hepatocytes using fluorescent phallotoxins and immunohistochemical amplification, Cellular and Molecular Biology **38** (4), 377-383.
6. Ben-Ze'ev, A., S.R. Farmer, S. Penman (1979): Mechanisms of regulating tubulin synthesis in cultured mammalian cells. Cell **17**, 319-325
7. Bershadsky, A. D. and Vasiliev, J. M. (1988): Cytoskeleton, Plenum Press, New York, London
8. Bershadsky, A. D., Glück, U., Denisenko, O. N., Sklyarova, T. V., Spector, I. and Ben-Ze'ev, A. (1995): The state of actin assembly regulates actin and vinculin expression by a feedback loop. J. Cell Sci. **108**, 1183-1193
9. Blikstad, I. and Carlsson, L. (1982): On the dynamics of the microfilament system in HeLa cells. J. Cell Biol. **93**, 122-128
10. Bradford, M.(1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**, 248-254
11. Cao,L. G., Babcock, G. G., Rubenstein, P.A. and Wang, Y.L. (1992): Effects of profilin and profilactin on actin structure and function in living cells J. Cell Biol. **117**, 1023-1029
12. Cao, L. G., Fishkind, D. J. and Wang, Y. L. (1993): Localization and dynamics of nonfilamentous actin in cultured cells. J. Cell Biol. **123**, 173-181

13. Carmeli, L., Kashman, Y. (1985): Structure of swinholide A: A new macrolide from the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Tetrahedron Lett* **26**, 511-514.
14. Caron, J.M., A.L. Jones, L.B. Rall and M.W. Kirschner (1985): Autoregulation of tubulin synthesis in enucleated cells. *Nature* **317**, 648-651
15. Cassimeris, L. (1993): Regulation of microtubule dynamic instability. *Cell. Motil. Cytoskeleton* **26**, 275-281
16. Cassimeris, L.U., Walker R.A., Pryer N.K., Salmon E.D. (1987): Dynamic instability of microtubules. *Bio Essays*, 149-154
17. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159
18. Cleveland, D. W. Pittenger, M. F. and Feramisco, J. R. (1983): Elevation of tubulin levels by microinjection suppresses new tubulin synthesis. *Nature* **305**, 738-740
19. Cleveland, D.W., M.A. Lopata, P. Sherline, M.W. Kirschner (1981): Unpolymerized tubulin modulates the level of tubulin mRNAs. *Cell* **25**, 537-546
20. Cooper, J. A. (1987): Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* **105**, 1473-1478
21. Cooper, J. A. (1991): The role of actin polymerization in cell motility. *Ann. Rev. Physiol.* **53**, 585-605
22. Cooper, J. A., Bryan, J., Schwab, B., Frieden, C., Loftus, D. J. and Elson, E. L. (1987): Microinjection of gelsolin into living cells. *J. Cell Biol.* **104**, 491-501
23. Dabiri, G.A., Sanger, J.M., Portnoy, D.A., Southwick, F.S. (1990): *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 6068-6072
24. Feldmann, G. (1989): The cytoskeleton of the hepatocyte. Structure and functions. *J. Hepatol.* **8**, 380-386
25. French, S.W., Davies, P.K. (1975): Ultrastructural localization of actin-like filaments in rat hepatocytes. *Gastroenterology*, **68**, 765-774
26. Frimner M. (1987): What we have learned from phalloidin. *Toxicol Lett*; **35**, 169-82
27. Frimner Nickola and M. (1986): Preservation of cellular polarity in isolated hepatocytes. Visualization of cytoskeletal structures by indirect immunofluorescence and fluorescent staining with tetramethylrhodaminyl-phalloidin, *Cell Tissue Res.* **243**, 437-440

28. Frimmer, M., Petzinger, E. (1977): Mechanism of phalloidin intoxication: I. Cell membrane alteration, Membrane alteration as a basis of liver injury. Edited by Popper, H., Bianchi, L., Reutter, W. Lancaster, England, MTP Press 293-299
29. Fuchtbauer, A., Jockusch, B., Maruta, H., Kilimann, M. W. and Isenberg, G. (1983): Disruption of microfilament organization after injection of F-actin capping proteins into living tissue culture cells. *Nature (London)* **304**, 361-364
30. Gelfand VI, Bershadsky A.D. (1991): Microtubule dynamics: Mechanism, regulation and function. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 93-116
31. Gonzalez-Garay M.L., Cabral F. (1996):  $\alpha$ -Tubulin limits its own synthesis: Evidence for a mechanism involving translation repression. *J. Cell. Biol.* **135**, 1525-1534
32. Gordon, S.R. and Buxar, R.M. (1997): Inhibition of cytoskeletal reorganization stimulates actin and tubulin syntheses during injury-induced cell migration in the corneal endothelium. *J. Cell. Biochemistry* **67**, 409-421
33. Graessmann, A., Graessmann, M. and Mueller, C. (1980): Microinjection of early SV40 DNA fragments and T antigen. *Meth. Enzymol.* **65**, 816-825
34. Grolig, F. (1990): Actin-based organelle movements in interphase *Spirogyra*. *Protoplasma* **155**, 29-42
35. Heacock, C. S. and Bamburg, J. R. (1983): The quantitation of G- and F-actin in cultured cells. *Anal. Biochem.* **135**, 22-36
36. Hooser, S. B., Beasley, V. R., Waite, L. L., Kuhlenschmidt, M. S., Carmichael, W. W. and Haschek, W. M. (1991): Actin filament alterations in rat hepatocytes induced in vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Vet. Pathol.* **28**, 259-266
37. Jefferson, D.M., Clayton, D.F., Darnell, J.E., Reid, L.M., (1984): Posttranscriptional modulation of gene expression in cultured rat hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1929-1934.
38. Katz, N. R. and Giffhorn, S. (1983): Glucose- and insulin-independent induction of ATP citrate lyase in primary culture of rat hepatocytes. *Biochem. J.* **212**, 65-71
39. Katz, N., Immenschuh, S., Gerbracht, U., Eigenbrodt, E., Föllmann, W. and Petzinger, E. (1992): Hormone-sensitive carbohydrate metabolism in rat hepatocyte-hepatoma hybrid cells. *Eur. J. Cell Biol.* **57**, 117-123
40. Kawahara, H., French, S.W. (1990): Role of cytoskeleton in canalicular contraction in cultured differentiated hepatocytes. *Am. J. Pathol.* **136**, 521-532.

41. Korn, E. D. (1982): Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol. Rev.* **62**, 672-737
42. Kreis, Thomas E. (1986): Preparation, assay and microinjection of fluorescently labeled cytoskeletal proteins: actin,  $\alpha$ -actinin, and vinculin. *Methods Enzymol* **134**, 507-519
43. Kreis, T. E., Geiger, B. and Schlessinger, J. (1982): Mobility of microinjected rhodamine actin within living chicken gizzard cells determined by fluorescence photobleaching recovery. *Cell* **29**, 835-845
44. Kuhlman, P.A. and Fowler, V.M. (1997): Purification and characterization of an  $\alpha_1\beta_2$  isoform of capZ from human erythrocytes: cytosolic location and inability to bind to  $Mg^{2+}$  ghosts suggest that erythrocyte actin filaments are capped by adducin. *Biochemistry* **36**, 13461-13472
45. Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**, 680-685
46. Leavitt, J., Ng, S. Y., Aebi, U., Varma, M., Latter, G., Burbeck, S., Kedes, L. and Gunning, P. (1987): Expression of transfected mutant beta-actin genes: alterations of cell morphology and evidence for autoregulation in actin pools. *Mol. Cell Biol.* **7**, 2457-2466
47. Lloyd, C. , Schevozv, G. and Gunning, P. (1992): Transfection of nonmuscle beta-and gamma-actin genes into myoblasts elicits different feedback regulatory responses form endogenous actin genes. *J. Cell Biol.* **117**, 787-797
48. Lyubimova A., Bershadsky, A.D. and Ben-Ze'ev, A. (1997): Autoregulation of actin synthesis responds to monomeric actin levels. *J Cell Biochemistry* **65**, 469-478
49. Mitchison, T.J., Kirschner, M.W. (1984): Dynamic instability of microtubule growing. *Nature* **132**, 237-242
50. Müller, H., v. Eichel-Streiber, C. and Habermann, E. (1992): Morphological changes of cultured endothelial cells after microinjection of toxins that act on the cytoskeleton. *Infect. Immun.* **60**, 3007-3010
51. Neuhaus, J. M. Wanger, M., Keiser, T. and Wegner, A. (1983): Treadmilling of actin. *J. Muscle Res. Cell Mot.* **4**, 507-527
52. Nickola, I. and Frimmer, M. (1986): Preservation of cellular polarity in isolated hepatocytes. *Cell Tissue Res* **243**, 437-440

53. Oda, M., Price, V., Fischer, M.M., Phillips, M.J. (1974): Ultrastructure of bile canaliculi with special reference to the surface coat and the pericanalicular web. *Lab. Invest.* **31**, 314-323
54. Ohishi, I., Iwasaki, M. and Sakaguchi, G. (1980): Purification and characterization of two components of botulinum C2 toxin. *Infect. Immun.* **30**, 668-673
55. Ornelles, D.A., Fey, E.G., Penman, S. (1986): Cytochalasin releases mRNA from the cytoskeletal framework and inhibits protein synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1650-1662
56. Pachter, J.S., T.J. Yen, D. W. Cleveland (1987): Autoregulation of tubulin expression is achieved through specific degradation of polysomal tubulin mRNAs. *Cell* **51**, 283-292
57. Petzinger, E., Föllmann, W., Blumrich, M., Walther, P., Hentschel, J., Bette, P., Maurice, M. and Feldmann, G. (1994): Immortalization of rat hepatocytes by fusion with hepatoma cells. I. Cloning of a hepatocytoma cell line with bile canaliculi. *Eur. J. Cell Biol.* **64**, 328-338
58. Petzinger E., Frimmer M. (1988): Comparative investigations on the uptake of phallotoxins, bile acids, bovine lactoperoxidase and horseradish peroxidase into rat hepatocytes in suspension and in cell cultures. *Biochem. Biophys. Acta*; **937**, 135-44
59. Pohlmeier, P. (1999). Untersuchungen zur Autoregulation der Aktinsynthese in Nichtmuskelzellen, Dissertation am Fachbereich Humanmedizin der JLU Giessen
60. Pollard, T. D. and Cooper, J. A. (1986): Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanism and functions. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 987-1035
61. Polokoff, M. A. and Everson, G. T. (1986): Hepatocyte-hepatoma cell hybrids. Characterization and demonstration of bile acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **261**, 4085-4089
62. Prentki, M., Chaponnier, C., Renaud, B.J., and Gabbiani, G. (1979): Actin microfilaments, cell shape, and secretory processes in isolated rat hepatocytes. *J Cell Biology* **81**, 592- 607.
63. Rao, K. M., Betschart, J. M. and Virji, M. A. (1985): Hormone-induced actin polymerization in rat hepatoma cells and human leucocytes. *Biochem. J.* **230**, 709-714
64. Reuner, K. H., Presek, P., Boschek, C. B. and Aktories, K. (1987): Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin and disorganizes the microfilament network in intact cells. *Eur. J. Cell Biol.* **43**, 134-140
65. Reuner, K. H., Schlegel, K., Just, I., Aktories, K. and Katz, N. (1991): Autoregulatory control of actin synthesis in cultured rat hepatocytes. *FEBS Lett.* **286**, 100-104

66. Reuner, K. H., Wiederhold, M., Dunker, P., Just, I., Bohle, R. M., Kröger, M. and Katz, N. (1995): Autoregulation of actin synthesis in hepatocytes by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Eur. J. Biochem.* **230**, 32-37
67. Reuner, K. H., Dunker, P., van der Does, A., Wiederhold, M., Just, I., Aktories, K., Katz, N., (1996): Regulation of actin synthesis in rat hepatocytes by cytoskeletal rearrangements. *Eur. J. of Cell Biology* **69**, 189-196
68. Sakisaka, L., Cheng, O. and Boyer, J.L. (1988): Tubulovesicular transcytotic pathway in isolated rat hepatocyte couplets in culture. *Gastroenterology* **95**, 793-804
69. Serpinskaya, A. S., Denisenko, O. N., Gelfand, V. I. and Bershadsky, A. D. (1990): Stimulation of actin synthesis in phalloidin-treated cells. Evidence for autoregulatory control. *FEBS Lett.* **277**, 11-14
70. Snabes, M. C., Boyd, A. E., Pardue, R. L. and Bryan, J. (1981): A DNase I binding / immunoprecipitation assay for actin. *J. Biol. Chem.* **256**, 6291-6295
71. Spudich, J. A. and Watt, S. (1971): The regulation of rabbit skeletal muscle contraction I. Biochemical studies of the interaction of the TM-TN complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* **245**, 4866-4871
72. Stacey, D. W. and Allfrey, V. G. (1976): Microinjection studies of duck globin messenger RNA translation in human and avian cells. *Cell* **9**, 725-732
73. Suttorp, N., Polley, M., Seybold, J., Schnittler, H., Seeger, W., Grimminger, F. and Aktories, K. (1991): Adenosine diphosphate-ribosylation of G-actin by botulinum C2 toxin increases endothelial permeability in vitro. *J. Clin. Invest.* **87**, 1575-1584
74. Symons, M. H. and Mitchison, T. J. (1991): Control of actin polymerization in live and permeabilized fibroblasts. *J. Cell Biol.* **114**, 503-513
75. Simpson, C.J. and Geoghegan, T.E. (1990): Actin gene expression in murine erythroleukemia cells treated with cytochalasin D. *Exp. Cell Res.* **189**, 28-32
76. Simpson, C.J., Singleton, D., Geoghegan, T.E. (1993): Cytochalasin D-induced actin gene expression in murine erythroleukemia cells. *Exp. Cell Res.* **205**, 225-231
77. Tannenbaum, J. and Brett, J.G. Evidence for regulation of actin synthesis in cytochalasin D-treated HEp-2 cells. *Exp. Cell Res.* **160**, 435-448 (1985)
78. Tannenbaum, J. Cytochalasin D alters the rate of synthesis of some HEp-2 cytoskeletal proteins. *Eur. J. Biochem.* **155**, 533-542 (1986)
79. Theodoropoulos P. A., Stournaras C., Stoll B., Markogiannakis E., Lang F., Gravanis, A. and Häussinger, D. (1992): Hepatocyte swelling leads to rapid decrease of the G-/total actin ratio and increases actin mRNA levels. *FEBS Lett.* **311**, 241-245

80. Thibault, N., J. R. Claude und F. Ballet (1992): Actin filament alteration as a potential marker for cholestasis: a study in isolated rat hepatocyte couplets. *Toxicology*, **73**, 269-279
81. Traas, J.A., Doonan, J.H., Rawlins, D.J. Shaw, P.J., Watts, J., Lloyd, C.W. (1987): An actin network is present in the cytoplasm throughout the cell cycle of carrot cells and associates with the dividing nucleus. *J Cell Biol* **105**, 387-395
82. Vandecandelaere, A., Martin, S.R., Schilstra, M.J., Bayley, P.M. (1994): Effects of the tubulin-colchicine complex microtubule dynamic instability. *Biochem* **33**, 2972-2801
83. Watanabe, N. Tsukada, N. Smith, C.R., Edwards, V. and Phillips M.J. (1991): Permeabilized hepatocyte couplets. Adenosine triphosphat-dependent bile canalicular contractions and a circumferential pericanalicular microfilament belt demonstrated. *Laboratory Investigation* **65**, No 2, 203-213
84. Watanabe, S. and Phillips, M.J. (1986): Acute phalloidin toxicity in living hepatocytes. Evidence for a possible disturbance in membrane flow and for multiple functions for actin in the liver cell. *AJP* **122**, 101-111
85. Wegner, A. (1976): Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* **108**, 139-150
86. Wegner, A. and Aktories, K. (1988): ADP-ribosylated actin caps the barbed end of actin filaments. *J. Biol. Chem.* **263**, 13739-13742
87. Wiener, J., Loud, A. V., Kimberg, D. and Spiro, D. (1968): A quantitative description of cortisone-induced alterations in the ultrastructure of rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* **37**, 47-62
88. Zachary, J.M., G. Cleveland, L. Kwock, T. Lawrence, R.M. Weissman, L. Nabell, F.A. Fried, E.V. Staab, M.A. Risinger und L. Lin (1986): Actin filament organization of the Dunning R3327 rat prostatic adenocarcinoma system: Correlation with metastatic potential. *Cancer Research* **46**, 926-932.

## 7 Anhang

### Publikationsverzeichnis

#### 1. Originalarbeiten

1. Reuner, K.H., Dunker, P, **v.d. Does, A.**, Wiederhold, M., Just, I., Aktories, K., Katz, N.: Regulation of actin synthesis in rat hepatocytes by cytoskeletal rearrangements. Eur. J. Cell biol. **69**: 189-196 (1996)

2. Reuner, K.H., **v. d. Does, A.**, Dunker, P., Just, I., Aktories, K., Katz, N.: Microinjection of ADP-ribosylated actin inhibits actin synthesis in hepatocyte-hepatoma hybrid cells. Biochem. J. **319** (Pt3): 843-9 (1996)

#### 2. Vorträge und Abstracts

1. Reuner, K.H., Wiederhold, M., **v.d. Does, A.**, Dunker, P., Katz, N. : Mechanisms of regulation of actin synthesis in cultured hepatocytes. Postervortrag beim Kongreß für Laboratoriumsmedizin in Berlin und Abstract in Lab.med. **18**, 415-416, 1994.

2. Reuner, K.H., Wiederhold, M., Philipp, M., **v. d. Does, A.**, Dunker, P., Katz, N.: Mechanismus der Autoregulation der Aktinsynthese in Hepatozyten. Vortrag zur Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL) in München, 28.01.95 und Abstract in Gastroenterologie, 1, 45, 1995.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. N. Katz möchte ich für die Überlassung des Themas sowie die anregende Kritik und Förderung ganz besonders danken.

Sehr herzlich danke ich Herrn Dr. K.H. Reuner für die Betreuung und die vielen wertvollen Anregungen während der Zeit der experimentellen Phase und der Erstellung dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. E. Petzinger vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Überlassung der FAO-Hepatomazellen und Hepatozyten-Hepatoma-Hybridzellen, Herrn Prof. Dr. N. Suttrop von der Medizinischen Klinik der JLU für die Überlassung von Endothelzellen, Herrn Prof. Dr. K. Aktories vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Freiburg für die Bereitstellung von Botulinum C2-Toxin sowie Herrn PD Dr. I. Just für die Bereitstellung des  $\alpha$ -Skelettmuskelaktins vom Kaninchen und die Durchführung des Tests von ADP-ribosyliertem G-Aktin auf Toxinfreiheit.

Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern im Labor, ganz besonders Frau Monika Philipp, die mich bei der Durchführung der Arbeit unterstützt hat.

Besonders danken möchte ich meiner Mutter, die das wiederholte Korrekturlesen der Arbeit mit viel Geduld und Sorgfalt übernommen hat.

**Lebenslauf**

19. März 1970	geboren in Darmstadt
1976-1980	Rehbergsschule, Roßdorf
1980-1989	Justus-Liebig-Gymnasium, Darmstadt
Mai 1989	Abitur
WS 1989/90 - Okt.1996	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen
Oktober 1996	Medizinisches Staatsexamen
Januar 1997 – Juni 1998	Tätigkeit als Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Innere Medizin am Knappschaftskrankenhaus Bochum-Langendreer der Universität Bochum
Juli 1998-Dez. 1998	Tätigkeit als Assistenzärztin ebenda
seit 4/1999	Tätigkeit als Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik II des Klinikum Offenbach am Main
seit 13.Juli 2001	verheiratet mit Dr. med. Christof Rehbein