

Aus dem Institut für Physiologische Chemie  
komm. Direktor: Prof. Dr. med. habil. J. Lasch



**Einfluß der Organisation des Mikrofilamentsystems auf die Synthese von  
Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Mathias Faßhauer  
geboren am 13.06.1974 in Halle

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Iwig
2. PD Dr. rer. nat. Hatzfeld
3. Prof. Dr. rer. nat. Jockusch

Promotionsverteidigung am 19.01.01

An verschiedenen nichttransformierten Zelllinien ist nachgewiesen worden, daß eine Desintegration der Mikrofilamente durch Cytochalasin D (CD), Latrunculin A (LAT A) und B (LAT B) zu einer Wachstumshemmung der Zellen führt. Es wurde untersucht, ob diese Befunde auch bei embryonalen humanen Lungenfibroblasten (Wi-38) gültig sind. Als Maß für die Proliferation wurde dabei der Anteil DNA-synthetisierender Zellen an der Gesamtzellzahl mit Hilfe der Autoradiographie bestimmt. Es wurde gezeigt, daß intakte Mikrofilamente auch bei Wi-38-Zellen eine wichtige Voraussetzung für das Wachstum sind.

Um sich der Ursache für die verminderte DNA-Synthese nach Alteration des Mikrofilamentsystems zu nähern, wurde desweiteren die Gesamtproteinsynthese und die Neusynthese der Proto-Onkogen-Proteine c-jun, c-fos, c-myc und der Cycline D1, E und A untersucht. Die Synthese der einzelnen Proteine, denen eine wichtige Funktion bei der G<sub>1</sub>-Phase-Progression bzw. S-Phase-Initiierung zugestanden wird, wurde nach Immunpräzipitation, SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese) und Autoradiographie durch densitometrische Vermessung der resultierenden Banden ermittelt. Zugabe von CD, LAT A und B zu Wi-38-Zellen führte zu einer starken Verminderung der Gesamtproteinsynthese. In exponentiell wachsenden Zellen fiel nach Zugabe der Effektoren die Synthese der untersuchten Proto-Onkogen-Proteine und Cycline im Rahmen der verminderten Gesamtproteinsynthese ab. Während die Synthese der Cycline E und A bei Reaktivierung nach Serummangelmedium durch Zugabe von CD und LAT A erneut nicht stärker als die Gesamtproteinsynthese abfiel, war die Cyclin D1-Neusynthese über die Gesamtproteinsynthese hinaus vermindert. Bei Reaktivierung nach Suspensionskultur war eine über die Hemmung der Gesamtproteinsynthese hinausgehende Inhibition der Cyclin D1-Synthese, nach Alteration des Mikrofilamentsystems durch CD, nicht sicher nachweisbar.

Die Wachstumshemmung nach Alteration des Mikrofilamentsystems kann im Ergebnis dieser Versuche, zumindest teilweise, durch die verminderte Synthese von Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen erklärt werden, die wichtig für die G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-S-Phase-Progression sind. Cyclin D1 scheint für die Erklärung der Proliferationshemmung besonders geeignet, weil seine Synthese bei den Reaktivierungsversuchen nach Serummangel durch Effektorenzugabe besonders stark vermindert war.

Faßhauer, Mathias: **Einfluß der Organisation des Mikrofilamentsystems auf die Synthese von Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen**  
Halle (S.), Univ., Med. Fak., Diss. A, 80 Seiten, 1998

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielstellung</b>	<b>1</b>
1.1	Einleitung .....	1
1.2	Zielstellung.....	4
<b>2</b>	<b>Materialien und Methodik</b>	<b>5</b>
2.1	Geräte .....	5
2.2	Chemikalien .....	6
2.3	Lösungen, Puffer und Kulturmedien .....	8
2.4	Zellkultivierung.....	11
2.4.1	Zelllinie .....	11
2.4.2	Subkultivierung und Einsaat .....	11
2.4.3	Kultivierung von Wi-38-Fibroblasten zur Bestimmung des Markierungsindex.....	12
2.4.4	Kultivierung von Wi-38-Zellen zur Bestimmung der Gesamtproteinsynthese und der Synthese von c-jun, c-fos, c-myc, Cyclin D1, E und A .....	12
2.4.5	Kultivierung von Wi-38-Fibroblasten zur Darstellung der Mikrofilamente mit RH-Phalloin .....	13
2.4.6	Kultivierung von Wi-38-Fibroblasten zur Darstellung der Zellform mittels Differential-Interferenzkontrast (DIC) .....	14
2.5	Bestimmung des Markierungsindex - Autoradiographie .....	14
2.6	Bestimmung der Gesamtproteinsynthese und der Synthese von c-jun, c-fos, c-myc, Cyclin D1, E und A .....	15
2.6.1	Herstellung eines Zellsats.....	15
2.6.2	Immunpräzipitation .....	16
2.6.3	SDS-PAGE.....	17
2.6.4	Aufbereitung der Gele .....	18

2.6.5	Auswertung der Röntgenfilme .....	19
2.6.6	Datenbearbeitung.....	19
2.7	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Mikrofilamente mit RH-Phalloin .....	21
2.8	Darstellung der Zellform mit Differential-Interferenzkontrast- Mikroskopie .....	21
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1	Einfluß von Cytochalasin D, Latrunculin A und B auf die Zellform, die Organisation des Mikrofilamentsystems und den Markierungsindex von Wi-38-Fibroblasten .....	22
3.1.1	Einfluß von CD auf die Zellform .....	22
3.1.2	Einfluß von CD auf die Organisation des Mikrofilamentsystems.....	22
3.1.3	Einfluß von CD, LAT A und B auf den Markierungsindex .....	22
3.2	Nachweis der Synthese der Proto-Onkogen-Proteine und Cycline mittels Immunpräzipitation und SDS-Page.....	29
3.3	Einfluß der Konzentration von Cytochalasin D, Latrunculin A und B auf die Gesamtproteinsynthese und die Synthese von Proto-Onkogen- Proteinen und Cyclinen in exponentiell wachsenden Fibroblasten.....	30
3.4	Einfluß der Einwirkungsdauer von Cytochalasin D, Latrunculin A und B auf die Gesamtproteinsynthese und die Synthese von Proto-Onkogen- Proteinen und Cyclinen in exponentiell wachsenden Fibroblasten.....	38
3.5	Einfluß von Cytochalasin D und Latrunculin A auf die Gesamtproteinsynthese und die Synthese von Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen bei Restimulation nach Serummangel .....	46
3.6	Einfluß von Cytochalasin D auf die Gesamtproteinsynthese und die Synthese von Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen bei Restimulation durch Zelladhäsion und Zellabflachung nach Suspensionskultur .....	54

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
4.1	Verfahren zur Lösung der Aufgabenstellung .....	59
4.1.1	Auswahl der zu untersuchenden Proteine .....	59
4.1.2	Auswahl der Zelllinie .....	59
4.1.3	Bestimmung der Gesamtproteinsynthese und der Synthese von Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen .....	60
4.2	Einfluß der Organisation des Mikrofilamentsystems auf exponentiell wachsende Wi-38-Fibroblasten .....	62
4.3	Einfluß der Organisation des Mikrofilamentsystems auf die Restimulation von Wi-38-Fibroblasten nach Serummangel .....	63
4.4	Einfluß der Organisation des Mikrofilamentsystems auf die Restimulation von Wi-38-Fibroblasten nach Suspensionskultur .....	68
4.5	Modell zur Beteiligung des Mikrofilamentsystems an der Wachstumsregulation .....	68
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Thesen</b>	<b>78</b>

Lebenslauf

Erklärungen

Danksagung

## VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

[ <sup>35</sup> S]-Met	=	L-[ <sup>35</sup> S]-Methionin
[ <sup>3</sup> H]-TdR	=	Methyl-[ <sup>3</sup> H]-Thymidin
A	=	Absorption
A.p.f.	=	pyrogenfreies Wasser (Aqua pyrogene-free)
Bq	=	Bequerel (1Bq = 1 Zerfall /s = 60 dpm = 27 pCi)
CD	=	Cytochalasin D
CDK	=	Cyclin-abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
d	=	Durchmesser
D	=	Dalton (molare Masseneinheit)
DAG	=	Diacylglycerol
dFKS	=	dialysiertes Foetales Kälberserum
DG	=	Deckglas
DIC	=	Differential-Interferenzkontrast
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
E2F	=	heterodimere Transkriptionsfaktoren
EDTA	=	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	=	Enzym-Immunoassay (enzyme-linked immunosorbent assay)
FKS	=	Foetales Kälberserum
IP <sub>3</sub>	=	Inositoltriphosphat
LAT A	=	Latrunculin A
LAT B	=	Latrunculin B
ME	=	2-Mercaptoethanol
MEM	=	Zellzuchtmedium (minimum essential medium) nach Eagle
MI	=	Markierungsindex
MI <sub>c</sub>	=	kumulativer Markierungsindex
p53	=	Tumor-Suppressor-Genprodukt mit molarer Masse von 53 kD
PBS	=	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	=	Gewebekulturschale (petri dish)
PDGF	=	von Thrombozyten gebildeter Wachstumsfaktor (Platelet derived growth factor)
PMSF	=	Phenylmethylsulfonylfluorid

Poly-HEMA	=	Poly-(2-hydroxyethylmethacrylate)
PPO	=	2,5-Diphenyloxazol
pRb	=	Retinoblastoma-Antigen
PS	=	Proteinsynthese
RH-Phalloin	=	Rhodamin-Phalloin
SDS	=	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	=	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
TCA	=	Trichloressigsäure
TEMED	=	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Z	=	Zellzahl
ZD	=	Zelldichte

# 1 Einleitung und Zielstellung

## 1.1 Einleitung

Wachstum und Differenzierung sind fundamentale Aspekte multizellulärer Organismen. In den letzten beiden Jahrzehnten haben eine Reihe von Entdeckungen zum besseren Verständnis der Wachstumsregulation geführt.

Proliferatives Wachstum erfolgt in einer genauen Abfolge von Prozessen, die als Zellzyklus bezeichnet werden (CHAROLLAIS et al., 1994). Der Zellzyklus verläuft in Phasen, wobei die Phasen der DNA-Replikation (S-Phase) und der Mitose (M-Phase) durch Zwischenphasen (G-Phasen) voneinander abgetrennt werden (CROSS et al., 1989). Eine proliferierende Zelle durchläuft den Zyklus somit in der Reihenfolge: G<sub>1</sub>-S-G<sub>2</sub>-M. Am G<sub>1</sub>-/S- und G<sub>2</sub>-/M-Phase-Übergang befinden sich wichtige Kontrollpunkte, an denen der Zellzyklus erst dann fortgesetzt wird, wenn die vorherigen zellulären Prozesse ordnungsgemäß abgeschlossen wurden und so die Bedingungen für ein weiterhin erfolgreiches Durchlaufen des Zyklus gegeben sind (HARTWELL und WEINERT, 1989; ELLEDGE, 1996; WEINERT, 1997). Ruhende, nicht teilende Zellen befinden sich in der sogenannten G<sub>0</sub>-Phase (CROSS et al., 1989).

Beim proliferativen Wachstum nichttransformierter Zellen werden extrazelluläre, wachstumsfördernde Signale über zellmembranständige Rezeptoren in das Zellinnere fortgeleitet. Die dadurch ausgelöste Synthese verschiedener Proteine in genau abgestimmter Reihenfolge ermöglicht den ordnungsgemäßen Ablauf des Zellzyklus. Besondere Bedeutung kommt hierbei einer Gruppe von Proteinen zu, die als Cycline bezeichnet werden. Sie werden in bestimmten Zellzyklusabschnitten synthetisiert und verbinden sich mit von ihnen abhängigen Kinasen. Diese als CDK's (=cyclin dependent kinases) bezeichneten Enzyme werden durch diese Protein-Protein-Interaktion aktiviert (GRANA und REDDY, 1995). Cyclin/CDK-Holoenzyme phosphorylieren eine Reihe von Zielproteinen, die nun, ebenfalls aktiviert, durch ihre spezifische Funktion den Zellzyklus vorantreiben (SHERR, 1993). In der G<sub>1</sub>-Phase werden nacheinander die Cycline D1, E und A synthetisiert. Da die Cyclin-A-assoziierte Kinaseaktivität jedoch erst innerhalb der S-Phase auftritt, wird dieses Protein nicht mehr zu den G<sub>1</sub>-Cyclinen gerechnet (GRANA und REDDY, 1995). Experimentelle Studien zeigen, daß die Inhibition der Proteinfunktion durch Antikörper bzw. der Proteinneusynthese durch Antisense-cDNA/RNA von Cyclin D1 (BALDIN et al., 1993; QUELLE et al., 1993), Cyclin E (OHTSUBO et al., 1995) oder Cyclin A (GIRARD et al., 1991; PAGANO et al., 1992; ZINDY et al., 1992) zu einer Verhinderung der S-Phase führt.

Werden in G<sub>0</sub> arretierte Zellen durch Mitogene in die G<sub>1</sub>-Phase gebracht, so kommt es noch vor der Cyclin-Synthese, innerhalb der ersten Stunde nach Zugabe von Wachstumsfaktoren, zur Induktion von sogenannten „immediate early response genes“ (HESKETH, 1995). Zu dieser Gruppe von Proteinen werden die Proto-Onkogen-Produkte c-fos, c-jun und c-myc gerechnet, denen allen eine wichtige Funktion bei der G<sub>1</sub>-Phase-Progression zuerkannt wird. Für alle drei Proteine ist eine Verhinderung der S-Phase beschrieben worden, wenn die jeweilige Proteinfunktion durch Antikörper (IGUCHI-ARIGA et al., 1987; KOVARY und BRAVO, 1991b) bzw. die Proteinsynthese durch Antisense-cDNA/RNA (NISHIKURA und MURRAY, 1987; HEIKKILA et al., 1987; SMITH und PROCHOWNIK, 1992) unterbunden wurde.

Neben den diskutierten positiven Wachstumsregulatoren sind mehrere Proteine beschrieben worden, welche eine Hemmung des Zellzyklus bewirken. Neben extrazellulären wachstumshemmenden Faktoren sind vor allem die intrazellulär wirksamen Tumor-Suppressor-Genprodukte p53 und pRb sowie CDK-Inhibitoren als Zellzyklushemmer zu nennen. Der Wachstumshemmung kann eine Differenzierung der Zellen oder der programmierte Zelltod folgen (CHIARUGI et al., 1994).

Neben der oben beschriebenen positiven und negativen Wachstumskontrolle durch extrazelluläre Faktoren, Cycline, Proto-Onkogen-Proteine und Tumor-Suppressor-Genprodukte spielt die **zellformabhängige** Wachstumsregulation eine wichtige Rolle (FOLKMAN und MOSCONA, 1978). Untersuchungen in der Arbeitsgruppe „Wachstum und Differenzierung“ des hiesigen Institutes für Physiologische Chemie zu dieser Form der Wachstumsregulation haben ergeben, daß viele nichttransformierte Zellen verschiedener Herkunft erst dann in die S-Phase eintreten können, wenn drei Bedingungen erfüllt sind (IWIG und GLAESSER, 1991; IWIG et al., 1995):

1. Die Anhaftung an ein geeignetes Substratum muß gewährleistet sein. Diese Bedingung für die Zellteilung wird auch als „anchorage dependence“ bezeichnet (STOKER et al., 1968).
2. Nach der Zellhaftung muß es zu einer Zellabflachung kommen. Zellabrundung führt zum DNA-Synthese-Stopp.
3. Intakte Mikrofilamente müssen vorliegen. Kommt es zur Desintegration der Mikrofilamente, wird der Neueintritt von Zellen in die S-Phase verhindert.

Mikrofilamente bilden zusammen mit den Intermediärfilamenten und Mikrotubuli ein die Zellen durchspannendes Netz von filamentären Strukturen, das sogenannte Cytoskelett. Sie sind an einer Reihe von zellulären Prozessen, wie Zell-Substratum-Kontakt, Zellbewegung und Morphogenese beteiligt (IWIG und GLAESSER, 1987).

Ein wesentlicher Bestandteil der Mikrofilamente ist das Aktin. Monomeres G-Aktin hat eine molare Masse von 43-45 kD und besteht aus einer größeren und einer kleineren Domäne. Es kann sich durch reversible Polymerisation zu größeren filamentären Einheiten zusammenlagern und wird dann als F-Aktin bezeichnet. F-Aktin besitzt ein Kopf-(Minus-) und ein Schwanz-(Plus-) Ende, wobei die Verlängerung der filamentären Strukturen fast immer vom Schwanz, durch Anlagerung von ATP-G-Aktin, erfolgt. In haftenden, abgeflachten Zellen liegt das F-Aktin in parallel angeordneten Strukturen vor, die neben Aktin auch Myosin, Tropomyosin und, zur Verknüpfung,  $\alpha$ -Aktinin enthalten. Diese Strukturen, welche den Aufbau von Sarkomeren aufweisen, werden als „stress fibers“ bezeichnet (SANGER et al., 1983; IWIG und GLAESSER, 1990).

**Cytochalasine**, eine Gruppe von Pilzmetaboliten, die spezifisch mit Aktin interagieren und zu einer Umorganisation des Mikrofilamentsystems führen, haben sich beim Studium der Mikrofilamentfunktion als hilfreich erwiesen. Die Filamentelongation wird durch Anlagerung der Cytochalasine v.a. am Schwanz-(Plus-) Ende des F-Aktin verhindert (BONDER und MOOSEKER, 1986; COOPER, 1987). Werden Zellen mit niedrigen Konzentrationen von Cytochalasin versetzt, so kommt es zur Desintegration von „stress fibers“. Die dabei auftretenden Aggregate aus Aktinfilamenten werden als „foci“ bezeichnet (SCHLIWA, 1982; AITA, 1989). Bei Zugabe hoher Konzentrationen von Cytochalasin kommt es zu starken Zellformveränderungen mit wurzelförmigen Zellausläufern. Dieser Zustand, welcher mit dem Verschwinden fast aller „stress fibers“ und einer Abrundung des perinukleären Zellabschnittes einhergeht, wird als „arborized state“ bezeichnet (SCHLIWA, 1982; IWIG und GLAESSER, 1987). Werden die Mikrofilamente durch Cytochalasine alteriert, so kommt es zu einer Hemmung des proliferativen Wachstums nichttransformierter Zellen (McPHERSON und RAMACHANDRAN, 1980; SELDEN et al., 1981; OHTA et al., 1985; IWIG und GLAESSER, 1985, 1990; IWIG et al., 1995). Ein besonders wichtiger Befund in diesem Zusammenhang ist, daß durch Alteration des Mikrofilamentsystems der Eintritt der Zellen in die S-Phase, nicht jedoch das Durchlaufen der S-Phase, gehemmt wird. Desweiteren wurde eine Abnahme der Gesamtproteinsynthese nach Cytochalasininkubation beobachtet (OHTA et al., 1985; FEY et al., 1986; ORNELLES et al., 1986; IWIG et al., 1995).

**Latrunculine** sind eine weitere Gruppe von Substanzen, die das Mikrofilamentsystem alterieren. Sie wurden aus einem Schwamm des Roten Meeres „*Latrunculia magnifica*“ isoliert. Im Gegensatz zu Cytochalasinen wirken Latrunculine wahrscheinlich dadurch, daß sie mit G-Aktin im Verhältnis 1:1 komplexieren. Bei

Inkubation mit hohen Latrunculinkonzentrationen ist, ähnlich wie bei Cytochalasin D, ein „arborized state“ zu beobachten. In verschiedenen Experimenten erwiesen sich Latrunculine als wirksamer im Vergleich zu Cytochalasin D (COUE et al., 1987; SPECTOR et al., 1989). SPECTOR et al. beschrieben 1989 eine Hemmung der Zellteilung von Hamsterfibroblasten nach Einwirkung von Latrunculinen. Die beschriebene Hemmung der DNA-Synthese konnte später auch an bovinen Linsenepithelzellen nachgewiesen werden (IWIG et al., 1995).

## 1.2 Zielstellung

Untersuchungen zur zellformabhängigen Wachstumsregulation an verschiedenen nichttransformierten Zelllinien haben ergeben, daß intakte Mikrofilamente Voraussetzung für das Durchlaufen des Zellzyklus sind.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob **intakte Mikrofilamente** auch notwendig für den G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-S-Phase-Übergang von Wi-38-Fibroblasten sind. Die Auswirkung der Alteration des Mikrofilamentsystems durch Cytochalasin D, Latrunculin A und B auf das Proliferationsverhalten dieser Zellen wurde deshalb bestimmt. Mit Hilfe der [<sup>3</sup>H]-TdR-Markierung und anschließender Autoradiographie konnten dabei DNA-synthetisierende Fibroblasten von Zellen unterschieden werden, welche sich im Markierungszeitraum nicht in der S-Phase befanden. Der Anteil der DNA-synthetisierenden Fibroblasten an der ausgezählten Gesamtzellzahl wurde als Markierungsindex bezeichnet.

Das Mikrofilamentsystem alterierende Substanzen, wie Cytochalasin D, Latrunculin A bzw. B, verhindern den Eintritt der Zellen in die S-Phase, nicht jedoch die laufende DNA-Synthese. Um sich der Ursache für diese Verhinderung des G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-S-Phase-Übergangs zu nähern, wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht, wie sich die Desintegration des Mikrofilamentsystems auf die Gesamtproteinsynthese und die Synthese von einzelnen Proteinen, denen eine wichtige Funktion bei der G<sub>1</sub>-Phase-Progression bzw. S-Phase-Initiierung zugeschrieben wird, auswirkt. Dazu wurden die Proto-Onkogen-Proteine c-fos, c-jun, c-myc sowie die Cycline D1, E und A ausgewählt und ihre Synthesen bei Alteration des Mikrofilamentsystems bestimmt. Immunpräzipitation, SDS-PAGE, Autoradiographie und eine sich daran anschließende densitometrische Auswertung der interessierenden Banden wurden dabei als Methoden genutzt. Durch Vergleich der Bandenschwärzungen konnte dann festgestellt werden, ob sich bei Alteration des Mikrofilamentsystems Änderungen in der Synthese der untersuchten Proteine ergaben.

## 2 Materialien und Methodik

### 2.1 Geräte

- Analysenwaage FA 110-4i; FAUST, Köln
- Begasungsbrutschrank CB 210; WTB BINDER LABORTECHNIK, Tuttlingen
- Begasungsbrutschrank SBS-22; MYTRON, Heiligenstadt
- Computerprogramm „BASys“, Ver. 1D/2.38; BIOTECH-FISCHER, Reiskirchen
- Computerprogramm „MOVIE Machine II“; FAST MULTIMEDIA AG, München
- Computerprogramm „SigmaPlot“; JANDEL SCIENTIFIC, Corte Madera, USA
- Deckglas (20x20 mm) (DG); TECHNISCHES GLAS ILMENAU
- Durchlichtmikroskop Amplival; CARL ZEISS, Jena
- Elektrophoresekammer; SIGMA, Deisenhofen
- Elektrophoresenetzgerät 2297 Macrodrive 5; LKB, Bromma, Schweden
- Filme AGFAPAN APX 400 und APX 100; AGFA-GEVAERT AG, Leverkusen
- Flüssigkeitsszintillationszähler LS 6000SC; BECKMAN, Fullerton, USA
- Fotokassette für die Autoradiographie mit Verstärkerfolien (Dupont Cronex Lightning Plus); SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
- FUCHS-ROSENTHAL-Zählkammer; FEIN-OPTIK, Bad Blankenburg
- Gelgießkammer; SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
- Geltrockner 2003; LKB, Bromma, Schweden
- Gewebekulturflaschen (250 ml); GREINER LABORTECHNIK, Frickenhausen
- Gewebekulturschalen (35/10 mm); GREINER LABORTECHNIK, Frickenhausen
- Horizontalschüttler HS250; IKA, Staufen
- Kamera CP-7m; CHINON, Tokyo, Japan
- Laminarbox mit vertikaler Luftführung; ZFT MIKROELEKTRONIK, Dresden
- Laser Scan Mikroskop LSM 410 invert; CARL ZEISS, Jena
- Magnetrührer mit Heizplatte RET IKAMAG; IKA, Staufen
- Markierte Objektträger (für den Immunfluoreszenztest); H.HÖLZEL, Dorfen
- Medizinischer Röntgenfilm XBD; FOTOCHEMISCHE WERKE, Berlin
- Mikrozentrifuge 5415 C; EPPENDORF-NETHELER-HINZ GmbH, Hamburg
- Objektträger (76x26 mm); TECHNISCHES GLAS ILMENAU
- pH-Meter PHM 210; RADIOMETER, Kopenhagen, Dänemark
- Reaktionsgefäß Eppendorf Safe-Lock (1,5 ml und 2,0 ml);  
EPPENDORF-NETHELER-HINZ GmbH, Hamburg
- Vakuumpumpe DS E8; MLW LABORTECHNIK, Ilmenau
- Vakuumentrocknungsanlage HETOVAC; HETO, Allerød, Dänemark
- Vibro-Fix VF1; IKA, Staufen

- Wasseraufbereitungsanlage Milli QPF Plus; MILLIPORE GmbH, Eschborn
- Zellschaber (steril); GREINER LABORTECHNIK, Frickenhausen

## 2.2 Chemikalien

- 2,5-Diphenyloxazol (PPO); NEW ENGLAND NUCLEAR, Boston, USA
- 2-Mercaptoethanol (ME); FLUKA, Buchs, Schweiz
- A300 saures Fixiersalz; FOTOCHEMISCHES KOMBINAT WOLFEN
- Agfa Agefix (Fixierer); AGFA-GEVAERT AG, Leverkusen
- Ameisensäure; LABORCHEMIE APOLDA
- Ammoniumpersulfat; SIGMA, Deisenhofen
- Anti-c-fos-Antikörper (Ab-2); DIANOVA; Hamburg
- Anti-c-jun-Antikörper (Ab-2); DIANOVA; Hamburg
- Anti-c-myc-Antikörper (Ab-3); DIANOVA; Hamburg
- Anti-Cyclin A-Antikörper (Ab-2); DIANOVA; Hamburg
- Anti-Cyclin D1-Antikörper (Ab-2); DIANOVA; Hamburg
- Anti-Cyclin E-Antikörper; PHARMINGEN, Hamburg
- Aprotinin; SIGMA, Deisenhofen
- Aqua PolyMount<sup>®</sup>; POLYSCIENCES, Eppelheim
- Bromphenolblau; MERCK, Darmstadt
- Cystin; SIGMA, Deisenhofen
- Cytochalasin D (rein); SERVA, Heidelberg
- Desoxycholsäure; SIGMA, Deisenhofen
- Dialysiertes Foetales Kälberserum (dFKS); SIGMA, Deisenhofen
- Digitonin; ARZNEIMITTELWERK DRESDEN
- Dimethylsulfoxid (DMSO); SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
- Essigsäure; LABORCHEMIE APOLDA
- Ethanol, unvergällt (96 %ig); LABORCHEMIE APOLDA
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); SIGMA, Deisenhofen
- Foetales Kälberserum (FKS); C.C. PRO, Neustadt/W.
- Formaldehyd-Stammlösung (16 %ig); POLYSCIENCES, Eppelheim
- Fotoemulsion (Kernemulsion K6); FOTOCHEMISCHES KOMBINAT WOLFEN
- GIEMSA-Stammlösung; LABORCHEMIE APOLDA
- Glutamin-Stammlösung (200 mmol/l); SIGMA, Deisenhofen
- Glykokoll; ISOCOMMERZ, Herzberg
- Hanks-Salzlösung ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> (H8389); SIGMA, Deisenhofen
- Isopropanol (rein); LABORCHEMIE APOLDA
- Kanadabalsam; SIGMA, Deisenhofen

- Kaninchen-Anti-Maus-IgG (präabsorbiert gegen menschliches Serum; 1,8 mg/ml);  
DIANOVA; Hamburg
- Kaninchen-IgG (28,5 mg/ml); DIANOVA; Hamburg
- L-[<sup>35</sup>S]-Methionin ([<sup>35</sup>S]-Met; 43,48 TBq/mmol; 370 MBq/ml);  
NEN LIFE SCIENCE PRODUCTS, Brüssel, Belgien
- Latrunculin A/ Latrunculin B; Prof. Ilan Spector, Tel Aviv University, Israel
- Leupeptin; SIGMA, Deisenhofen
- Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>); LABORCHEMIE APOLDA
- Maus-IgG; SIGMA, Deisenhofen
- Methanol; LABORCHEMIE APOLDA
- Methyl-[<sup>3</sup>H]-Thymidin ([<sup>3</sup>H]-TdR; 74 GBq/mmol; 37 MBq/ml),  
NEN LIFE SCIENCE PRODUCTS, Brüssel, Belgien
- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED); SIGMA, Deisenhofen
- Natriumchlorid (NaCl); LABORCHEMIE APOLDA
- Natriumdesoxycholat; SIGMA, Deisenhofen
- Natriumdihydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O); LABORCHEMIE APOLDA
- Natriumdodecylsulfat (SDS); SERVA, Heidelberg
- Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O); LABORCHEMIE APOLDA
- Natronlauge (NaOH); MERCK, Darmstadt
- Pansorbin-Stammlösung (50 %ig, Bindungskapazität: 2 mg IgG/ml);  
CALBIOCHEM-NOVABIOCHEM, Bad Soden
- Pepstatin; SIGMA, Deisenhofen
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); MERCK, Darmstadt
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, Trockensubstanz); SIFIN, Berlin
- Poly-HEMA (Poly-[2-hydroxyethylmethacrylate]); SIGMA, Deisenhofen
- Repro-Entwickler A71; FOTOCHEMISCHES KOMBINAT WOLFEN
- Rhodamin-Phalloin (RH-Phalloin); Prof. Th. Wieland, Max-Planck-Institut für  
medizinische Forschung, Heidelberg
- Rinderserumalbumin; SERVA, Heidelberg
- Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 30; ROTH, Karlsruhe
- Salzsäure (HCl); LABORCHEMIE APOLDA
- Thymidin; CALBIOCHEM, Los Angeles, USA
- Trichloressigsäure (TCA); MERCK, Darmstadt
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris); FLUKA, Buchs, Schweiz
- Triton X-100; SERVA, Heidelberg
- Trypsin-EDTA (0,25 %ig); SIGMA, Deisenhofen

- Ultima Gold<sup>®</sup>; PACKARD INSTRUMENT COMPANY, Meriden, USA
- Zellzuchtungsmedium nach Eagle (MEM) mit Earle-Salzlösung ohne Glutamin, Cystin und Methionin (M2289); SIGMA, Deisenhofen
- Zellzuchtungsmedium nach Eagle (MEM) mit Hank´s-Salzlösung (M5775); SIGMA, Deisenhofen

### 2.3 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

- Ammoniumpersulfatlösung (10 %): 100 mg Ammoniumpersulfat wurden in 1 ml A.p.f. gelöst
- Aprotinin-Stammlösung (10 mg/ml): 10 mg Aprotinin wurden in 1 ml A.p.f. gelöst
- Bromphenolblau-Stammlösung (10 mg/ml): 100 mg Bromphenolblau wurden in 10 ml Ethanol (20 %ig) gelöst
- Cystin-Stammlösung (10 mmol/l): 24 mg Cystin wurden in 10 ml 0,02N HCl gelöst
- Cytochalasin D-Stammlösung (8 mmol/l): 5 mg CD (Mr 507,6) wurden in 1,23 ml Ethanol (96 %ig) gelöst; Gebrauchslösungen in folgenden Konzentrationen wurden durch Verdünnung mit Ethanol (96 %ig) aus dieser Stammlösung hergestellt: 2 mmol/l; 200 µmol/l; 20 µmol/l; 2 µmol/l
- Digitonin-Stammlösung (6 mg/ml): 6 mg Digitonin wurden in 1 ml Methanol gelöst; die Gebrauchslösung (12 µg/ml) wurde aus dieser Stammlösung durch 1:500 Verdünnung mit Puffer A (1 ml Stammlösung + 499 ml Puffer A) hergestellt
- Ethanollösung (unvergällt; 25 %ig): unvergällter Ethanol (96 %ig) wurde durch Verdünnung mit A.p.f. auf die entsprechende Konzentration eingestellt
- Formaldehyd-Gebrauchslösung (2 %ig, pH 7,4): die Formaldehyd-Stammlösung (16 %ig) wurde durch 1:8 Verdünnung mit Puffer A (1 ml Stammlösung + 7 ml Puffer A) auf die entsprechende Konzentration (2 %) und mit 1N NaOH auf den pH=7,4 eingestellt
- Gelfixierlösung: Methanol (30 %) - Ameisensäure (1 %); 300 ml Methanol und 10 ml Ameisensäure wurden mit A.p.f. auf 1 l Gesamtvolumen verdünnt
- Gelpuffer (pH 8,8): Tris (1,5 mol/l) - SDS (0,4 %); 181,5 g Tris und 4 g SDS wurden in A.p.f. gelöst (Endvolumen: 1 l) und mit 1N HCl auf den pH=8,8 eingestellt
- GIEMSA-Entfärbelösung: 7 ml Phosphatpuffer (150 mmol/l; pH 7,4) und 98 ml A.p.f. wurden gemischt
- GIEMSA-Färbelösung: 7 ml Phosphatpuffer (150 mmol/l; pH 7,4), 98 ml A.p.f. und 4,4 ml GIEMSA-Stammlösung wurden gemischt
- Kulturmedium (MEM + 20 % FKS): 800 ml MEM und 200 ml FKS wurden unter sterilen Bedingungen gemischt

- Latrunculin A (LAT A)-Stammlösung (10 mmol/l): 2,5 mg LAT A (Mr 417) wurden in 0,6 ml Ethanol (96 %ig) gelöst; Gebrauchslösungen in folgenden Konzentrationen wurden durch Verdünnung mit Ethanol (96 %ig) aus dieser Stammlösung hergestellt: 2 mmol/l; 200 µmol/l; 20 µmol/l; 2 µmol/l
- Latrunculin B (LAT B)-Stammlösung (10 mmol/l): 2,2 mg LAT B (Mr 397) wurden in 0,55 ml Ethanol (96 %ig) gelöst; Gebrauchslösungen in folgenden Konzentrationen wurden durch Verdünnung mit Ethanol (96 %ig) aus dieser Stammlösung hergestellt: 2 mmol/l; 200 µmol/l; 20 µmol/l; 2 µmol/l
- Laufpuffer (pH 8,8): Tris (25 mmol/l) - Glykokoll (0,192 mol/l) - SDS (0,1 %); 3,02 g Tris, 14,4 g Glykokoll und 1 g SDS wurden in A.p.f. gelöst (Endvolumen: 1 l) und mit 1N HCl auf den pH=8,8 eingestellt
- Leupeptin-Stammlösung (1 mg/ml): 1 mg Leupeptin wurden in 1 ml A.p.f. gelöst
- Methioninfreies Kulturmedium (methioninfreies MEM + 20 % dFKS): 780 ml MEM ohne Cystin, Glutamin und Methionin wurden mit 200 ml dFKS, 10 ml Glutamin-Stammlösung (Endkonzentration: 2 mmol/l) und 10 ml Cystin-Stammlösung (Endkonzentration: 0,1 mmol/l) unter sterilen Bedingungen gemischt
- Methioninfreies Serummangelmedium (methioninfreies MEM + 0,5 % dFKS): 975 ml MEM ohne Cystin, Glutamin und Methionin wurden mit 5 ml dFKS, 10 ml Glutamin-Stammlösung (Endkonzentration: 2 mmol/l) und 10 ml Cystin-Stammlösung (Endkonzentration: 0,1 mmol/l) unter sterilen Bedingungen gemischt
- Pansorbin-Gebrauchslösung (20 %ig, Bindungskapazität: 0,8 mg IgG/ml): 800 µl Pansorbin-Stammlösung wurden 3 x mit 1200 µl Waschpuffer C gewaschen, das Sediment wurde dann mit 1600 µl Waschpuffer C auf 2000 µl aufgefüllt
- PBS-Lösung: 47,8 g Trockensubstanz wurden in 5 l A.p.f. gelöst
- Pepstatin-Stammlösung (1 mg/ml): 1 mg Pepstatin wurden in 1 ml Methanol gelöst
- Phosphatpuffer (150 mmol/l; pH 7,4): 21,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O und 3,68 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O wurden in 1 l A.p.f. gelöst
- PMSF-Stammlösung (0,1 mol/l): 17 mg PMSF wurden in 1 ml Isopropanol (rein) gelöst
- Poly-HEMA-Stammlösung (0,1 mol/l): 1,3 mg Poly-HEMA wurden in 100 ml Ethanol (96 %ig) bei 37°C gelöst
- PPO-Lösung (20 %ig): 10 g PPO wurden in 50 ml DMSO gelöst
- Proteinlösungsmittel (pH 6,8): Tris (62,5 mmol/l) - Glykokoll (10 %) - SDS (2,3 %) - Bromphenolblau (0,1 mg/ml) - ME (1 %); 75,6 mg Tris, 1 g Glycerin, 230 mg SDS, 100 µl Bromphenolblau - Stammlösung und 100 µl ME wurden in A.p.f. gelöst (Endvolumen: 10 ml) und mit 1N HCl auf den pH=6,8 eingestellt

- Puffer A (pH 7,4): Tris (10 mmol/l) - NaCl (140 mmol/l) - MgCl<sub>2</sub> (5 mmol/l); 1,21 g Tris, 8,12 g NaCl und 1,02 g MgCl<sub>2</sub> wurden in A.p.f. gelöst (Endvolumen: 1 l) und mit 1N HCl auf den pH=7,4 eingestellt
- Rhodamin-Phalloin-Stammlösung (200 µg/ml): 1 mg Rhodamin-Phalloin wurde in 5 ml Puffer A gelöst; die Gebrauchslösung (0,4 µg/ml) wurde aus dieser Stammlösung durch 1:500 Verdünnung mit Puffer A hergestellt; dazu wurde die Stammlösung zunächst 1:20 mit Puffer A verdünnt (50 µl Stammlösung + 950 µl Puffer A); diese Lösung wurde erneut 1:5 verdünnt (200 µl + 800 µl Puffer A); durch nochmalige 1:5 Verdünnung mit Puffer A, ergab sich dann die Gesamtverdünnung der Stammlösung von 1:500
- Rinderserumalbumin-Gebrauchslösung (10 %ig): 1 g Rinderserumalbumin wurde in 10 ml A.p.f. gelöst
- RIPA-Lysierpuffer (pH 7,5): Tris (10 mmol/l) - NaCl (150 mmol/l) - SDS (0,1 %) - Triton X-100 (1 %) - Natriumdesoxycholat (0,5 %) - EDTA (1 mmol/l) - PMSF (1 mmol/l) - Aprotinin (10 µg/ml) - Leupeptin (10 µg/ml) - Pepstatin (10 µg/ml); 121 mg Tris, 876 mg NaCl, 100 mg SDS, 1 g Triton X-100, 500 mg Natriumdesoxycholat, 30 mg EDTA wurden in A.p.f. gelöst (Endvolumen: 100 ml) und mit 1N HCl auf den pH=7,5 eingestellt, dann wurden dem Puffer 100 µl Aprotinin-Stammlösung und je 1 ml PMSF-, Leupeptin- und Pepstatin-Stammlösung zugesetzt
- Sammelgelpuffer (pH 6,8): Tris (0,5 mol/l) - SDS (0,4 %); 60,5 g Tris und 4 g SDS wurden in A.p.f. gelöst (Endvolumen: 1 l) und mit 1N HCl auf den pH=6,8 eingestellt
- Serummangelmedium (MEM + 0,5% FKS): 995 ml MEM und 5 ml FKS wurden unter sterilen Bedingungen gemischt
- Trichloressigsäure-Stammlösung (20 %ig): 20 g TCA wurde in 100 ml A.p.f. gelöst; Gebrauchslösungen in folgenden Konzentrationen wurden durch Verdünnung mit A.p.f. aus dieser Stammlösung hergestellt: 5 %; 1 %
- Waschpuffer A (pH 7,5): Tris (10 mmol/l) - NaCl (150 mmol/l) - Triton X-100 (0,2 %) - EDTA (2 mmol/l); 121 mg Tris, 876 mg NaCl, 200 mg Triton X-100, 60 mg EDTA wurden in A.p.f. gelöst (Endvolumen: 100 ml) und mit 1N HCl auf den pH=7,5 eingestellt
- Waschpuffer B (pH 7,5): Tris (10 mmol/l) - NaCl (500 mmol/l) - Triton X-100 (0,2 %) - EDTA (2 mmol/l); 121 mg Tris, 2,92 g NaCl, 200 mg Triton X-100, 60 mg EDTA wurden in A.p.f. gelöst (Endvolumen: 100 ml) und mit 1N HCl auf den pH=7,5 eingestellt

- Waschpuffer C (pH 7,5): Tris (10 mmol/l); 121 mg Tris wurden in 100 ml A.p.f. gelöst und mit 1N HCl auf den pH=7,5 eingestellt

## **2.4 Zellkultivierung**

### 2.4.1 Zelllinie

Wi-38-Zellen (embryonale Lungenfibroblasten vom Menschen);

BOEHRINGER-INGELHEIM BIOPRODUCTS, Heidelberg

Charge: BIOWHITTAKER 7CB0614; 6C3917; 6CB0609

Die für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten Wi-38-Fibroblasten wurden von L. Hayflick aus dem Lungengewebe eines 3 Monate alten weiblichen Embryos isoliert. Die Fibroblasten sind nichttransformiert, weisen eine endliche Lebenszeit auf ( $50 \pm 10$  Populationen) und besitzen einen diploiden Karyotyp. Wi-38-Zellen haben sich durch diese Merkmale als Modell für eine normale humane diploide Zelllinie etabliert. Nach ca. 50 Populationen kommt es zur Unfähigkeit der Zellen, trotz Wachstumsfaktorenzugabe, die S-Phase zu durchlaufen. Dieser Vorgang, welcher mit einem dramatischen Anstieg der Zellgröße einhergeht, wird als Altern bezeichnet. Wi-38-Fibroblasten wachsen nicht in Suspension (HAYFLICK und MOORHEAD 1961; HAYFLICK 1965).

Die in unseren Versuchen verwendeten Zellen wurden in Passage 10 gekauft. Sie durchliefen dann maximal 7 weitere Subkultivierungen, so daß der Alterungsvorgang keine wesentliche Rolle spielen dürfte.

### 2.4.2 Subkultivierung und Einsaat

Die Fibroblasten wurden in Kulturmedium unter sterilen Bedingungen kultiviert.

Die Subkultivierung erfolgte, wenn die Zellen in ausreichender Dichte in der Gewebekulturflasche vorlagen. Das Kulturmedium wurde vorsichtig abgegossen. Der am Boden der Gewebekulturflasche haftende Zellbelag wurde dann zweimal für je 1 Minute mit Hanks-Salzlösung ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei), anschließend mit ca. 5 ml Trypsin-EDTA gespült. Nach 1 Minute wurde das Trypsin bis auf einen dünnen Restfilm abgegossen. Der Trypsinfilm wurde solange unter Sicht über den Zellbelag geschwenkt, bis es zum Ablösen der Zellen vom Boden der Gewebekulturflasche kam. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium suspendiert. Dabei wurde das Trypsin durch das im Kulturmedium vorhandene foetale Kälberserum inaktiviert. Um die Zellen in einer für die folgenden Versuche geeigneten Zelldichte zu erhalten, mußte die Zellzahl (Z/ml) in der Suspension durch Zellzählung in einer FUCHS-ROSENTHAL-Zählkammer bestimmt werden. Durch Zugabe von Kulturmedium konnte dann die gewünschte Zellkonzentration eingestellt werden.

#### 2.4.3 Kultivierung von Wi-38-Fibroblasten zur Bestimmung des Markierungsindex

Die Zellkonzentration wurde auf 50 000 Z/ml eingestellt. Pro Versuchsansatz wurden von dieser Zellsuspension 200 µl auf je zwei Deckgläser (20 x 20 mm) pipettiert, die in Gewebekulturschalen lagen. Nach erfolgter Zellanhaftung wurden die Deckgläser mit 2 ml Kulturmedium überschichtet und 16 Stunden im Begasungsbrutschrank vorkultiviert.

##### **Einfluß der Inkubationszeit von CD und LAT B auf den MI:**

Nach Ablauf der Vorkulturperiode wurden CD oder LAT B (jeweils 1 µmol/l) für unterschiedliche Zeiten zugegeben. Die radioaktive Markierung erfolgte mit [<sup>3</sup>H]-TdR (37 kBq/ml) für 2 Stunden am Ende jeder Kulturperiode. Die Präparate wurden danach für die Autoradiographie aufgearbeitet (s.Kap.2.5, S.14).

##### **Einfluß von CD und LAT A auf die Reaktivierung von Wi-38-Fibroblasten nach Serummangelmedium:**

Nach einer Vorkultur von 16 Stunden wurde den Zellen für 60 Stunden Serummangelmedium (MEM + 0,5 % FKS) zugegeben. Die Restimulierung mit Kulturmedium (MEM + 20 % FKS) erfolgte in An- und Abwesenheit von CD (1 µmol/l) und LAT A (1 µmol/l). Sie wurde über 24 Stunden verfolgt. Zur Bestimmung des kumulativen Markierungsindex (MI<sub>c</sub>) wurde [<sup>3</sup>H]-TdR (18,5 kBq/ml) unmittelbar nach Restimulation zugegeben. Zu den angegebenen Zeiten erfolgte die Aufarbeitung der Präparate für die Autoradiographie (s.Kap.2.5, S.14).

Die durch Einwirkung hoher Effektorkonzentrationen ( $\geq 1\mu\text{mol/l}$ ) eingetretene Zellabrundung mußte für die autoradiographische Auswertung der Präparate beseitigt werden. Dazu wurde, nach Abschluß der Inkubation mit [<sup>3</sup>H]-TdR, ein Mediumwechsel mit einem Kulturmedium durchgeführt, dem keine Effektoren, jedoch zur Isotopenverdünnung, nicht radioaktiv markiertes Thymidin (1 mmol/l) zugesetzt wurde. Dieses Medium ermöglichte die Zellabflachung und stoppte den weiteren Einbau von Radioaktivität.

#### 2.4.4 Kultivierung von Wi-38-Zellen zur Bestimmung der Gesamtproteinsynthese und der Synthese von c-jun, c-fos, c-myc, Cyclin D1, E und A

Die Zellkonzentration wurde auf 150 000 Z/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 2 ml pro Gewebekulturschale verwendet. Nach vollständiger Anhaftung der Zellen am Gewebekulturschalenboden wurde das Kulturmedium abgesaugt und 2 ml frisches Kulturmedium zugegeben. Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank für 16 Stunden vorkultiviert.

### **Einfluß der Konzentration und Inkubationszeit von CD, LAT A und B auf exponentiell wachsende Wi-38-Fibroblasten:**

Nach Ablauf der Vorkulturperiode wurden die Effektoren (CD, LAT A oder B) in unterschiedlichen Konzentrationen (0,01-10 µmol/l) bzw. für unterschiedliche Inkubationszeiten (1-8 h) zugegeben. Die Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Met (7,4 MBq/ml) erfolgte für 1 Stunde am Ende der Inkubation.

### **Einfluß von CD und LAT A auf die Reaktivierung von Wi-38-Fibroblasten nach Serummangelmedium:**

Nach einer Vorkultur von 16 Stunden in serumhaltigem Medium wurden die Wi-38-Fibroblasten für 60 Stunden in einem Serummangelmedium (MEM + 0,5 % FKS) kultiviert. Die Restimulierung erfolgte mit Kulturmedium (MEM + 20 % FKS) in An- und Abwesenheit von CD (1 µmol/l) bzw. LAT A (1 µmol/l). Unterschiedliche Zeiten (1-16 h) nach Reaktivierung erfolgte die [<sup>35</sup>S]-Met-Markierung (7,4 MBq/ml) für 1 Stunde.

### **Einfluß von CD auf die Reaktivierung von Wi-38-Fibroblasten nach Suspensionskultur:**

Zunächst wurden Gewebekulturschalen nach einem von FOLKMAN und MOSCONA (1978) beschriebenen Verfahren mit Poly-HEMA beschichtet. Hierzu wurden 0,9 ml Poly-HEMA-Stammlösung (0,1 mol/l) in Gewebekulturschalen eingebracht. Die Poly-HEMA-beschichteten Gewebekulturschalen wurden für mindestens 24 Stunden bei 37°C getrocknet. Dabei entstand ein fester Poly-HEMA-Film, der die Zellhaftung verhinderte. Vor Gebrauch wurden die beschichteten Gewebekulturschalen 3 x 5 Minuten mit Kulturmedium gespült.

Von der Zellsuspension wurden 2 ml in die mit Poly-HEMA beschichteten Gewebekulturschalen gegeben. Nach einer Kultivierung in Suspension für 12 Stunden wurden die Zellen in unbeschichtete Gewebekulturschalen überführt. Die Reaktivierung nach Suspension wurde über 16 Stunden verfolgt. Sie erfolgte sowohl in Anwesenheit von CD (1 µmol/l) als auch in Abwesenheit von Effektoren. Die [<sup>35</sup>S]-Met-Markierung (7,4 MBq/ml) wurde für 1 Stunde am Ende jeder Inkubationsperiode vorgenommen.

#### 2.4.5 Kultivierung von Wi-38-Fibroblasten zur Darstellung der Mikrofilamente mit RH-Phalloin

Die Zellkonzentration wurde auf 50 000 Z/ml eingestellt. Pro Versuchsansatz wurden von dieser Zellsuspension 20 µl auf markierte Objektträger pipettiert, die in Gewebekulturschalen lagen. Nach 1 Stunde wurden die markierten Objektträger mit 2ml Kulturmedium überschichtet. Die Vorkulturdauer in einem Begasungsbrutschrank

betrug 16 Stunden. Dann wurde CD in unterschiedlichen Konzentrationen (0,01  $\mu\text{mol/l}$  - 10  $\mu\text{mol/l}$ ) für 2 Stunden zugegeben.

#### 2.4.6 Kultivierung von Wi-38-Fibroblasten zur Darstellung der Zellform mittels Differential-Interferenzkontrast (DIC)

Die Zellkonzentration wurde auf 50 000 Z/ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden pro Versuchsansatz 200  $\mu\text{l}$  auf Deckgläser (20 x 20 mm), die in Gewebekulturschalen lagen, pipettiert. Nach Anhaftung der Zellen wurden die Deckgläser mit 2 ml Kulturmedium überschichtet. Die Vorkulturdauer in einem Begasungsbrutschrank betrug 16 Stunden. Danach wurde CD in unterschiedlichen Konzentrationen (0,01  $\mu\text{mol/l}$  - 10  $\mu\text{mol/l}$ ) für 2 Stunden zugegeben.

#### **2.5 Bestimmung des Markierungsindex - Autoradiographie**

Nachdem die Inkubation mit [ $^3\text{H}$ ]-TdR beendet war, wurde das nichtinkorporierte radioaktive Thymidin durch folgendes Extraktionsverfahren entfernt:

- Absaugen des Mediums
- 2 x Spülen der DG mit PBS
- Extraktion mit 5 %iger TCA-Gebrauchslösung für 30 Minuten bei 4°C
- 2 x Spülen der DG mit 1 %iger TCA-Gebrauchslösung
- 3 x Spülen der DG mit A.p.f.
- 2 x Spülen der DG mit Ethanol (96 %)

Die Deckgläser wurden anschließend an der Luft getrocknet. Dann wurden sie mit Hilfe von Kanadabalsam auf einem Objektträger mit dem Zellbelag nach oben fixiert.

Danach wurden die Objektträger in einer Dunkelkammer in die auf 37°C erwärmte Fotoemulsion getaucht und für 2 Stunden zum Trocknen aufgehängt. Anschließend wurden die Präparate in einen Präparatekasten gelegt, welcher Silicagel als Trocknungsmittel enthielt und bei 4°C gelagert.

Nach einer Expositionsdauer von 14 Tagen erfolgte die Entwicklung der Präparate mit einem Repro-Entwickler (A71) zwischen 3 und 5 Minuten bei 20°C. Die Präparate wurden dann mit Leitungswasser zwischengewässert, dem pro 1 Liter 25 $\mu\text{l}$  Essigsäure zugesetzt worden waren. Die Fixierung erfolgte dann für 30 Minuten mit saurem Fixiersalz (A 300). Danach wurden die Präparate erneut gewässert.

Zur Darstellung der Zellkerne wurde eine GIEMSA - Kernfärbung nach folgender Vorschrift durchgeführt:

- 20 Minuten Färbung in GIEMSA - Färbelösung
- 4 Minuten Entfärbung in GIEMSA - Entfärbelösung
- 2 Minuten Wässerung in A.p.f.
- Trocknung

Die Präparate wurden mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops unter Verwendung einer 200fachen Vergrößerung ausgewertet. In jedem Präparat wurden ca. 500 Zellen ausgezählt. Als Markierungsindex (MI) wurde der prozentuale Anteil markierter Kerne an der ausgezählten Gesamtkernzahl bezeichnet. Nach Bestimmung des MI in zwei Präparaten wurde der Mittelwert berechnet.

## **2.6 Bestimmung der Gesamtproteinsynthese und der Synthese von c-jun, c-fos, c-myc, Cyclin D1, E und A**

### **2.6.1 Herstellung eines Zellysats**

Nach erfolgter Inkubation der Zellen in einem [<sup>35</sup>S]-Met enthaltenden Medium wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellbelag zweimal mit kalter PBS-Lösung gespült. Nach gründlichem Absaugen der PBS-Lösung wurden 500 µl kalter RIPA-Lysierpuffer bei 4°C zugegeben. Alle weiteren Schritte erfolgten in einem Kühlraum bei 4°C. Die mit RIPA-Lysierpuffer überschichteten Zellen in den Gewebekulturschalen wurden nun für 30 Minuten auf einem Horizontalschüttler lysiert. Dann wurde das Zellysate in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Gewebekulturschalen wurden erneut mit 500 µl RIPA-Lysierpuffer überschichtet. Nach einer Einwirkungsdauer von 30 Minuten wurde das restliche Lysate in dasselbe Reaktionsgefäß überführt (Endvolumen des Zellysates: 1 ml). Beim letzten Schritt wurde zusätzlich ein Zellschaber verwendet, um das noch am Boden der Gewebekulturschalen haftende Zellmaterial ebenfalls zu gewinnen. Die Zellysate wurden dann für 30 Minuten auf dem Horizontalschüttler gemischt. Danach wurde das nicht solubilisierte Material durch Zentrifugation von 30 Minuten Dauer bei 8000xg sedimentiert. Alle Zentrifugationen wurden mit der Mikrozentrifuge 5415C durchgeführt. Um unspezifische Bindungen weitgehend zu eliminieren, wurden zu den Überständen 28,5 µg Kaninchen-IgG und 50 µl Pansorbin-Gebrauchslösung gegeben. Die Zellysate-Überstände wurden 1 Stunde auf dem Horizontalschüttler geschwenkt. Danach wurden die Zellysate 2 Minuten bei 8000xg zentrifugiert und die Überstände erneut für eine Stunde mit 50 µl Pansorbin-Gebrauchslösung versetzt. Nach erneuter Zentrifugation bei 8000xg wurden 2 x 10 µl vom Überstand entnommen und mit je 5 ml Ultima Gold<sup>®</sup> versetzt. Die Messung der Radioaktivität dieser Proben erfolgte im Flüssigkeitsszintillationszähler. Die Zellysate wurden dann, durch Verdünnung mit RIPA-Puffer, auf eine einheitliche radioaktive Konzentration eingestellt. Die Höhe der Radioaktivität, auf die normiert wurde, orientierte sich an der am schwächsten markierten Probe.

Zur Bestimmung des Anteils der nicht in Proteine inkorporierten Radioaktivität wurden Zellysate stichprobenweise einer TCA-Fällung unterworfen. Hierzu wurden

25 µl Zellysat mit 100 µl RIPA-Lysierpuffer vermischt. Zu je 50 µl dieser Probe wurden 50 µl Rinderserumalbumin-Gebrauchslösung (10 %ig) und 100 µl TCA-Stammlösung (20 %ig) gegeben. Nach guter Durchmischung wurden die Proben für 15 Minuten im Eisbad inkubiert. Das TCA-fällbare Material wurde 5 Minuten bei 8000xg abzentrifugiert. Danach wurden 100 µl Überstand vorsichtig abpipettiert, mit 5 ml Ultima Gold<sup>®</sup> versetzt und im Flüssigkeitsszintillationszähler vermessen. Der gemessene Wert entsprach der nicht in Protein eingebauten Radioaktivität in 5 µl Zellysat.

### 2.6.2 Immunpräzipitation

Die zu untersuchenden Proteine wurden sequentiell aus den Lysaten präzipitiert. Dabei wurde zunächst 1 µg Primärantikörper zu den Lysaten (Volumen: 1 ml) gegeben. Auf einem Horizontalschüttler wurden die Proben über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte die Zugabe von 5 µl Pansorbin-Gebrauchslösung (Bindungskapazität: 4 µg IgG) für 1 Stunde. Nach einer Zentrifugation bei 8000xg für 2 Minuten wurden **Sediment** und **Überstand** getrennt weiterbehandelt.

Das **Sediment** wurde 2x mit Waschpuffer A und je 1x mit Waschpuffer B und C gespült. Die Immunkomplexe wurden dabei durch Zentrifugationen bei 8000xg und 2 Minuten Dauer sedimentiert, der Überstand verworfen und erneut Waschpuffer zugegeben. Nach dem letzten Waschschrift wurde zum Sediment 15 µl Proteinlösungsmittel gegeben, mit einem Vibro-Fix kräftig vermischt und für 5 Minuten bei 100°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde eine Zentrifugation von 2 Minuten Dauer bei 8000xg durchgeführt. Der Überstand wurde für die spätere SDS-PAGE bei -20°C eingefroren.

Zum **Überstand** wurde 1µg des nächsten Primärantikörper gegeben. Erneut wurden die Proben über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen 5µl Pansorbin-Gebrauchslösung für 1 Stunde zugegeben. Nach einer Zentrifugation bei 8000xg wurden Sediment und Überstand erneut getrennt und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Mit Hilfe dieser Methode wurden alle zu untersuchenden Proteine nacheinander in der Reihenfolge c-jun/c-fos, Cyclin A, Cyclin D1, Cyclin E und c-myc aus den Lysaten präzipitiert

Die Proto-Onkogen-Proteine c-jun und c-fos wurden zusammen präzipitiert, weil sie in vivo Komplexe bilden und auch unter den nativen Verhältnissen der Immunpräzipitation als solche vorliegen konnten. Bei alleiniger Anwendung von anti-c-jun-Antikörpern hätte somit die Möglichkeit bestanden, schon den Teil der mit

diesem Protein komplexierten c-fos Moleküle aus den Lysaten zu entfernen, und damit das spätere Ergebnis für c-fos zu verfälschen.

Bei der Immunpräzipitation von Cyclin A, Cyclin D1 und c-myc war ein Zwischenschritt notwendig. Die hier verwendeten Maus-Antikörper gehören zur Gruppe IgG1, zu welcher Pansorbin, im Gegensatz zu Kaninchen-Ig's (c-fos- und c-jun-Antikörper) und Maus-IgG2 (Cyclin E-Antikörper), nur eine geringe Affinität aufweist. Deshalb mußte zwischen der Zugabe des Primärantikörpers (1 µg) und dem Zusatz von 5 µl Pansorbin-Gebrauchslösung (Bindungskapazität: 4 µg IgG) 1,8 µg Kaninchen-anti-Maus-IgG für 1 Stunde zugesetzt werden.

Teilweise wurden Kontrollen mitgeführt, die, statt mit Primärantikörpern, mit 1 µg „normalen“ Kaninchen- oder Maus-IgG inkubiert wurden. Die übrige Behandlung der Lysate erfolgte wie oben beschrieben. Durch Vergleich der Bandenmuster von Proben, die mit spezifischem Primärantikörper versetzt worden waren, und solchen, die mit unspezifischen Kaninchen- oder Maus-IgG inkubiert wurden, konnte bestimmt werden, welche Proteine spezifisch durch die eingesetzten Antikörper präzipitiert wurden.

### 2.6.3 SDS-PAGE

Zur Herstellung von vier 10 %igen Polyacrylamidgelen (100 x 80 x 1 mm) wurden 13,5 ml Acrylamid-Bisacrylamidlösung (Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 30), 10,5 ml Gelpuffer (pH 8,8) und 17,8 ml A.p.f. in einem Erlenmeyerkolben vermischt und mit einer Vakuumpumpe für ca. 30 Sekunden entgast. Dann wurden 17 µl TEMED und 170 µl 10 %ige Ammoniumpersulfatlösung zugegeben. Nach ordentlicher Durchmischung wurde die Gelgießkammer rasch mit dieser Lösung gefüllt. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, wurden die Gele mit 25 %igem unvergälltem Ethanol überschichtet. Nach zweistündiger Polymerisation bei Zimmertemperatur wurden die Gele über Nacht zum vollständigen Auspolymerisieren in den Kühlschrank bei 4°C gestellt. Am nächsten Tag wurden die Gelplatten aus der Gießkammer entnommen, die Ethanollösung abgossen und die Reste mit Filterpapier aufgesaugt. Die Gelplatten wurden mit Klammern an der Elektrophoresekammer befestigt und das untere Pufferreservoir mit Laufpuffer gefüllt. Das Sammelgel wurde nach folgender Anweisung hergestellt: 0,5 ml Acrylamid-Bisacrylamidlösung (Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 30), 2,0 ml A.p.f. und 0,83 ml Sammelgelpuffer (pH 6,8) wurden mit 5 µl TEMED und 50 µl 10 %iger Ammoniumpersulfatlösung in einem Glasröhrchen (20 ml) vermischt. Die Gele wurden mit dieser Sammelgellösung überschichtet. Um im Sammelgel Probenaschen zu erzeugen, wurden Käbme in die flüssige, noch nicht polymerisierte Sammelgellösung eingebracht. Nach 30 Minuten waren die Sammelgele

auspolymerisiert. Das obere Pufferreservoir wurde mit Laufpuffer gefüllt, und die Kämme wurden vorsichtig aus dem Sammelgel gezogen. Dann wurden die so erzeugten Sammelgeltaschen mit je 15 µl Probe bestückt. Die aufgetragenen Proben entsprachen dabei Immunpräzipitaten, die aus Zellysaten **gleicher Radioaktivität** (gleiche Menge neusynthetisierten Proteins) hergestellt worden waren. Die Elektrophorese wurde mit 220 V und 10 mA bei einem Gel durchgeführt. Befand sich die Bromphenolblaubande nach ca. 2 Stunden etwa 1 cm oberhalb des unteren Gelrandes, wurde die Elektrophorese abgestellt.

#### 2.6.4 Aufbereitung der Gele

Eine von KOVARY und BRAVO (1991a, b; 1992) beschriebene Methode wurde mit Modifikationen für die Aufbereitung der Gele genutzt. Die Gele wurden in Gelfixierlösung für 30 Minuten auf einem Horizontalschüttler geschwenkt. Die Entwässerung der Gele erfolgte für 2 x 30 Minuten in reinem DMSO. Danach wurden sie für 30 Minuten in PPO-Lösung (20 %ig) geschwenkt. Anschließend wurden die Gele für weitere 30 Minuten in A.p.f. gelegt, was zum Ausfällen des PPO's und zur Weißfärbung der Gele führte. Dann wurden sie auf zuvor in A.p.f. gewässerte Klarsichtfolie gelegt und in einem Geltdrockner, der an eine Vakuumtrocknungsanlage angeschlossen war, 90 Minuten getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Gele auf Papier aufgeklebt. In einer Fotokassette wurden die Gele mit medizinischen Röntgenfilmen zusammen bei -20°C exponiert. Je nach Höhe der Radioaktivität des ursprünglichen Ausgangsmaterials wurde eine Expositionszeit von 1-8 Wochen gewählt.

Die später im Kapitel ERGEBNISSE in einer Tabelle zusammengefaßten Bandenmuster sind Resultat **verschiedener, voneinander unabhängiger** Versuche. Bei den verschiedenen Experimenten wurden **uneinheitliche** Expositionszeiten gewählt, so daß beispielsweise die Kontrollen unterschiedliche Intensitäten aufweisen und die Bandenmuster dieser Experimente nur bedingt untereinander verglichen werden können.

Nach Ablauf der Expositionszeit wurden die Kassetten 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. In einer Dunkelkammer erfolgte dann die Entwicklung der Röntgenfilme mit einem Repr-Entwickler (A71) für 5 Minuten bei 20°C. Nach einer Zwischenwässerung unter fließendem Leitungswasser erfolgte die Fixierung für 8 Minuten mit Agfa Agefix. Die Filme wurden erneut gewässert und dann getrocknet.

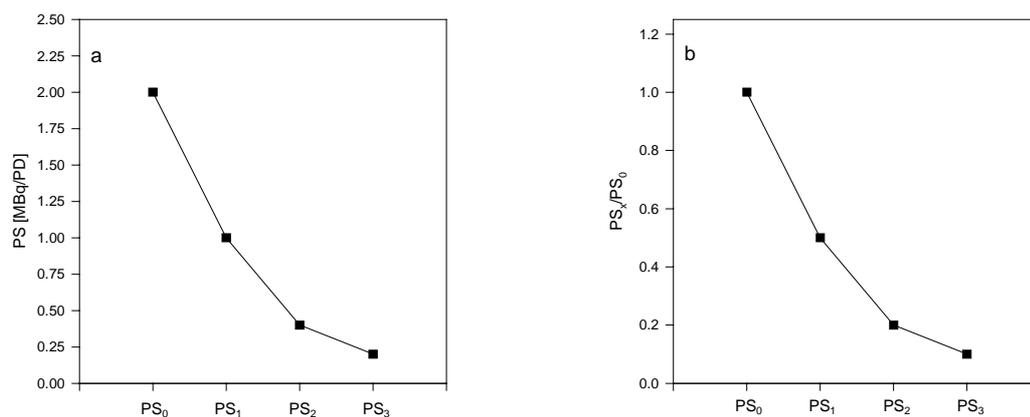
### 2.6.5 Auswertung der Röntgenfilme

Die entwickelten Röntgenfilme wurden mit Hilfe einer an einen Computer angeschlossenen Fotoeinrichtung und des Computerprogramms „MOVIE Machine II“ in den Computer eingelesen und abgespeichert.

Mit der Bildanalysesoftware „BASys“ war es möglich, die Intensität der Schwärzung der interessierenden Banden zu messen und diese relativ zur Schwärzung definierter Standardbanden (s.Auswertung) anzugeben.

### 2.6.6 Datenbearbeitung

Die im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessenen Gesamtproteinsynthesewerte [MBq/PD] wurden zunächst graphisch dargestellt (s.1a). Diese absoluten Werte der Gesamtproteinsynthese wurden dann relativ zu den in der Auswertung näher bezeichneten Kontrollen (im Beispiel:  $PS_0=1$ ) angegeben und grafisch dargestellt (s.1b).

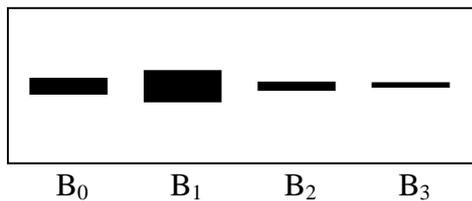


### **Beispiel zur Datenbearbeitung 1a, b**

Desweiteren mußten für eine quantitative Auswertung die Bandenmuster der untersuchten Einzelproteine vorliegen (s.2a). Die Absorptionen (Schwärzungen) der Banden wurden durch die Bildanalysesoftware „BASys“ gemessen und relativ zu den in der Auswertung beschriebenen Kontrollen (im Beispiel: Absorption von  $B_0=1$ ) angegeben. Da die Immunpräzipitate aus Lysaten gleicher Radioaktivität stammten, konnte mit diesen Werten die Neusynthese der Proteine (z.B. Cyclin D1) pro **gleicher Menge neusynthetisierten Gesamtproteins** verglichen und grafisch veranschaulicht werden (s.2b).

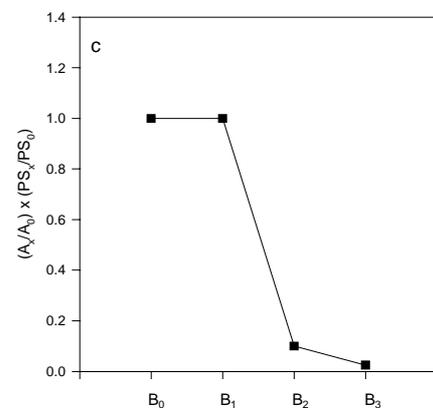
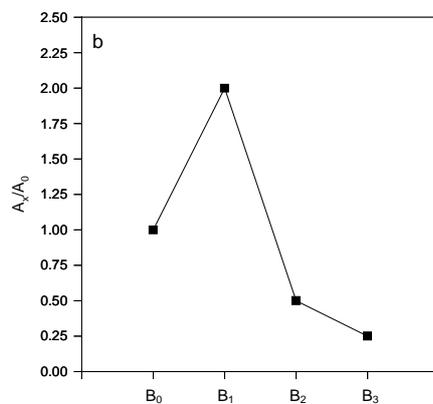
Desweiteren sollte die Neusynthese von Proteinen, bezogen auf eine **gleichgroße Zellpopulation**, untersucht werden. Dazu mußte errechnet werden, wie die Absorptionen (Schwärzungen) der Banden gewesen wären, wenn die Immunpräzipitation anstatt aus Zellysaten gleicher Radioaktivität, aus Zellysaten gleichen Volumens erfolgt wäre. Hierfür wurden die relativen Werte der Gesamtproteinsynthese (s.1b) mit den relativen Absorptionen (Schwärzungen) der zugehörigen Banden (s.2b) multipliziert, die errechneten Werte verglichen und grafisch veranschaulicht (s.2c).

a



B<sub>0</sub>: Bande der Immunpräzipitation aus Ansatz 0;

B<sub>1</sub>: Bande der Immunpräzipitation aus Ansatz 1;...



### Beispiel zur Datenbearbeitung 2 a, b, c

Die grafische Darstellung der gewonnenen Werte erfolgte mit dem Programm „SigmaPlot“.

Durch die beschriebene Vorgehensweise konnte innerhalb der Arbeit die Neusynthese der Einzelproteine (z.B. Cyclin D1) sowohl bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierten Proteins als auch bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation dargestellt werden.

## **2.7 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Mikrofilamente mit RH-Phalloin**

Um den Einfluß von CD auf die Organisation des Mikrofilamentsystems fluoreszenzmikroskopisch darzustellen, wurden die Präparate nach Einwirkung des Effektors folgendermaßen aufgearbeitet:

- 2 x 5 min Spülung mit Puffer A
- 10 min Fixierung mit Formaldehyd-Gebrauchslösung (2 %ig, pH 7,4)
- 5 min Spülung mit Puffer A
- 15 min Einwirkung von Digitonin-Gebrauchslösung (12 µg/ml)
- 5 min Spülung mit Puffer A
- 120 min Inkubation mit RH-Phalloin-Gebrauchslösung (0,4 µg/ml)
- 5 x 2 min Spülung mit Puffer A
- Eindecken der Präparate mit Aqua PolyMount<sup>®</sup>

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzeinrichtung des Laser Scan Mikroskops LSM 410 unter Verwendung des Objektivs Plan-Neofluar 40x. Die Anregung des Fluorochroms Rhodamin erfolgte unter Verwendung einer HBO 50-Leuchte und der Filterkombination Nr.15 (Excitationsfilter: BP546; Strahlenteiler: FT580; Emissionsfilter: LP590). Charakteristische Mikrofilamentstrukturen wurden unter Verwendung eines AGFAPAN APX 400 - Films aufgenommen.

## **2.8 Darstellung der Zellform mit Differential-Interferenzkontrast-Mikroskopie**

Nach Einwirkung von CD wurden die Präparate folgendermaßen für die DIC-Mikroskopie aufgearbeitet:

- 2 x 5 min Spülung mit Puffer A
- 10 min Fixierung mit Formaldehyd-Gebrauchslösung (2 %ig, pH 7,4)
- 5 min Spülung mit Puffer A
- Überschichten der an den DG haftenden Zellen mit PBS und Fixierung mit Nagellack auf Objektträger

Die Auswertung der Präparate erfolgte unter Zuhilfenahme der DIC-Einrichtung des Laser Scan Mikroskops LSM 410. Unter Verwendung eines Plan-Apochromat 63x-Objektivs wurden charakteristische Fibroblasten auf dem Film AGFAPAN APX 100 abgebildet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Einfluß von Cytochalasin D, Latrunculin A und B auf die Zellform, die Organisation des Mikrofilamentsystems und den Markierungsindex von Wi-38-Fibroblasten

#### 3.1.1 Einfluß von CD auf die Zellform

Wi-38-Fibroblasten sind Zellen, die sich nach Haftung an ein geeignetes Substratum deutlich abflachen sowie kürzere und längere Fortsätze aufweisen (s.Abb. I, S.24). Wurden sie für 2 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von CD inkubiert, so waren lichtmikroskopisch starke Zellformveränderungen an den Fibroblasten sichtbar. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  war der überwiegende Teil der Zellen stark abgerundet und mit wurzelförmigen Ausläufern im Sinne eines „arborized state“ verändert (s.Abb. II, S.24).

#### 3.1.2 Einfluß von CD auf die Organisation des Mikrofilamentsystems

Wurde das Mikrofilamentsystem von unbehandelten Wi-38-Fibroblasten mit RH-Phalloin dargestellt, so waren zahlreiche, die Zellen durchspannende „stress fibers“ nachweisbar (s.Abb. III, S.25). Bereits bei einer CD-Konzentration von 0,01  $\mu\text{mol/l}$  kam es zur Desintegration von „stress fibers“ und zur Aggregation von Aktinfilamenten zu „foci“ (s.Abb. IV, S.25). Ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  war die Organisation der Mikrofilamente in „stress fibers“ nicht mehr sichtbar (s.Abb. V, S.26). In derselben Abbildung ist zu erkennen, daß sich in den Fortsätzen, der im Sinne eines „arborized state“ veränderten Zellen, kleine Anhäufungen von Aktin befanden.

#### 3.1.3 Einfluß von CD, LAT A und B auf den Markierungsindex

CD, LAT A und B alterieren spezifisch das Mikrofilamentsystem. Diese Alteration ist bei verschiedenen nichttransformierten Zelllinien korreliert mit einer Abnahme der Zahl DNA-synthetisierender Zellen (IWIG et al., 1995).

Das Ziel der Versuche mit CD, LAT A und B bestand darin, herauszufinden, ob intakte Mikrofilamente auch bei Wi-38-Fibroblasten für den  $G_0$ - $G_1$ -S-Phase-Übergang notwendig sind.

Eine Desintegration der Mikrofilamente durch CD und LAT B (je 1  $\mu\text{mol/l}$ ) führt zu einer Verminderung des Markierungsindex in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer der Effektoren. Einen Tag nach Zugabe der Effektoren war der Markierungsindex von 15,2 % auf <1 % abgefallen (s.Abb. 1, S.27).

CD und LAT A verhindern auch den Neueintritt von Wi-38-Fibroblasten in den Zellzyklus. Wurden Wi-38-Fibroblasten nach 60stündiger Kultivierung in

Serummangelmedium (MEM + 0,5 % FKS) durch Serumzugabe (MEM + 20 % FKS) reaktiviert, so wurde der Eintritt in den Zellzyklus sowohl durch CD- als auch LAT A-Zugabe weitgehend unterdrückt (s.Abb. 2, S.28) .

**Zusammenfassende Bewertung:**

Anhand der Versuche mit Cytochalasin D, Latrunculin A und B konnte gezeigt werden, daß **intakte Mikrofilamente** auch bei Wi-38-Fibroblasten für den G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-S-Phase-Übergang erforderlich sind.

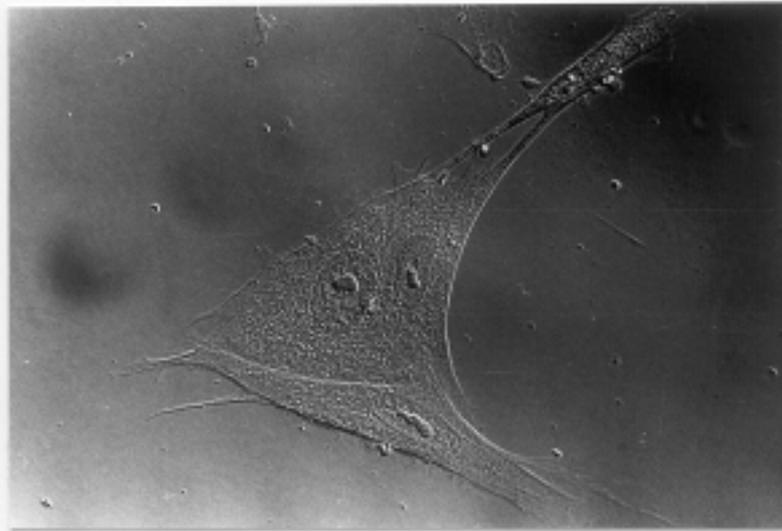


Abb. I: Humane embryonale Lungenfibroblasten Wi-38  
Kultur auf Deckglas  
Kulturmedium: MEM + 20 % FKS  
Kulturzeit: 16 h  
Fixierung: Formaldehyd -Gebrauchslösung (2 %ig, pH 7,4)  
Mikroskop: Laser Scan Mikroskop LSM 410  
DIC-Aufnahme (470x)



Abb. II: Einfluß von CD [1 µmol/l] auf die Zellform von humanen embryonalen Lungenfibroblasten Wi-38  
Kultur auf Deckglas  
Kulturmedium: MEM + 20 % FKS  
Kulturzeit: 16 h  
Zugabe von CD [1 µmol/l]: 2 h  
Fixierung: Formaldehyd -Gebrauchslösung (2 %ig, pH 7,4)  
Mikroskop: Laser Scan Mikroskop LSM 410  
DIC-Aufnahme (470x)

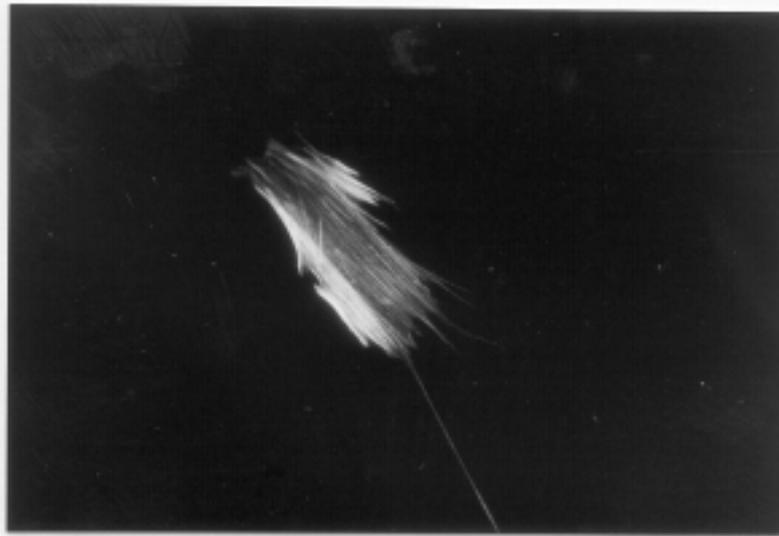


Abb. III: Mikrofilamentsystem von Wi-38-Fibroblasten (ohne Effektor)  
 Kultur auf markierten Objektträgern für den Immunfluoreszenztest  
 Kulturmedium: MEM + 20 % FKS  
 Kulturzeit: 16 h  
 Darstellung der Mikrofilamente mit RH-Phalloin gemäß Kap.2.7 (s.S. 21)  
 Mikroskop: Laser Scan Mikroskop LSM 410  
 Fluoreszenzmikroskopie (300x)

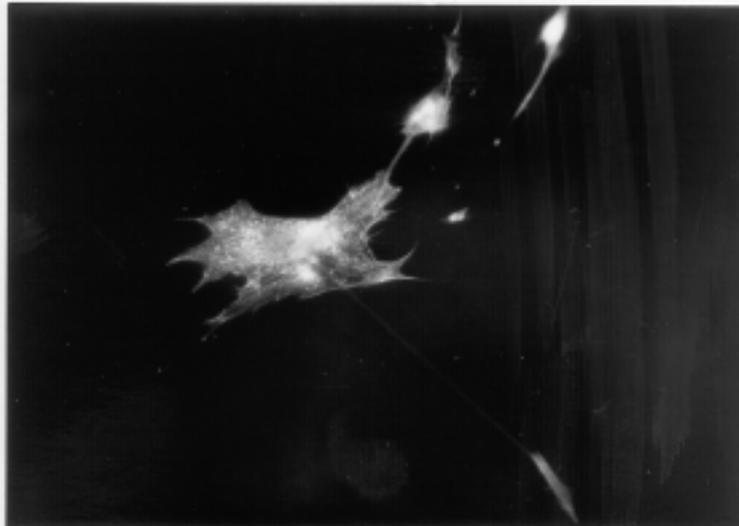


Abb. IV: Einfluß von CD [0,01 µmol/l] auf das Mikrofilamentsystem von Wi-38-Fibroblasten  
 Kultur auf markierten Objektträgern für den Immunfluoreszenztest  
 Kulturmedium: MEM + 20 % FKS  
 Kulturzeit: 16 h  
 Zugabe von CD [0,01 µmol/l]: 2 h  
 Darstellung der Mikrofilamente mit RH-Phalloin gemäß Kap.2.7 (s.S. 21)  
 Mikroskop: Laser Scan Mikroskop LSM 410  
 Fluoreszenzmikroskopie (300x)

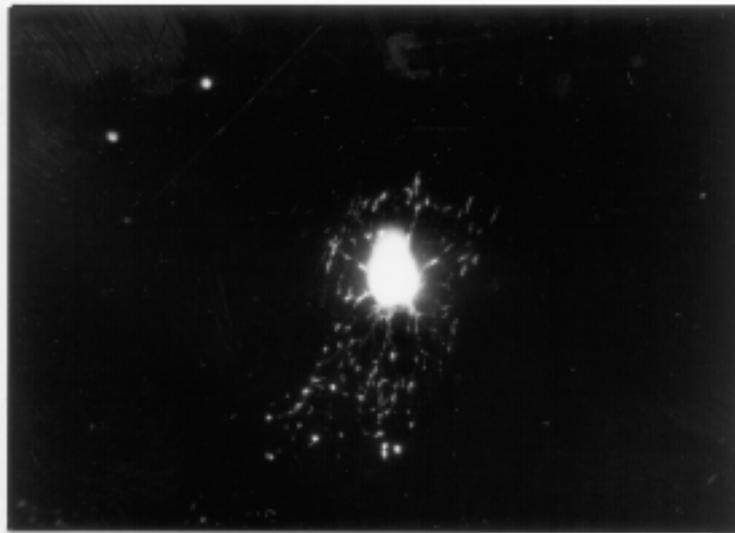


Abb. V: Einfluß von CD [1  $\mu\text{mol/l}$ ] auf das Mikrofilamentsystem von Wi-38-Fibroblasten

Kultur auf markierten Objektträgern für den Immunfluoreszenztest

Kulturmedium: MEM + 20 % FKS

Kulturzeit: 16 h

Zugabe von CD [1  $\mu\text{mol/l}$ ]: 2 h

Darstellung der Mikrofilamente mit RH-Phalloin gemäß Kap.2.7 (s.S. 21)

Mikroskop: Laser Scan Mikroskop LSM 410

Fluoreszenzmikroskopie (300x)

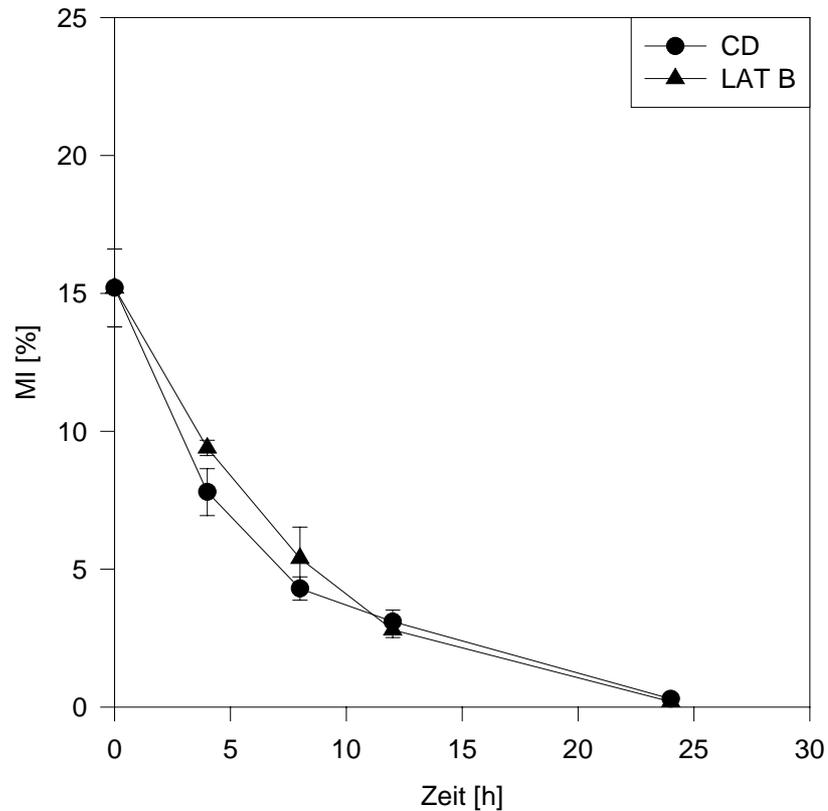


Abb. 1: Einfluß von CD und LAT B auf den Markierungsindex (MI) von Wi-38-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Zelleinsaat: 10 000 Z/DG

Kulturmedium: MEM + 20 % FKS

Vorkultur: 16 h, danach

Inkubation mit CD und LAT B (je 1  $\mu\text{mol/l}$ )

Pulsmarkierung mit [ $^3\text{H}$ ]-TdR [37 kBq/ml]: 2 h am Ende jeder

Kulturperiode

Aufarbeitung der Präparate zur Autoradiographie gemäß Kap.2.5 (s.S. 14)

Abszisse: Kulturzeit [h] nach Zugabe von CD und LAT B

Ordinate: Markierungsindex (MI)

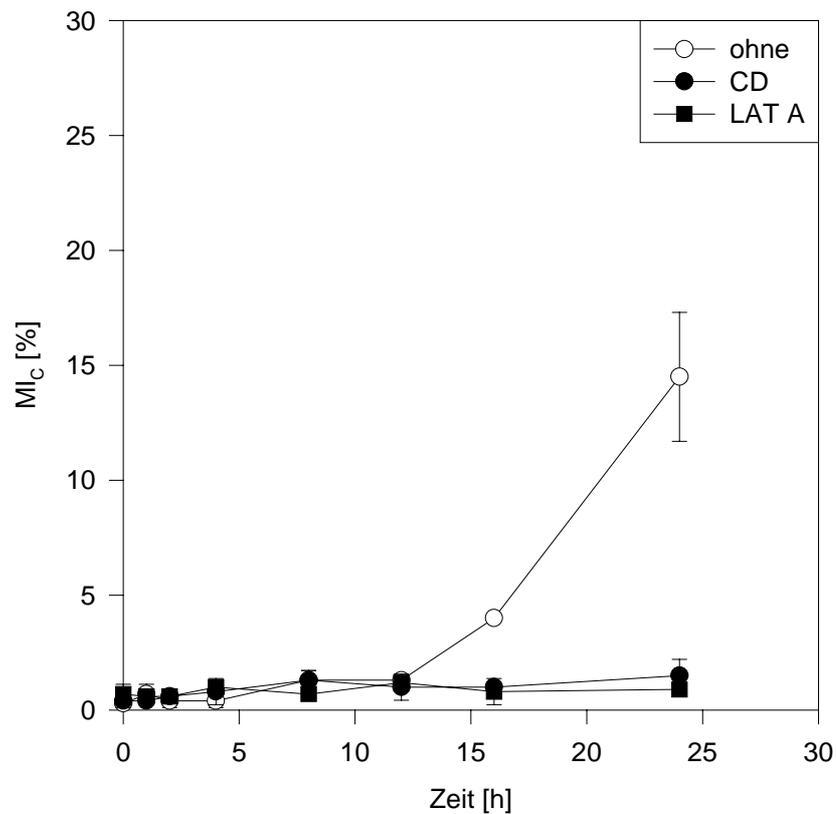


Abb. 2: Einfluß von CD und LAT A auf den kumulativen Markierungsindex ( $MI_C$ ) von Wi-38-Fibroblasten bei Reaktivierung nach Serumangelmedium

Zelleinsaat: 10 000 Z/DG

Kulturmedium: MEM + 20 % FKS

Vorkultur: 16 h

Serumangelmedium: MEM + 0,5 % FKS

Kulturdauer: 60 h

Reaktivierung mit MEM + 20 % FKS in Gegenwart von CD und LAT A (je 1  $\mu\text{mol/l}$ ) oder in Abwesenheit von Effektoren

Zugabe von [ $^3\text{H}$ ]-TdR [18,5 kBq/ml] unmittelbar nach Reaktivierung

Aufarbeitung der Präparate zur Autoradiographie gemäß Kap.2.5 (s.S. 14)

Abszisse: Kulturzeit [h] nach Mediumwechsel

Ordinate: Kumulativer Markierungsindex ( $MI_C$ )

### 3.2 Nachweis der Synthese der Proto-Onkogen-Proteine und Cycline mittels Immunpräzipitation und SDS-Page

Unter Zuhilfenahme spezifischer Antikörper wurden die Proto-Onkogen-Proteine und Cycline durch Immunpräzipitation und SDS-PAGE nachgewiesen. Die Spezifität der Banden konnte durch Vergleich mit Kontrollen sichergestellt werden, die, anstelle des Primärantikörpers, mit „normalen“ Kaninchen- oder Maus-IgG inkubiert wurden (s.Kap. 2.6.2, S.16 und Kap. 2.6.3, S.17).

Nach Angaben der Vertriebsfirmen DIANOVA (c-fos-, c-jun-, c-myc-, Cyclin D1-, Cyclin A-Antikörper) und PHARMINGEN (Cyclin E-Antikörper) sollte c-fos bei 62 kD, c-jun bei 39 kD, c-myc zwischen 64 kD und 67 kD, Cyclin D1 bei 36 kD, Cyclin E bei 50 kD und Cyclin A bei 60 kD nachweisbar sein.

Sowohl die Proto-Onkogen-Proteine **c-fos** (s.Abb. 17, S.53) und **c-jun** (s.Abb. 7, S.37; Abb. 12, S.45; Abb. 17, S.53) als auch **Cyclin D1** (s.Abb. 4, S.34; Abb. 9, S.42; Abb. 14, S.50; Abb. 19, S.57) und **Cyclin E** (s.Abb. 5, S.35; Abb. 10, S.43; Abb. 15, S.51) konnten gemäß diesen Angaben detektiert werden, wobei Abweichungen von maximal  $\pm 4$  kD auftraten.

Der anti-**Cyclin A**-Antikörper erzeugte Banden bei ca. 50 kD (s.Abb. 6, S.36; Abb. 11, S.44; Abb. 16, S.52; Abb. 20, S.58). Gemäß DIANOVA sollte dieses Protein bei 60 kD detektierbar sein. Jedoch beschrieben auch andere Autoren einen Nachweis von Cyclin A bei deutlich unter 60 kD; So wurde dieses Protein bei 54 kD in HeLa-Zellen (PAGANO et al., 1992) und bei 55 kD in Rattenhepatocyten (ZINDY et al., 1992) nachgewiesen. Bei Versuchen mit einer anderen humanen embryonalen diploiden Lungenfibroblastenzelllinie (IMR-90) wurden ähnliche Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit erzielt; GOOD et al. (1996) detektierten Cyclin A als 52 kD Protein. Im Zusammenhang mit diesen Literaturangaben und unter Berücksichtigung der Tatsache, daß der verwendete Antikörper in allen Versuchen reproduzierbar, kräftige Banden bei ca. 50 kD erzeugte, die weder bei Inkubation des Zellysats mit normalem Maus-IgG noch bei Verwendung eines der anderen spezifischen Antikörper (Cyclin D1, E, c-fos, c-jun) auftraten, kann davon ausgegangen werden, daß Cyclin A nachgewiesen wurde.

Ein Nachweis des Proto-Onkogen-Proteins **c-myc** war in keinem der Versuche möglich.

### **3.3 Einfluß der Konzentration von Cytochalasin D, Latrunculin A und B auf die Gesamtproteinsynthese und die Synthese von Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen in exponentiell wachsenden Fibroblasten**

Die vorhergehenden Versuche hatten belegt, daß die untersuchten, das Mikrofilamentsystem desintegrierenden Effektoren zu einer starken Verminderung der DNA-Synthese bei Wi-38-Fibroblasten führen (s.Abb. 1, S.27 und s.Abb. 2, S.28).

In den folgenden Experimenten wurde an diesen Fibroblasten untersucht, wie sich verschiedene Konzentrationen von CD, LAT A und B auf die Gesamtproteinsynthese und die Synthese von Proto-Onkogen-Produkten und Cyclinen, denen eine wichtige Bedeutung beim G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-S-Phase-Übergang zuerkannt wird, auswirken.

#### **Gesamtproteinsynthese:**

Wurden die Mikrofilamente durch CD, LAT A oder B desintegriert, so kam es zu einem Abfall der Gesamtproteinsynthese, welcher mit den Konzentrationen der verschiedenen Effektoren positiv korreliert war (s.Abb. 3, S.33). Nach Zugabe einer Effektorkonzentration von 10 µmol/l und zweistündiger Einwirkungsdauer war die Gesamtproteinsynthese, im Vergleich zu unbehandelten Proben, um 66 % (CD), 57 % (LAT A) und 80 % (LAT B) abgefallen. Die Hemmung der Gesamtproteinsynthese nahm in der Reihenfolge LAT B > CD > LAT A ab, d.h. LAT B hemmte die Proteinsynthese am stärksten.

#### **Cyclin D1-Synthese:**

##### **– Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine (s.Abb. 4b, S.34):**

Die Cyclin D1-Synthese lag, in Abhängigkeit von der Effektorkonzentration, zwischen 99 % und 106 % (CD), 63 % und 71 % (LAT A) sowie 69 % und 111 % (LAT B) der Synthese unbehandelter Kulturen. Bei Inkubation mit verschiedenen CD-Konzentrationen war keine Änderung der Cyclin D1-Synthese feststellbar. Dagegen kam es zu einer Verminderung der Synthese in mit LAT A und B behandelten Kulturen. Die Cyclin D1-Synthese fiel bei Zusatz hoher LAT B-Konzentrationen ( $\geq 1$  µmol/l) ab und war bei Zugabe von 10 µmol/l Effektor mit 69 % der Ausgangssynthese minimal. Die mit LAT A behandelten Kulturen zeigten bereits bei der geringsten zugesetzten Konzentration (0,01 µmol/l) einen starken Abfall der Cyclin D1-Synthese auf zwei Drittel der Synthese unbehandelter Kulturen. Mit steigender Konzentration dieses Effektors jedoch war kein weiterer Rückgang der Cyclin D1-Neusynthese zu beobachten.

##### **– Bezogen auf die gleiche Zellzahl (s.Abb. 4c, S.34):**

Bei Zugabe von CD, LAT A oder B kam es zu einem kontinuierlichen Abfall der Cyclin D1-Synthese in Abhängigkeit von der Effektorkonzentration. Bei Zusatz

von 10  $\mu\text{mol/l}$  Effektor erreichte die Cyclin D1-Synthese mit 33 % (CD), 31 % (LAT A) bzw. 14 % (LAT B) gegenüber der Kontrolle ihren Minimalwert.

#### **Cyclin E-Synthese:**

– **Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine (s.Abb. 5b, S.35):**

CD-behandelte Kulturen zeigten einen leichten Abfall der Cyclin E-Synthese, mit einem Minimum von 74 % der unbehandelten Kontrolle bei Zugabe von 1  $\mu\text{mol/l}$  Effektor. Bei Zusatz von LAT A zeigte die Cyclin E-Synthese eine Tendenz zur Abnahme, wobei keine eindeutige Abhängigkeit von der Effektorkonzentration bestand. Der Versuch, bei dem LAT B als Effektor zugegeben wurde, war aufgrund eines methodischen Fehlers nicht quantitativ auswertbar.

– **Bezogen auf die gleiche Zellzahl (s.Abb. 5c, S.35):**

Bei Zugabe von CD und LAT A kam es zu einem Abfall der Cyclin E-Synthese. Sie erreichte bei Zusatz von 10  $\mu\text{mol/l}$  Effektor mit 27 % (CD) und 25 % (LAT A) der Kontrollgruppe ein Minimum.

#### **Cyclin A-Synthese:**

– **Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine (s.Abb. 6b, S.36):**

CD und LAT B bewirkten keine wesentlichen Änderungen der Cyclin A-Synthese in Abhängigkeit von der Effektorkonzentration. Die Neusynthese von Cyclin A lag zwischen 92 % und 113 % (CD) bzw. 96 % und 120 % (LAT B) der unbehandelten Kontrolle. Bei Zugabe von LAT A dagegen kam es zu einem kontinuierlichen Abfall der Cyclin A-Synthese, die bei einer LAT A-Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  ein Minimum von 65 % der unbehandelten Kontrollgruppe erreichte.

– **Bezogen auf die gleiche Zellzahl (s.Abb. 6c, S.36):**

Die Cyclin A-Neusynthese fiel mit zunehmender Effektorkonzentration kontinuierlich ab und erreichte, bei Zugabe von 10  $\mu\text{mol/l}$  Effektor, 31 % (CD), 28 % (LAT A) bzw. 19 % (LAT B) der Synthese der unbehandelten Kontrollen.

#### **c-jun-Synthese:**

– **Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine (s.Abb. 7b, S.37):**

Die Synthese des Proto-Onkogen-Produkts c-jun zeigte in Abhängigkeit von der Effektorkonzentration keinen Trend zu höheren oder niedrigeren Werten und lag zwischen 74 % und 113 % (CD) bzw. 84 % und 127 % (LAT A) der Synthese unbehandelter Kontrollen. Die bei Zugabe von LAT B ermittelten c-jun-Banden waren aufgrund eines methodischen Fehlers quantitativ nicht auswertbar.

– **Bezogen auf die gleiche Zellzahl (s.Abb. 7c, S.37):**

Die Synthese von c-jun fiel bei einer CD-Konzentration zwischen 0,1 µmol/l und 10 µmol/l kontinuierlich bis auf einen Minimalwert von 25 % der Kontrolle ab. Bei Zugabe von LAT A kam es ebenfalls zum Abfall der c-jun-Synthese, die bei Zusatz von 10 µmol/l Effektor mit 39 % der Kontrolle ihr Minimum erreichte.

**c-fos- und c-myc-Synthese:**

In exponentiell wachsenden Wi-38-Fibroblasten waren die Proto-Onkogen-Proteine c-fos und c-myc durch Immunpräzipitation, unter Verwendung der angegebenen Antikörper, nicht nachweisbar.

**Zusammenfassende Bewertung:**

Das Mikrofilamentsystem von Wi-38-Fibroblasten wurde durch steigende Konzentrationen der drei unterschiedlichen Effektoren zunehmend stark alteriert. Dabei wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der Gesamtproteinsynthese festgestellt. Diese Hemmung nahm in der Reihenfolge LAT B > CD > LAT A ab. Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine ergab sich selbst bei hohen Effektorkonzentrationen keine eindeutige Änderung der Neusynthese der Cycline und des Proto-Onkogen-Proteins c-jun. Dagegen war eine konzentrationsabhängige Hemmung der Neusynthese von c-jun und Cyclin D1, E und A dann eindeutig erkennbar, wenn diese Synthese auf eine gleichgroße Zellpopulation bezogen wurde.

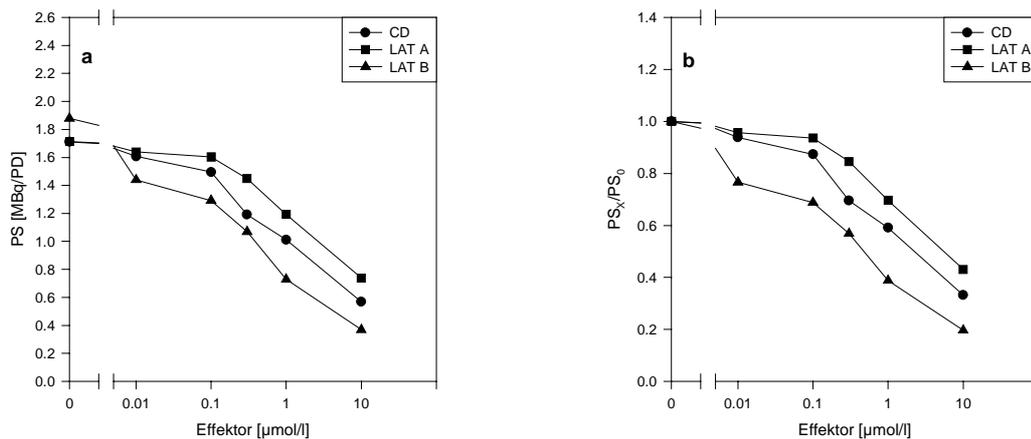


Abb. 3: Einfluß der Konzentration von CD, LAT A und B auf die Proteinsynthese von Wi-38-Fibroblasten

Zelleinsaat: 300 000 Z/PD (ZD=350 Z/mm<sup>2</sup>)

Kulturmedium: MEM + 20 % FKS

Vorkultur: 16 h; danach

Inkubation mit Effektoren: 2 h

Pulsmarkierung mit [<sup>35</sup>S]-Met [7,4 MBq/ml]: 1 h am Ende der Inkubationsperiode

Herstellung eines Zellysats und Aufarbeitung der Proben zur Messung der inkorporierten Radioaktivität gemäß Kap. 2.6.1 (s.S. 15)

**a:** Graphische Darstellung der Gesamtproteinsynthese (PS) pro Gewebekulturschale [MBq/PD]

**b:** Graphische Darstellung der relativen Gesamtproteinsynthese (PS<sub>x</sub>/PS<sub>0</sub>)

PS<sub>0</sub>: Proteinsynthese der Probe<sub>0</sub> (Kontrolle: ohne Effektor)

PS<sub>x</sub>: Proteinsynthese der Probe<sub>x</sub>

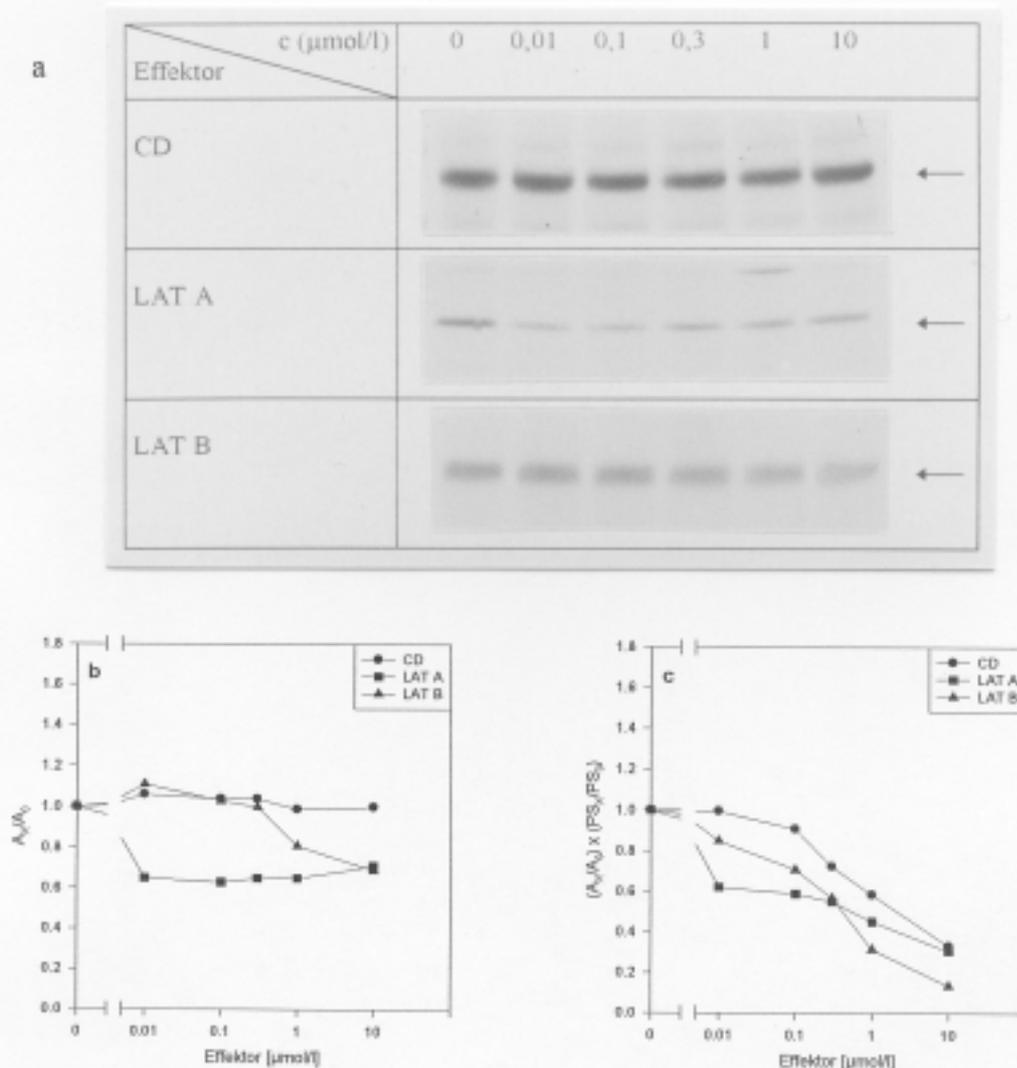


Abb. 4: Einfluß der Konzentration von CD, LAT A und LAT B auf die Neusynthese von Cyclin D1

Versuchsdurchführung: s.Legende zu Abb. 3, S.33

Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter Verwendung des hergestellten Zellysats gemäß Kap. 2.6.2 (s.S.16) und Kap.2.6.3 (s.S.17)

Radioaktivität des eingesetzten Zellysats: 167 kBq (=10<sup>7</sup> dpm)

**a:** Autoradiographische Darstellung der Cyclin D1-Banden (M<sub>r</sub> 36 kD ←)

**b:** Graphische Darstellung der relativen Absorption (A<sub>x</sub>/A<sub>0</sub>) der Cyclin D1-Banden von a)

A<sub>0</sub>: Absorption der Cyclin D1-Bande ohne Effektor (=Kontrolle)

A<sub>x</sub>: Absorption der Cyclin D1-Banden mit Effektor

**c:** Cyclin D1-Synthese bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation:

Die unter b) ermittelte Neusynthese von Cyclin D1 (A<sub>x</sub>/A<sub>0</sub>) wurde mit einem Faktor multipliziert, der sich aus der relativen Proteinsynthese (PS<sub>x</sub>/PS<sub>0</sub>) der Zellpopulation (s. Abb. 3b, S.33) ergab.

a

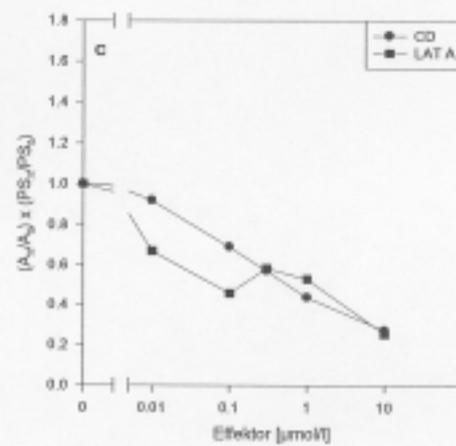
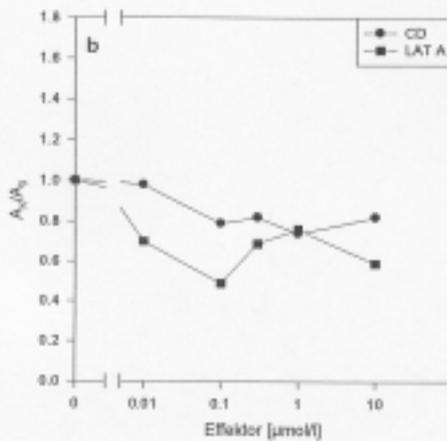
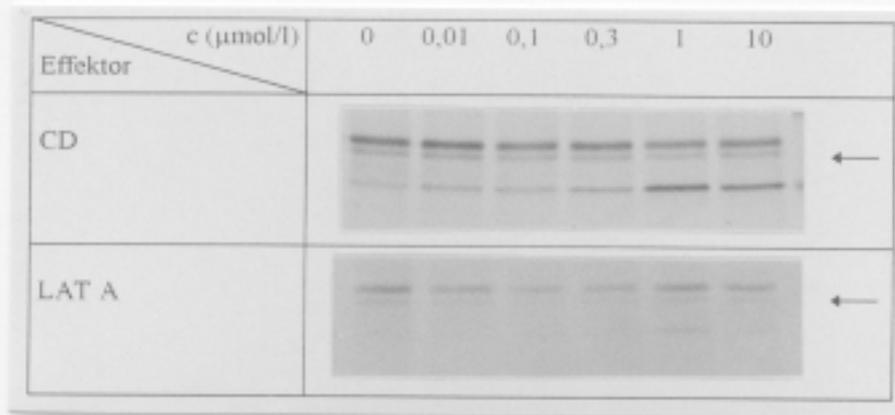


Abb. 5: Einfluß der Konzentration von CD und LAT A auf die Neusynthese von Cyclin E

Versuchsdurchführung: s. Legende zu Abb. 3, S.33

Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter Verwendung des hergestellten Zellysats gemäß Kap. 2.6.2 (s.S.16) und Kap.2.6.3 (s.S.17)

Radioaktivität des eingesetzten Zellysats: 167 kBq (=10<sup>7</sup> dpm)

a: Autoradiographische Darstellung der Cyclin E-Banden (M<sub>r</sub> 50 kD ←)

b: Graphische Darstellung der relativen Absorption (A<sub>x</sub>/A<sub>0</sub>) der Cyclin E-Banden von a)

A<sub>0</sub>: Absorption der Cyclin E-Bande ohne Effektor (=Kontrolle)

A<sub>x</sub>: Absorption der Cyclin E-Banden mit Effektor

c: Cyclin E-Synthese bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation:

Die unter b) ermittelte Neusynthese von Cyclin E (A<sub>x</sub>/A<sub>0</sub>) wurde mit einem Faktor multipliziert, der sich aus der relativen Proteinsynthese (PS<sub>x</sub>/PS<sub>0</sub>) der Zellpopulation (s. Abb. 3b, S.33) ergab.

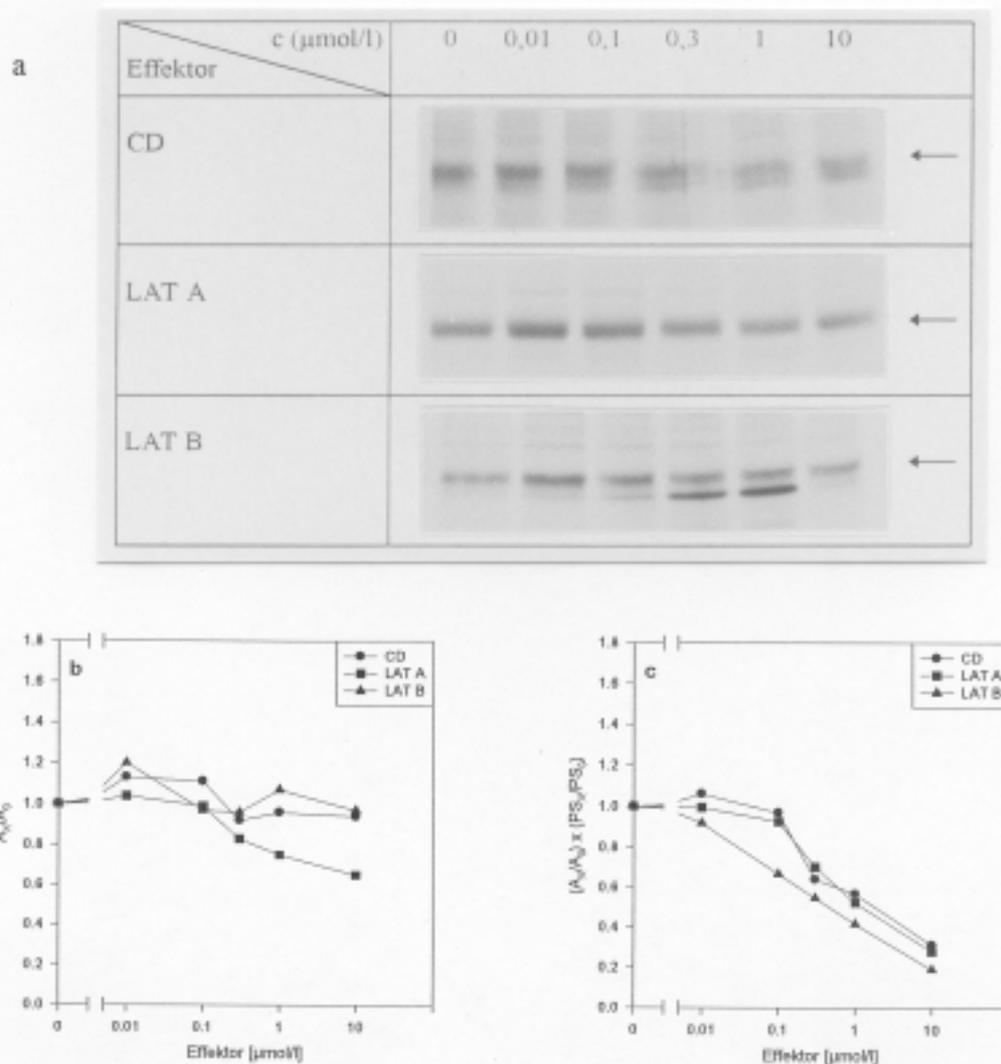


Abb. 6: Einfluß der Konzentration von CD, LAT A und LAT B auf die Neusynthese von Cyclin A

Versuchsdurchführung: s.Legende zu Abb. 3, S.33

Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter Verwendung des hergestellten Zellysats gemäß Kap. 2.6.2 (s.S.16) und Kap.2.6.3 (s.S.17)

Radioaktivität des eingesetzten Zellysats: 167 kBq ( $=10^7$  dpm)

**a:** Autoradiographische Darstellung der Cyclin A-Banden ( $M_r$  50 kD  $\leftarrow$ )

**b:** Graphische Darstellung der relativen Absorption ( $A_x/A_0$ ) der Cyclin A-Banden von a)

$A_0$ : Absorption der Cyclin A-Bande ohne Effektor (=Kontrolle)

$A_x$ : Absorption der Cyclin A-Banden mit Effektor

**c:** Cyclin A-Synthese bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation:

Die unter b) ermittelte Neusynthese von Cyclin A ( $A_x/A_0$ ) wurde mit einem Faktor multipliziert, der sich aus der relativen Proteinsynthese ( $PS_x/PS_0$ ) der Zellpopulation (s. Abb. 3b, S.33) ergab.

a

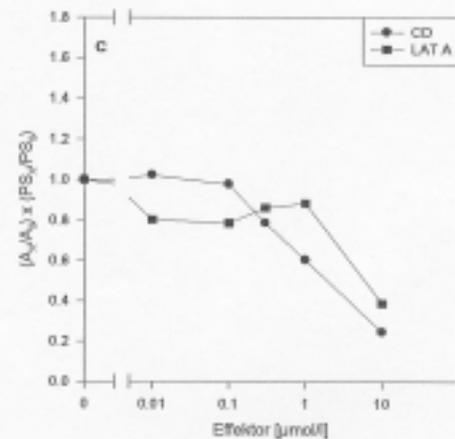
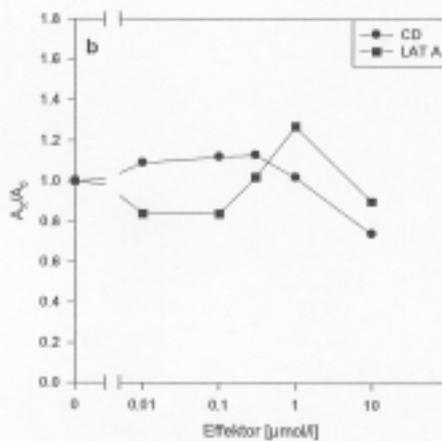
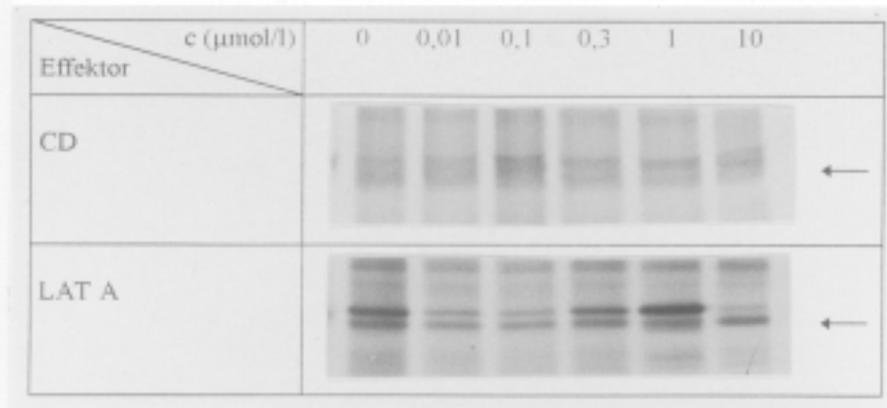


Abb. 7: Einfluß der Konzentration von CD und LAT A auf die Neusynthese von c-jun

Versuchsdurchführung: s.Legende zu Abb. 3, S.33

Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter Verwendung des hergestellten Zellysats gemäß Kap. 2.6.2 (s.S.16) und Kap.2.6.3 (s.S.17)

Radioaktivität des eingesetzten Zellysats: 167 kBq (=10<sup>7</sup> dpm)

a: Autoradiographische Darstellung der c-jun-Banden (M<sub>r</sub> 39 kD ←)

b: Graphische Darstellung der relativen Absorption ( $A_x/A_0$ ) der c-jun-Banden von a)

A<sub>0</sub>: Absorption der c-jun-Bande ohne Effektor (=Kontrolle)

A<sub>x</sub>: Absorption der c-jun-Banden mit Effektor

c: c-jun-Synthese bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation:

Die unter b) ermittelte Neusynthese von c-jun ( $A_x/A_0$ ) wurde mit einem Faktor multipliziert, der sich aus der relativen Proteinsynthese ( $PS_x/PS_0$ ) der Zellpopulation (s. Abb. 3b, S.33) ergab.

### **3.4 Einfluß der Einwirkungsdauer von Cytochalasin D, Latrunculin A und B auf die Gesamtproteinsynthese und die Synthese von Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen in exponentiell wachsenden Fibroblasten**

Im vorhergehenden Versuch (s.Kap.3.3, S.30) war gezeigt worden, daß die Gesamtproteinsynthese, in Abhängigkeit von der Effektorkonzentration, sinkt und die Neusynthese von Proto-Onkogen-Produkten und Cyclinen pro Zelle abnimmt.

Nachfolgend sollte nun der Einfluß der Einwirkungsdauer von CD, LAT A und B auf die Gesamtproteinsynthese und die Synthese von Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen bei Wi-38-Fibroblasten untersucht werden.

#### **Gesamtproteinsynthese:**

Mit zunehmender Einwirkungsdauer von CD, LAT A oder B kam es zu einem fortschreitenden Abfall der Gesamtproteinsynthese (s.Abb. 8, S.41). Nach 8stündiger Inkubation mit Effektoren war die Proteinsynthese im Vergleich zum unbehandelten Ausgangswert um 75 % (CD), 58 % (LAT A) und 85 % (LAT B) abgefallen. Die Hemmung der Gesamtproteinsynthese nahm erneut in der Reihenfolge LAT B > CD > LAT A ab.

#### **Cyclin D1-Synthese:**

##### **– Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine (s.Abb. 9b, S.42):**

Die Cyclin D1-Synthese zeigte keine deutlichen Veränderungen, in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer der Effektoren. Sie lag zwischen 89 % und 109 % (CD), 73 % und 96 % (LAT A), sowie 86 % und 119 % (LAT B) der Synthese unbehandelter Kulturen.

##### **– Bezogen auf die gleiche Zellzahl (s.Abb. 9c, S.42):**

Bei Zugabe von CD, LAT A und B kam es zu einem kontinuierlichen Abfall der Cyclin D1-Synthese pro Zelle in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer der Effektoren. Nach 8 Stunden war die Cyclin D1-Neusynthese auf 23 % (CD), 31 % (LAT A) und 13 % (LAT B) der Synthese der unbehandelten Kulturen abgefallen.

#### **Cyclin E-Synthese:**

##### **– Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine (s. Abb. 10b, S.43):**

Die Cyclin E-Synthese wies, in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer der Effektoren, relativ starke Schwankungen gegenüber der Synthese der unbehandelten Proben auf. Unter Zugabe von LAT B betrugen die Abweichungen gegenüber dem Ausgangswert zwischen -21 % und +42 %. Bei Zusatz von LAT A war die Cyclin E-Synthese insgesamt erniedrigt, sie lag zwischen 54 % und 81 % der Kontrolle. Eine eindeutige Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer war nicht

erkennbar. Der Versuch, bei dem CD als Effektor zugesetzt wurde, war aufgrund eines methodischen Fehlers nicht quantitativ auswertbar.

– **Bezogen auf die gleiche Zellzahl (s. Abb. 10c, S.43):**

Bei Zugabe von LAT A und B kam es zu einem Abfall der Cyclin E-Synthese, wobei die niedrigsten Werte nach 8stündiger Einwirkungsdauer auftraten. Dann war die Cyclin E-Synthese auf 31 % (LAT A) bzw. 12 % (LAT B) der Ausgangssynthese abgesunken.

**Cyclin A-Synthese:**

– **Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine (s.Abb. 11b, S.44):**

Cyclin A zeigte bei den drei eingesetzten Effektoren unterschiedliche Synthesemuster. Bei Zugabe von CD und LAT A fiel die Cyclin A-Synthese ab. Sie lag zwischen 77 % und 86 % (CD) bzw. 63 % und 90 % (LAT A) der Synthese der Kontrollen. Dagegen stieg die Cyclin A-Synthese in den Kulturen an, die mit LAT B versetzt worden waren. Hier wurde nach 4stündiger Einwirkungsdauer mit 158 % der Kontrollsynthese der maximale Wert erreicht. Eine zusammenfassende Betrachtung der Wirkung dieser drei Effektoren läßt erkennen, daß gegenüber dem Ausgangswert keine gleichsinnige Abweichung eingetreten ist. Es ist anzunehmen, daß es sich bei den beschriebenen Stimulierungs- und Hemmeffekten um methodisch bedingte Schwankungen handelt.

– **Bezogen auf die gleiche Zellzahl (s.Abb. 11c, S.44):**

Die Cyclin A-Synthese fiel mit zunehmender Einwirkungsdauer ab. Sie erreichte 8 Stunden nach Effektorenzugabe mit 21 % (CD), 33 % (LAT A) bzw. 19 % (LAT B) der Synthese der unbehandelten Kontrollen die minimalen Werte.

**c-jun-Synthese:**

– **Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine (s.Abb. 12b, S.45):**

Es war keine wesentliche Änderung der c-jun-Synthese feststellbar, wenn CD für verschiedene Zeiten zugegeben wurde. Die Neusynthese des Proto-Onkogen-Proteins lag zwischen 88 % und 113 % gegenüber der Synthese der unbehandelten Kontrolle. Die bei Zugabe von LAT A und B erhaltenen c-jun-Banden waren aufgrund eines methodischen Fehlers quantitativ nicht auswertbar.

– **Bezogen auf die gleiche Zellzahl (s.Abb. 12c, S.45):**

Die c-jun-Synthese fiel mit zunehmender Einwirkungsdauer von CD kontinuierlich ab. Sie war nach 8 Stunden auf ein Viertel der Ausgangssynthese gesunken.

**c-fos- und c-myc-Synthese:**

In exponentiell wachsenden Wi-38-Zellen waren die Proto-Onkogen-Proteine c-fos und c-myc nicht nachweisbar.

**Zusammenfassende Bewertung:**

Die Gesamtproteinsynthese wurde mit steigender Einwirkungsdauer der Effektoren zunehmend gehemmt. Die Hemmung der Gesamtproteinsynthese nahm in der Reihenfolge LAT B > CD > LAT A ab. Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine ergab sich keine eindeutige Änderung der Synthese der untersuchten Proto-Onkogen-Proteine und Cycline in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer der Effektoren. Jedoch kam es, bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation, mit steigender Einwirkungsdauer von CD, LAT A oder B zu einer deutlichen Verminderung der c-jun-, Cyclin D1-, Cyclin E- und Cyclin A- Synthese.

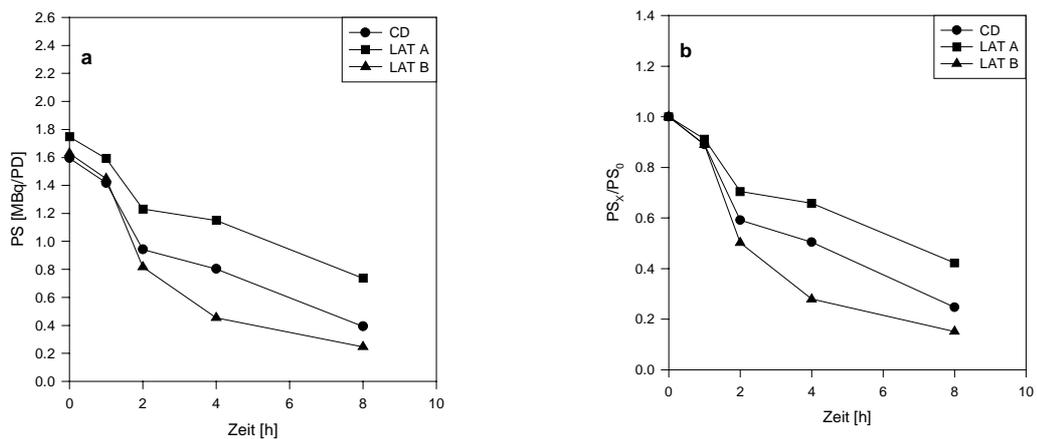


Abb. 8: Einfluß von CD, LAT A und B auf die Proteinsynthese von Wi-38-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Zelleinsaat: 300 000 Z/PD (ZD=350 Z/mm<sup>2</sup>)

Kulturmedium: MEM + 20 % FKS

Vorkultur: 16 h; danach

Inkubation mit Effektoren (je 1 µmol/l) für unterschiedliche Zeiten

Pulsmarkierung mit [<sup>35</sup>S]-Met [7,4 MBq/ml]: 1 h am Ende jeder

Inkubationsperiode

Herstellung eines Zellysats und Aufarbeitung der Proben zur Messung der inkorporierten Radioaktivität gemäß Kap. 2.6.1 (s.S. 15)

**a:** Graphische Darstellung der Gesamtproteinsynthese (PS) pro Gewebekulturschale [MBq/PD]

**b:** Graphische Darstellung der relativen Gesamtproteinsynthese (PS<sub>x</sub>/PS<sub>0</sub>)

PS<sub>0</sub>: Proteinsynthese der Probe<sub>0</sub> (Kontrolle: vor Zugabe der Effektoren)

PS<sub>x</sub>: Proteinsynthese der Probe<sub>x</sub>

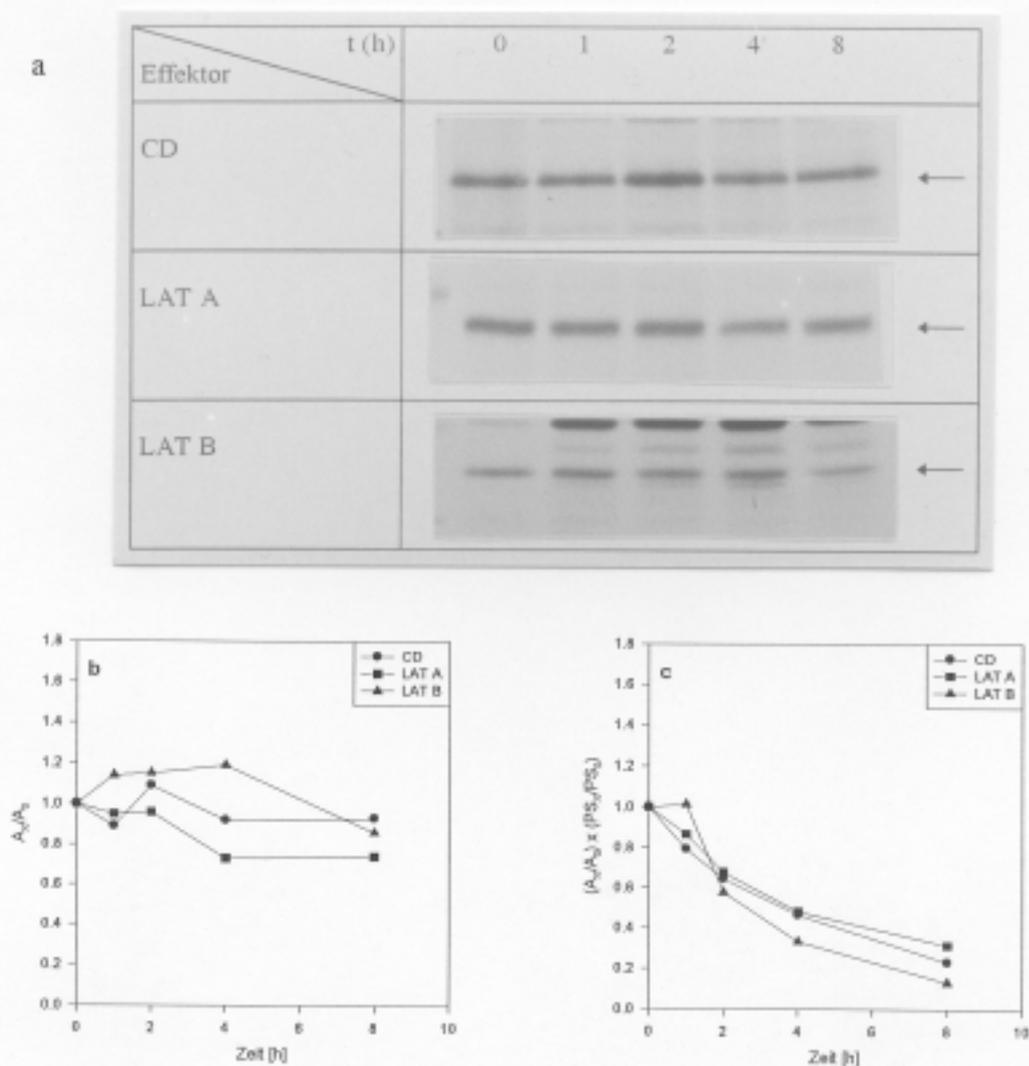


Abb. 9: Einfluß von CD, LAT A und LAT B auf die Neusynthese von Cyclin D1 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Versuchsdurchführung: s. Legende zu Abb. 8, S.41

Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter Verwendung des hergestellten Zellysats gemäß Kap. 2.6.2 (s.S.16) und Kap.2.6.3 (s.S.17)

Radioaktivität des eingesetzten Zellysats: 167 kBq (=10<sup>7</sup> dpm)

**a:** Autoradiographische Darstellung der Cyclin D1-Banden (M<sub>r</sub> 36 kD ←)

**b:** Graphische Darstellung der relativen Absorption ( $A_x/A_0$ ) der Cyclin D1-Banden von a)

$A_0$ : Absorption der Cyclin D1-Bande vor Effektorzugabe (=Kontrolle)

$A_x$ : Absorption der Cyclin D1-Banden nach Effektorzugabe

**c:** Cyclin D1-Synthese bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation:

Die unter b) ermittelte Neusynthese von Cyclin D1 ( $A_x/A_0$ ) wurde mit einem Faktor multipliziert, der sich aus der relativen Proteinsynthese ( $PS_x/PS_0$ ) der Zellpopulation (s. Abb. 8b, S.41) ergab.

a

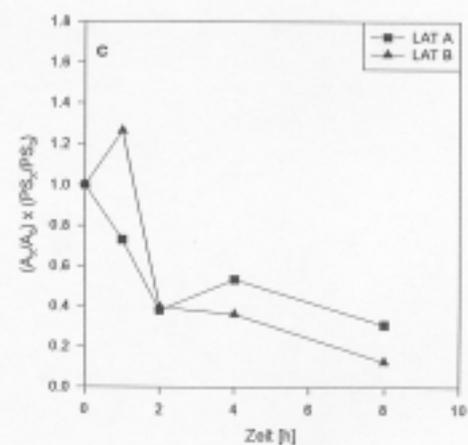
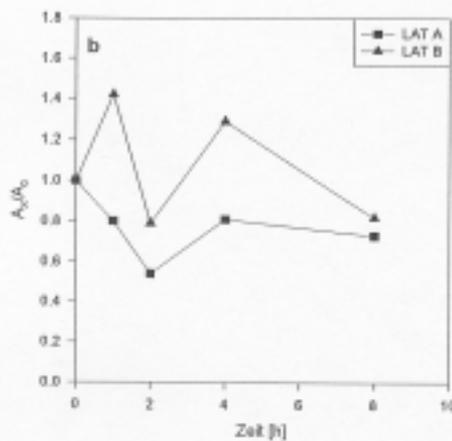
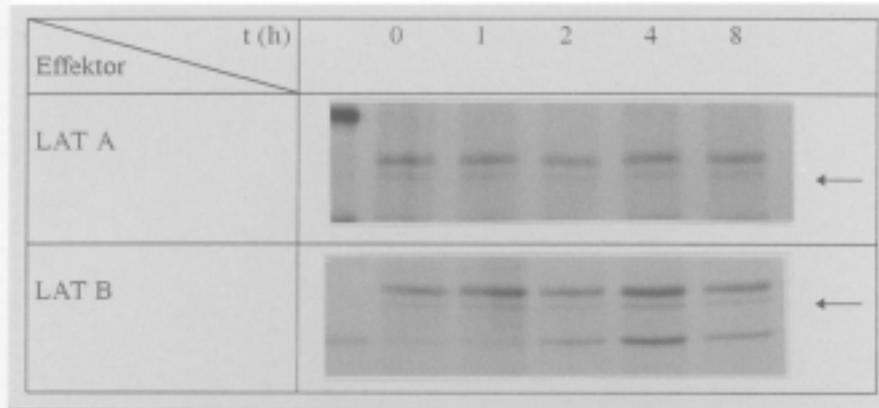


Abb. 10: Einfluß von LAT A und LAT B auf die Neusynthese von Cyclin E in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Versuchsdurchführung: s. Legende zu Abb. 8, S. 41

Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter Verwendung des hergestellten Zellysats gemäß Kap. 2.6.2 (s. S. 16) und Kap. 2.6.3 (s. S. 17)

Radioaktivität des eingesetzten Zellysats: 167 kBq ( $=10^7$  dpm)

a: Autoradiographische Darstellung der Cyclin E-Banden ( $M_r$  50 kD  $\leftarrow$ )

b: Graphische Darstellung der relativen Absorption ( $A_x/A_0$ ) der Cyclin E-Banden von a)

$A_0$ : Absorption der Cyclin E-Bande vor Effektorzugabe (=Kontrolle)

$A_x$ : Absorption der Cyclin E-Banden nach Effektorzugabe

c: Cyclin E-Synthese bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation:

Die unter b) ermittelte Neusynthese von Cyclin E ( $A_x/A_0$ ) wurde mit einem Faktor multipliziert, der sich aus der relativen Proteinsynthese ( $PS_x/PS_0$ ) der Zellpopulation (s. Abb. 8b, S. 41) ergab.

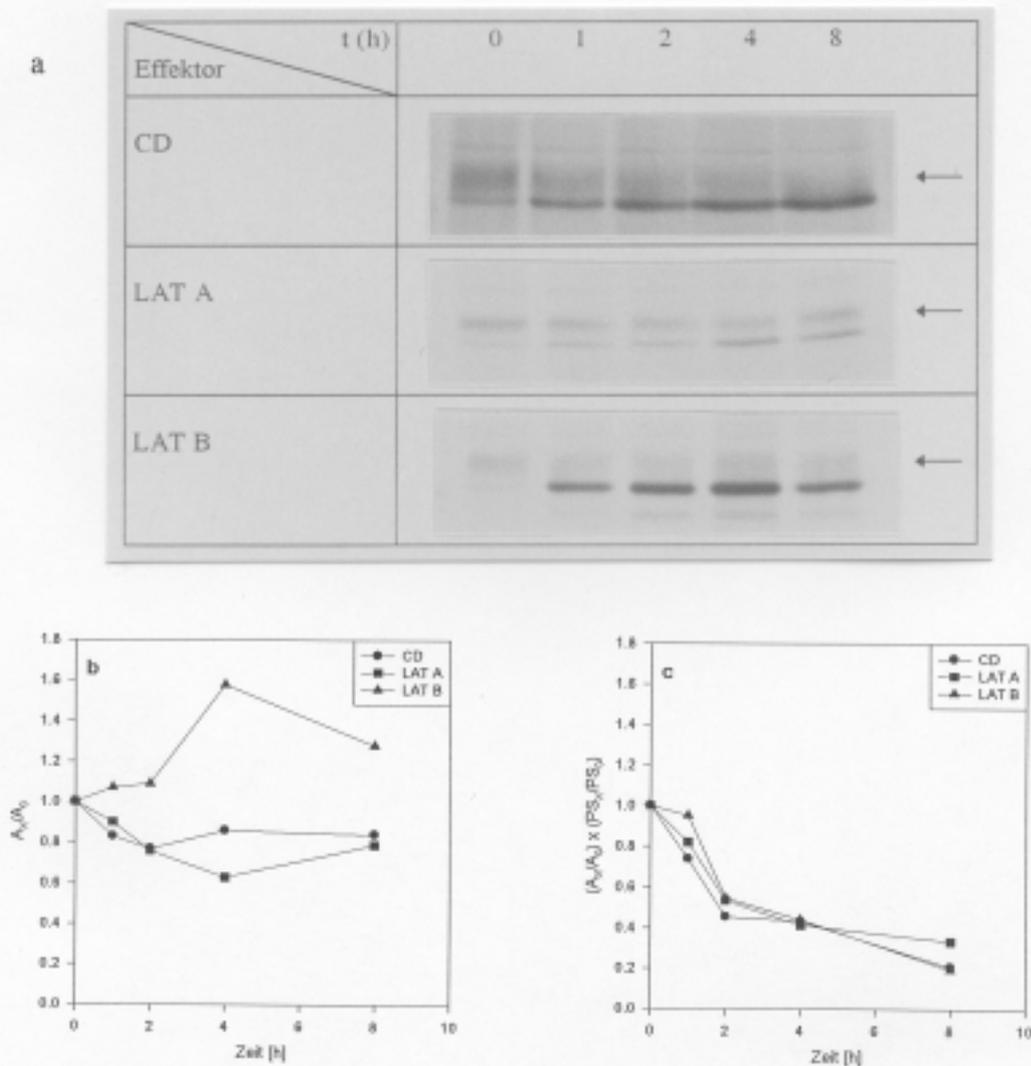


Abb. 11: Einfluß von CD, LAT A und LAT B auf die Neusynthese von Cyclin A in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Versuchsdurchführung: s.Legende zu Abb. 8, S.41

Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter Verwendung des hergestellten Zellysats gemäß Kap. 2.6.2 (s.S.16) und Kap.2.6.3 (s.S.17)

Radioaktivität des eingesetzten Zellysats: 167 kBq (=10<sup>7</sup> dpm)

a: Autoradiographische Darstellung der Cyclin A-Banden (M<sub>r</sub> 50 kD ←)

b: Graphische Darstellung der relativen Absorption (A<sub>w</sub>/A<sub>0</sub>) der Cyclin A-Banden von a)

A<sub>0</sub>: Absorption der Cyclin A-Bande vor Effektorzugabe (=Kontrolle)

A<sub>x</sub>: Absorption der Cyclin A-Banden nach Effektorzugabe

c: Cyclin A-Synthese bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation:

Die unter b) ermittelte Neusynthese von Cyclin A (A<sub>w</sub>/A<sub>0</sub>) wurde mit einem Faktor multipliziert, der sich aus der relativen Proteinsynthese (PS<sub>x</sub>/PS<sub>0</sub>) der Zellpopulation (s. Abb. 8b, S.41) ergab.

a

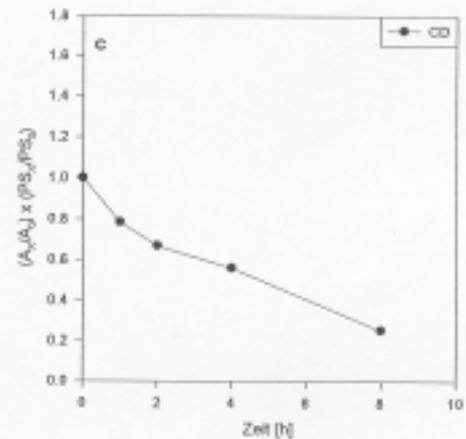
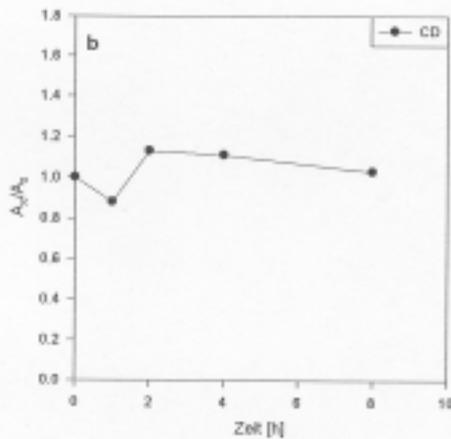
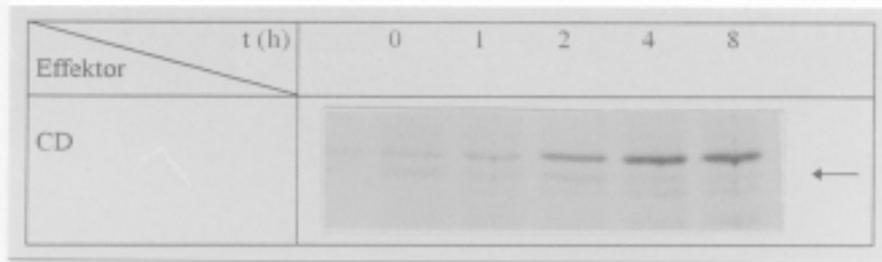


Abb. 12: Einfluß von CD auf die Neusynthese von c-jun in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Versuchsdurchführung: s. Legende zu Abb. 8, S. 41

Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter Verwendung des hergestellten Zellysats gemäß Kap. 2.6.2 (s. S. 16) und Kap. 2.6.3 (s. S. 17)

Radioaktivität des eingesetzten Zellysats: 167 kBq (=10<sup>7</sup> dpm)

a: Autoradiographische Darstellung der c-jun-Banden (M<sub>r</sub> 39 kD ←)

b: Graphische Darstellung der relativen Absorption (A<sub>x</sub>/A<sub>0</sub>) der c-jun-Banden von a)

A<sub>0</sub>: Absorption der c-jun-Bande vor CD-Zugabe (=Kontrolle)

A<sub>x</sub>: Absorption der c-jun-Banden nach CD-Zugabe

c: c-jun-Synthese bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation:

Die unter b) ermittelte Neusynthese von c-jun (A<sub>x</sub>/A<sub>0</sub>) wurde mit einem Faktor multipliziert, der sich aus der relativen Proteinsynthese (PS<sub>x</sub>/PS<sub>0</sub>) der Zellpopulation (s. Abb. 8b, S. 41) ergab.

### **3.5 Einfluß von Cytochalasin D und Latrunculin A auf die Gesamtproteinsynthese und die Synthese von Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen bei Restimulation nach Serummangel**

Im Kap. 3.1.3 (s.S. 22) konnte gezeigt werden, daß CD und LAT A den Neueintritt von Wi-38-Fibroblasten in den Zellzyklus verhindern, wenn die Zellen, nach Kultivierung in Serummangelmedium, durch FKS-Zugabe wachstumsstimuliert werden.

Nun sollte untersucht werden, ob eine Alteration des Mikrofilamentsystems durch CD und LAT A die Gesamtproteinsynthese und die Synthese von Proto-Onkogen-Produkten und Cyclinen bei Restimulation nach G<sub>0</sub>-Arrest beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden Wi-38-Fibroblasten, nach Kultivierung in Serummangelmedium für 60 Stunden, mit FKS, in An- oder Abwesenheit von Effektoren, reaktiviert.

#### **Gesamtproteinsynthese:**

Bei Restimulation in Abwesenheit von Effektoren stieg die Gesamtproteinsynthese, im Vergleich zur nicht reaktivierten Probe, auf über das 6fache an und erreichte nach 12 Stunden ein Maximum (s.Abb. 13, S.49). Durch Zugabe von CD bzw. LAT A (je 1 µmol/l) fiel der Zuwachs der Gesamtproteinsynthese deutlich geringer aus. 16 Stunden nach Reaktivierung war die Gesamtproteinsynthese, im Vergleich zur nicht reaktivierten Probe, lediglich um 32 % gestiegen (CD) bzw. um 9 % gesunken (LAT A).

In den restimulierten Proben, denen CD zugesetzt wurde, war nach 2 Stunden ein Anstieg der Gesamtproteinsynthese auf das 2,5fache der nicht reaktivierten Kontrolle zu beobachten. Bei mit LAT A behandelten Kulturen trat dieser Anstieg nicht auf.

#### **Cyclin D1-Synthese:**

##### **– Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine (s.Abb. 14b, S.50):**

Die Cyclin D1-Synthese war zwischen 4 und 8 Stunden nach Serumstimulierung maximal. In den gleichzeitig mit CD behandelten Kulturen dagegen kam es zu keiner erkennbaren Cyclin D1-Induktion. Bei Zugabe von LAT A lag die Cyclin D1-Synthese sogar unter dem Wert vor Serumrestimulation.

##### **– Bezogen auf die gleiche Zellzahl (s.Abb. 14c, S.50):**

Der Unterschied zwischen mit Effektor behandelten und unbehandelten Kulturen wurde nun besonders deutlich. In den Proben, denen kein Effektor zugesetzt worden war, stieg die Cyclin D1-Synthese zwischen 8 und 12 Stunden nach Restimulation auf über das 10fache an. Dagegen war ein Anstieg, in den mit LAT A behandelten Proben, nicht zu erkennen. Auch bei Zugabe von CD war lediglich 2 Stunden nach Serumstimulierung ein Zuwachs auf das 2,7fache des

Ausgangswertes zu verzeichnen. Danach kam es wieder zum Absinken der Cyclin D1-Synthese. Nach 16 Stunden lag sie unterhalb der Ausgangssynthese.

#### **Cyclin E-Synthese:**

– **Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine (s.Abb. 15b, S.51):**

Im Zeitraum zwischen 8 und 12 Stunden nach Serumreaktivierung war die Cyclin E-Synthese bei allen Proben maximal. Die Unterschiede zwischen mit Effektor behandelten und unbehandelten Kulturen waren gering. Der etwas stärkere Anstieg der Neusynthese von Cyclin E bei Anwesenheit sowohl von CD als auch von LAT A gegenüber den Proben, die allein mit FKS reaktiviert wurden, liegt im Bereich der methodisch bedingten Streuung.

– **Bezogen auf die gleiche Zellzahl (s.Abb. 15c, S.51):**

Die Cyclin E-Synthese stieg nach Serumstimulierung in den unbehandelten Kulturen, im Vergleich zu mit CD und LAT A behandelten Proben, stärker an. Sie war bei allen Untersuchungen 8 Stunden nach Restimulation maximal. Zu diesem Zeitpunkt war der Anstieg der Cyclin E-Synthese bei den unbehandelten Kulturen mit dem Faktor 8,6 fast doppelt so hoch, wie bei mit CD versetzten Proben (Faktor 4,6). In den Ansätzen, welchen LAT A zugesetzt worden war, fiel die Zunahme noch geringer aus (Faktor 2,6).

#### **Cyclin A-Synthese:**

– **Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine (s.Abb. 16b, S.52):**

Nach Serumzugabe war der Anstieg der Cyclin A-Synthese im Zeitraum zwischen 8 und 12 Stunden nach Reaktivierung maximal, wobei zwischen mit CD (Faktor 2,5 nach 12 h) oder LAT A (Faktor 3,4 nach 8 h) behandelten und unbehandelten (Faktor 2,4 nach 8 h) Kulturen keine wesentlichen Unterschiede bestanden.

– **Bezogen auf die gleiche Zellzahl (s.Abb. 16c, S.52):**

Der maximale Anstieg der Cyclin A-Synthese war in Abwesenheit von Effektoren (Faktor 12,2 nach 12 h) wesentlich größer als in Anwesenheit von CD (Faktor 4,9 nach 8 h) und LAT A (Faktor 4,7 nach 8 h).

#### **c-fos und c-jun-Synthese:**

Die Kulturen ohne Effektorenzugabe zeigten eine maximale c-fos-Induktion nach 1 Stunde. Die c-jun-Synthese war nach 2 Stunden am höchsten (s.Abb. 17, S.53).

Da bei den Zellen, welche mit CD bzw. LAT A behandelt wurden, die c-fos und c-jun-Banden nur schlecht gegen den Hintergrund abzugrenzen waren, mußte auf eine quantitative Auswertung verzichtet werden.

**c-myc-Synthese:**

Das Proto-Onkogen-Protein c-myc war in serumrestimulierten Fibroblasten nicht nachweisbar. Eine ungenügende Reaktivität des verwendeten Antikörpers kann nicht sicher ausgeschlossen werden.

**Zusammenfassende Bewertung:**

Werden Wi-38-Fibroblasten nach Serummangelkultur durch FKS-Zugabe restimuliert, so kommt es zu einem starken Ansteigen der Gesamtproteinsynthese. Dieser Anstieg wird bei Alteration des Mikrofilamentsystems durch CD bzw. LAT A gehemmt. Die Zunahme der Neusynthese von Cyclin E und Cyclin A fällt bei Zugabe dieser Effektoren im Rahmen der inhibierten Gesamtproteinsynthese ab. Besonders hervorzuheben ist, daß der Anstieg der Cyclin D1-Synthese über den Abfall der Gesamtproteinsynthese hinaus durch Zusatz von CD und LAT A vermindert wird.

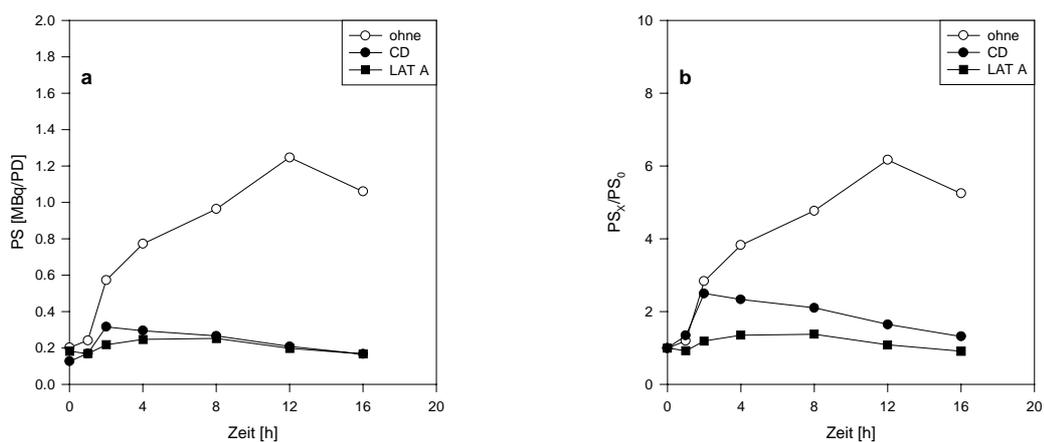


Abb. 13: Einfluß von CD und LAT A auf die **Proteinsynthese** von Wi-38-Fibroblasten bei Reaktivierung nach Serummangelmedium

Zelleinsaat: 300 000 Z/PD (ZD=350 Z/mm<sup>2</sup>)

Kulturmedium: MEM + 20 % FKS

Vorkultur: 16 h

Serummangelmedium: MEM + 0,5 % FKS

Kulturdauer: 60 h

Reaktivierung mit MEM + 20 % FKS in Gegenwart von CD und LAT A (je 1 µmol/l) oder in Abwesenheit von Effektoren

Pulsmarkierung mit [<sup>35</sup>S]-Met [7,4 MBq/ml]: 1 h am Ende jeder Kulturperiode

Herstellung eines Zellysats und Aufarbeitung der Proben zur Messung der inkorporierten Radioaktivität gemäß Kap. 2.6.1 (s.S. 15)

**a:** Graphische Darstellung der Gesamtproteinsynthese (PS) pro Gewebekulturschale [MBq/PD]

**b:** Graphische Darstellung der relativen Gesamtproteinsynthese (PS<sub>x</sub>/PS<sub>0</sub>)  
 PS<sub>0</sub>: Proteinsynthese der Proben vor Reaktivierung mit FKS (=Kontrolle)

PS<sub>x</sub>: Proteinsynthese der Proben nach Reaktivierung mit FKS

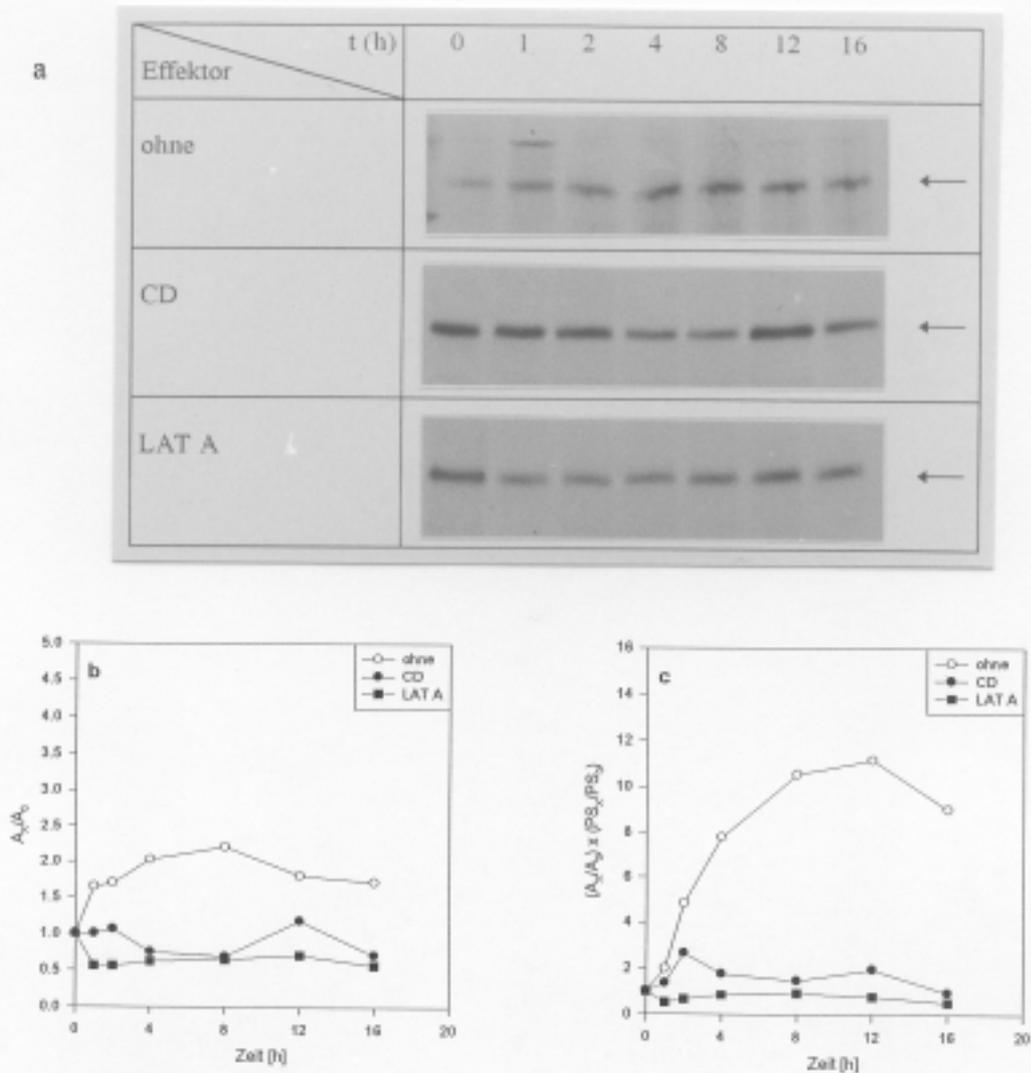


Abb. 14: Einfluß von CD und LAT A auf die Cyclin D1-Synthese bei Reaktivierung von Wi-38-Fibroblasten nach Serummangelmedium

Versuchsdurchführung: s.Legende zu Abb. 13, S.49

Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter Verwendung des hergestellten Zellysats gemäß Kap. 2.6.2 (s.S.16) und Kap.2.6.3 (s.S.17)

Radioaktivität des eingesetzten Zellysats: 83 kBq (=5x10<sup>6</sup> dpm)

**a:** Autoradiographische Darstellung der Cyclin D1-Banden (M<sub>r</sub> 36 kD ←)

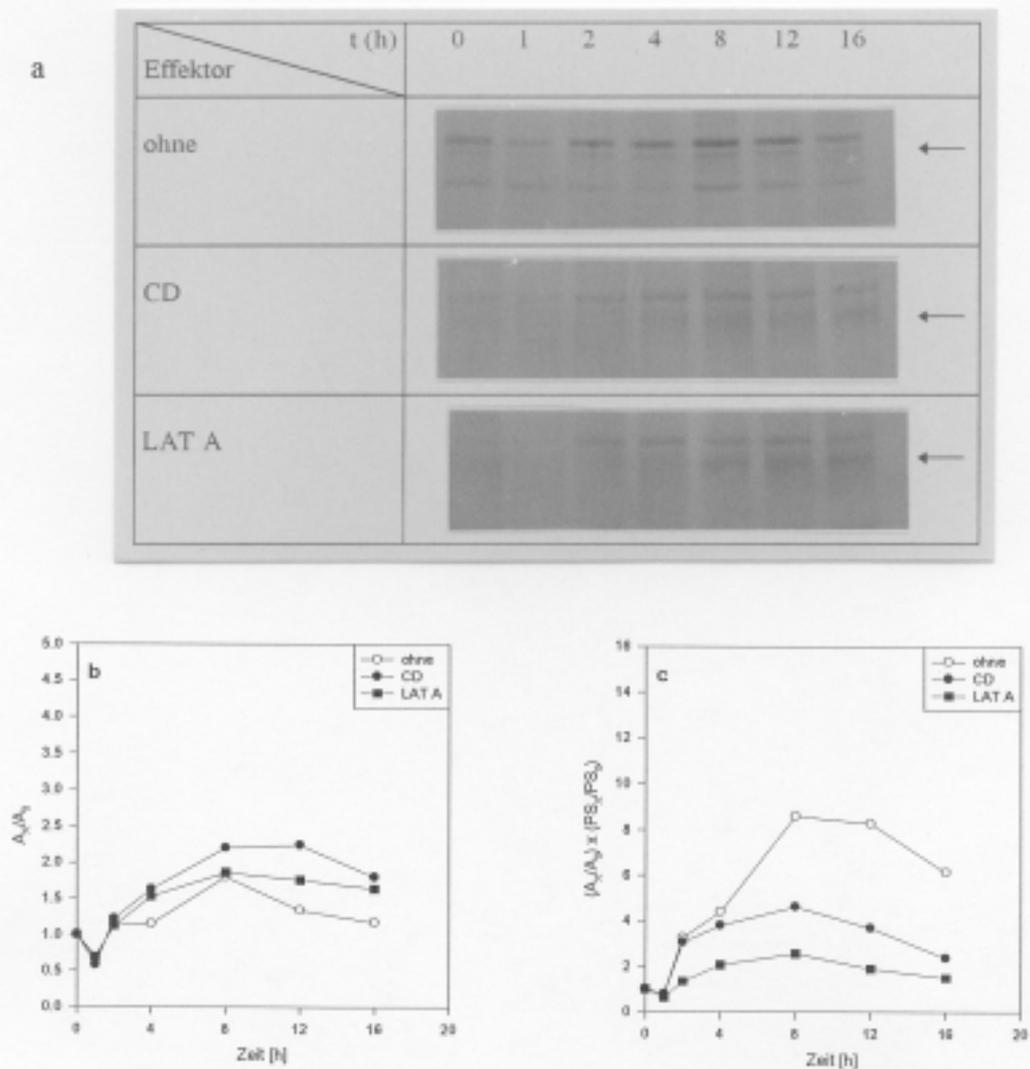
**b:** Graphische Darstellung der relativen Absorption (A<sub>x</sub>/A<sub>0</sub>) der Cyclin D1-Banden von a)

A<sub>0</sub>: Absorption der Cyclin D1-Bande vor Reaktivierung (=Kontrolle)

A<sub>x</sub>: Absorption der Cyclin D1-Banden nach Reaktivierung

**c:** Cyclin D1-Synthese bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation:

Die unter b) ermittelte Neusynthese von Cyclin D1 (A<sub>x</sub>/A<sub>0</sub>) wurde mit einem Faktor multipliziert, der sich aus der relativen Proteinsynthese (PS<sub>x</sub>/PS<sub>0</sub>) der Zellpopulation (s. Abb. 13b, S.49) ergab.



**Abb. 15:** Einfluß von CD und LAT A auf die Cyclin E-Synthese bei Reaktivierung von Wi-38-Fibroblasten nach Serummangelmedium

Versuchsdurchführung: s.Legende zu Abb. 13, S.49

Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter Verwendung des hergestellten Zellysats gemäß Kap. 2.6.2 (s.S.16) und Kap.2.6.3 (s.S.17)

Radioaktivität des eingesetzten Zellysats: 83 kBq (=5x10<sup>6</sup> dpm)

**a:** Autoradiographische Darstellung der Cyclin E-Banden (M<sub>r</sub> 50 kD ←)

**b:** Graphische Darstellung der relativen Absorption (A<sub>x</sub>/A<sub>0</sub>) der Cyclin E-Banden von a)

A<sub>0</sub>: Absorption der Cyclin E-Bande vor Reaktivierung (=Kontrolle)

A<sub>x</sub>: Absorption der Cyclin E-Banden nach Reaktivierung

**c:** Cyclin E-Synthese bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation:

Die unter b) ermittelte Neusynthese von Cyclin E (A<sub>x</sub>/A<sub>0</sub>) wurde mit einem Faktor multipliziert, der sich aus der relativen Proteinsynthese (PS<sub>x</sub>/PS<sub>0</sub>) der Zellpopulation (s. Abb. 13b, S.49) ergab.

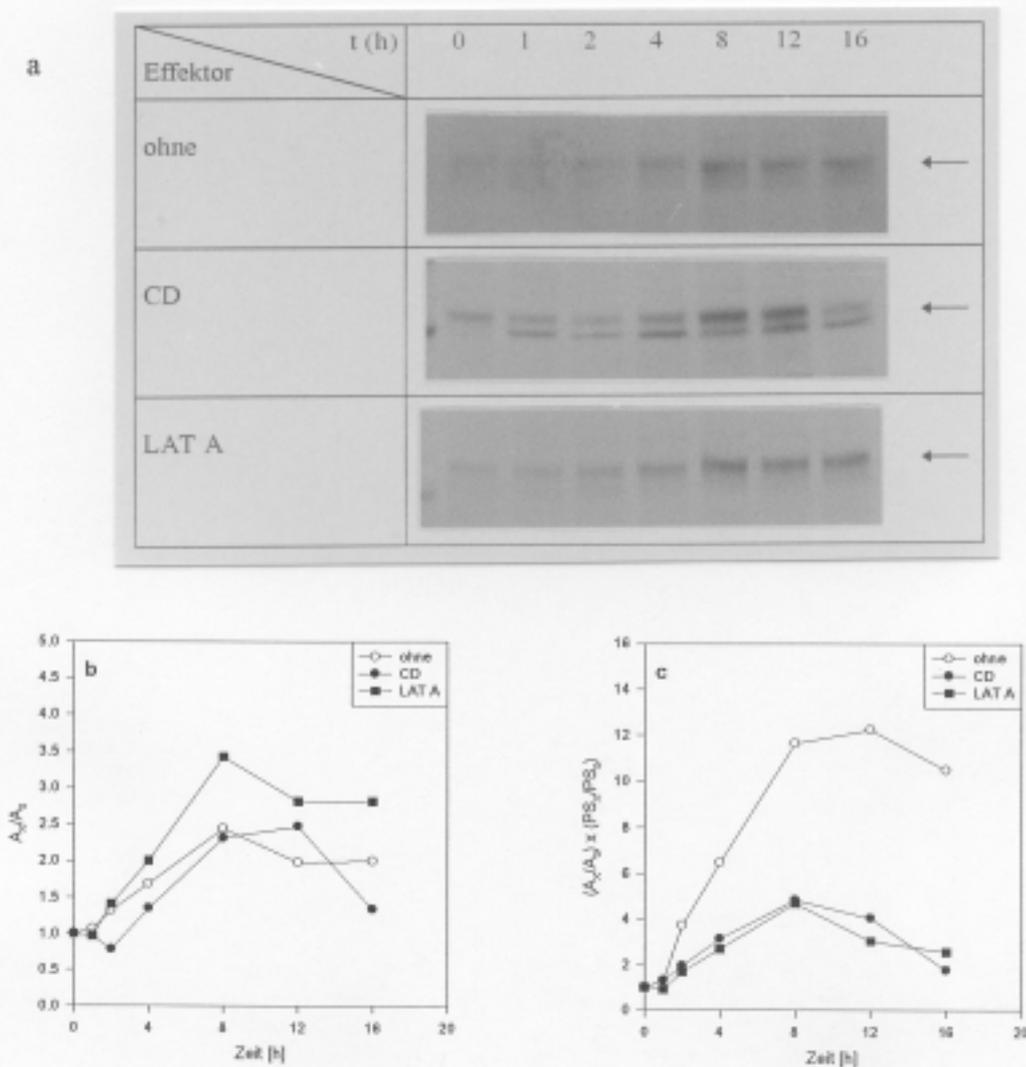


Abb. 16: Einfluß von CD und LAT A auf die Cyclin A-Synthese bei Reaktivierung von Wi-38-Fibroblasten nach Serummangelmedium

Versuchsdurchführung: s. Legende zu Abb. 13, S. 49

Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter Verwendung des hergestellten Zellysats gemäß Kap. 2.6.2 (s. S. 16) und Kap. 2.6.3 (s. S. 17)

Radioaktivität des eingesetzten Zellysats: 83 kBq (=  $5 \times 10^6$  dpm)

**a:** Autoradiographische Darstellung der Cyclin A-Banden ( $M_r$  50 kD ←)

**b:** Graphische Darstellung der relativen Absorption ( $A_x/A_0$ ) der Cyclin A-Banden von a)

$A_0$ : Absorption der Cyclin A-Bande vor Reaktivierung (=Kontrolle)

$A_x$ : Absorption der Cyclin A-Banden nach Reaktivierung

**c:** Cyclin A-Synthese bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation:

Die unter b) ermittelte Neusynthese von Cyclin A ( $A_x/A_0$ ) wurde mit einem Faktor multipliziert, der sich aus der relativen Proteinsynthese ( $PS_x/PS_0$ ) der Zellpopulation (s. Abb. 13b, S. 49) ergab.

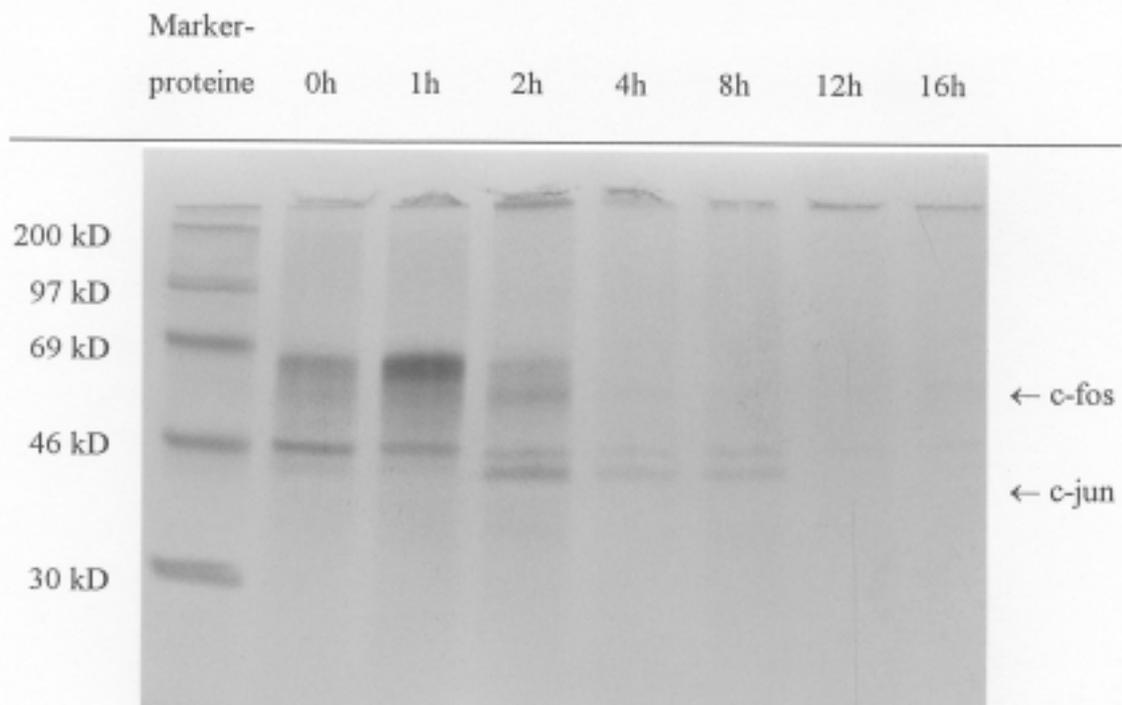


Abb. 17: Synthese der Proto-Onkogen-Proteine c-fos und c-jun bei Reaktivierung von Wi-38-Fibroblasten nach Serumangelmedium

Versuchsdurchführung: s.Legende zu Abb. 13, S.49

Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter Verwendung des hergestellten Zellysats gemäß Kap. 2.6.2 (s.S.16) und Kap.2.6.3 (s.S.17)

Radioaktivität des eingesetzten Zellysats: 83 kBq (=5x10<sup>6</sup> dpm)

Autoradiographische Darstellung der c-fos- (← c-fos) und c-jun- (← c-jun)

Banden zu unterschiedlichen Zeiten nach Serumreaktivierung

### **3.6 Einfluß von Cytochalasin D auf die Gesamtproteinsynthese und die Synthese von Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen bei Restimulation durch Zelladhäsion und Zellabflachung nach Suspensionskultur**

Verschiedene nichttransformierte Zellarten können erst dann proliferieren, wenn ihnen die Haftung an ein geeignetes Substratum ermöglicht wird. Diese Form der Wachstumsregulation wird als „anchorage dependence“ bezeichnet (STOKER et al., 1968). Sie gilt auch für Wi-38-Fibroblasten (HAYFLICK und MOORHEAD 1961; HAYFLICK 1965).

Im folgenden wurde untersucht, wie sich die Gesamtproteinsynthese und die Synthese von Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen verhalten, wenn Zellen nach 12stündiger Suspensionskultur in unbeschichtete Gewebekulturschalen überführt werden, die ihnen die Wiederanhaftung und Zellabflachung ermöglichen. Desweiteren wurde der Einfluß von CD auf diese Reaktivierung untersucht.

#### **Gesamtproteinsynthese:**

Die Gesamtproteinsynthese stieg bei Restimulation in Abwesenheit von CD, im Vergleich zur nicht reaktivierten Probe, kontinuierlich an und hatte sich nach 16 Stunden mehr als versechsfacht (s.Abb. 18, S.56). Dieser Anstieg wurde bei Kultivierung in Anwesenheit von CD vollständig unterdrückt.

#### **Cyclin D1-Synthese:**

##### **– Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine (s.Abb. 19b, S.57):**

Ein Anstieg der Cyclin D1-Synthese konnte 8 Stunden nach Transplantation der Zellen auf ein Substratum, das Zellhaftung und Zellausbreitung erlaubte, festgestellt werden. Er war 12 Stunden nach Reaktivierung maximal (Faktor 1,9). In mit CD behandelten Kulturen war der Anstieg der Cyclin D1-Neusynthese geringer, 12 Stunden nach Reaktivierung jedoch ebenfalls deutlich sichtbar (Faktor 1,7).

##### **– Bezogen auf die gleiche Zellzahl (s.Abb. 19c, S.57)**

Bei den unbehandelten Kulturen zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Synthese über die gesamten 16 Stunden. Nach 16 Stunden war der Cyclin D1-Gehalt pro Zelle auf über das 11fache im Vergleich zum Ausgangswert angestiegen. Die Cyclin D1-Synthese in mit CD behandelten Kulturen dagegen zeigte lediglich einen leichten Anstieg mit einem Maximum nach 12 Stunden (Faktor 2).

### **Cyclin A-Synthese:**

– **Bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierter Proteine (s.Abb. 20b, S.58):**

Nach Zellhaftung an ein geeignetes Substratum kam es zu einer deutlich ansteigenden Synthese von Cyclin A, die 8 Stunden nach Transplantation über das 4fache des Ausgangswertes betrug. Der Anstieg der Cyclin A-Neusynthese in den mit CD behandelten Proben verlief, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, flacher, war jedoch 12 Stunden nach Transplantation der Zellen deutlich sichtbar (Faktor 2,8). Der extrem niedrige 8 Stunden Cyclin A-Wert, bei der mit CD behandelten Probe, ist möglicherweise experimentell bedingt.

– **Bezogen auf die gleiche Zellzahl (s.Abb. 20c, S.58):**

Es ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen mit CD behandelten und unbehandelten Proben. Während es in Abwesenheit von CD zu einem kontinuierlichen Anstieg der Cyclin A -Synthese auf über das 20fache kam, war der Anstieg bei mit CD behandelten Kulturen sehr gering (Faktor 3,3 nach 12 h).

### **c-fos-, c-jun-, Cyclin E-Synthese:**

Nach 12stündiger Kultivierung von Wi-38-Zellen in Suspension war die Gesamtproteinsynthese soweit abgesunken, daß die Lysate nur noch auf 42 kBq ( $=2,5 \times 10^6$  dpm) normiert werden konnten. In den vorausgegangenen Versuchen war die 2 bis 4fache Radioaktivität für die Immunpräzipitation eingesetzt worden. Die auch vorher, im Vergleich zu den Cyclin D1- und Cyclin A- Banden, schwächeren c-fos-, c-jun- und Cyclin E-Banden waren nicht quantitativ zu verwerten.

### **Zusammenfassende Bewertung:**

Wurden Wi-38-Fibroblasten für 12 Stunden in Suspension gehalten, so war die Gesamtproteinsynthese sehr niedrig. Es kam zu einem starken Anstieg dieser und der Neusynthese von Cyclin D1 und Cyclin A, wenn den Zellen die Wiederanhaftung an ein geeignetes Substratum ermöglicht wurde. Durch eine Desintegration des Mikrofilamentsystems mit CD wurde die Gesamtproteinsynthese und die Neusynthese der Cycline D1 und A stark inhibiert, wobei die Synthese der beiden Cycline nicht sicher über die Gesamtproteinsynthese hinaus vermindert war.

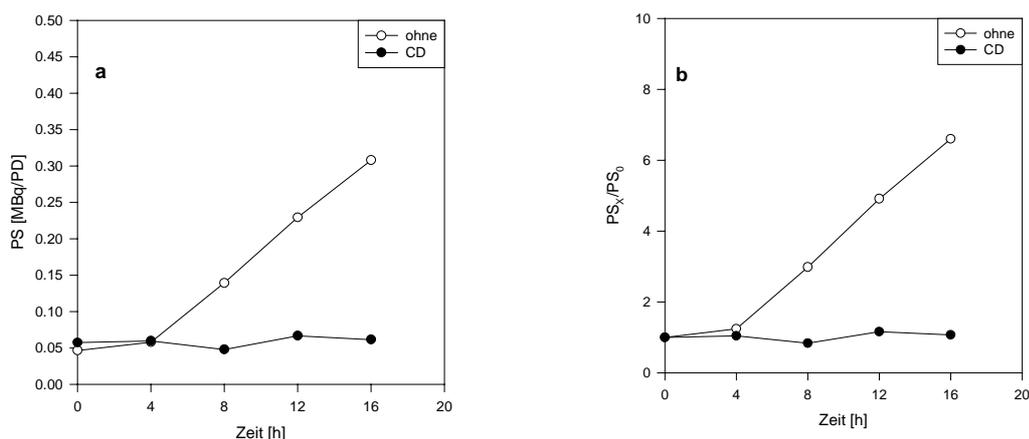


Abb. 18: Einfluß von CD auf die Proteinsynthese bei Reaktivierung von Wi-38-Fibroblasten nach Suspensionskultur

Zelleinsaat: 300 000 Z/PD (ZD=350 Z/mm<sup>2</sup>)

Kulturmedium: MEM + 20 % FKS

Suspensionskultur in mit Poly-HEMA beschichteten Gewebekulturschalen:  
12 h, danach

Reaktivierung durch Überführen der nichthaftenden Zellen in unbeschichtete Gewebekulturschalen in An- und Abwesenheit von CD (1 µmol/l)

Pulsmarkierung mit [<sup>35</sup>S]-Met [7,4 MBq/ml]: 1 h am Ende jeder Kulturperiode

Herstellung eines Zellysats und Aufarbeitung der Proben zur Messung der inkorporierten Radioaktivität gemäß Kap. 2.6.1 (s.S. 15)

**a:** Graphische Darstellung der Gesamtproteinsynthese (PS) pro Gewebekulturschale [MBq/PD]

**b:** Graphische Darstellung der relativen Gesamtproteinsynthese (PS<sub>x</sub>/PS<sub>0</sub>)

PS<sub>0</sub>: Proteinsynthese der Proben in Suspension

PS<sub>x</sub>: Proteinsynthese der Proben nach Transplantation der Zellen in unbeschichtete Gewebekulturschalen

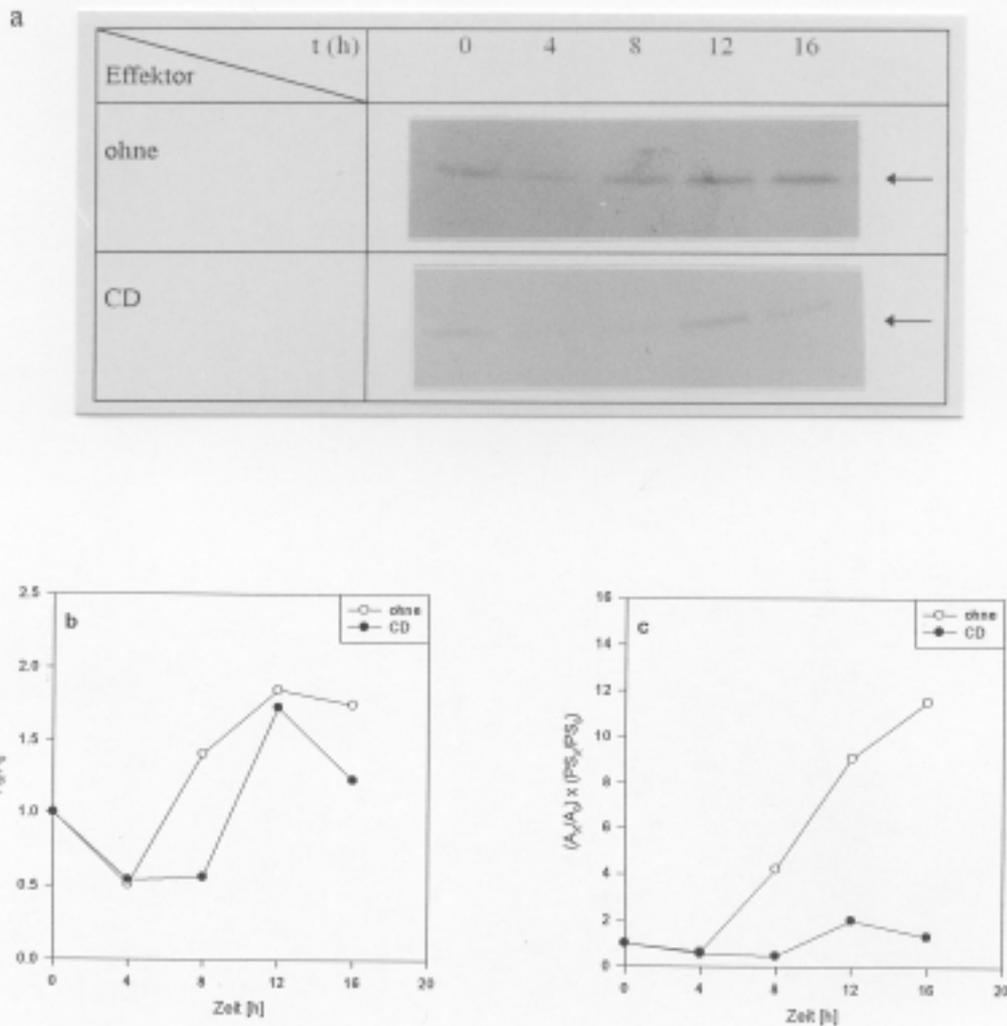


Abb. 19: Einfluß von CD auf die Synthese von Cyclin D1 bei Reaktivierung von Wi-38-Fibroblasten nach Suspensionskultur

Versuchsdurchführung: s.Legende zu Abb. 18, S.56

Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter Verwendung des hergestellten Zellysats gemäß Kap. 2.6.2 (s.S.16) und Kap.2.6.3 (s.S.17)

Radioaktivität des eingesetzten Zellysats: 42 kBq (=2,5x10<sup>6</sup> dpm)

a: Autoradiographische Darstellung der Cyclin D1-Banden (M<sub>r</sub> 36 kD ←)

b: Graphische Darstellung der relativen Absorption (A<sub>x</sub>/A<sub>0</sub>) der Cyclin D1-Banden von a)

A<sub>0</sub>: Absorption der Cyclin D1-Bande vor Reaktivierung (=Kontrolle)

A<sub>x</sub>: Absorption der Cyclin D1-Banden nach Reaktivierung

c: Cyclin D1-Synthese bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation:

Die unter b) ermittelte Neusynthese von Cyclin D1 (A<sub>x</sub>/A<sub>0</sub>) wurde mit einem Faktor multipliziert, der sich aus der relativen Proteinsynthese (PS<sub>x</sub>/PS<sub>0</sub>) der Zellpopulation (s. Abb. 18b, S.56) ergab.

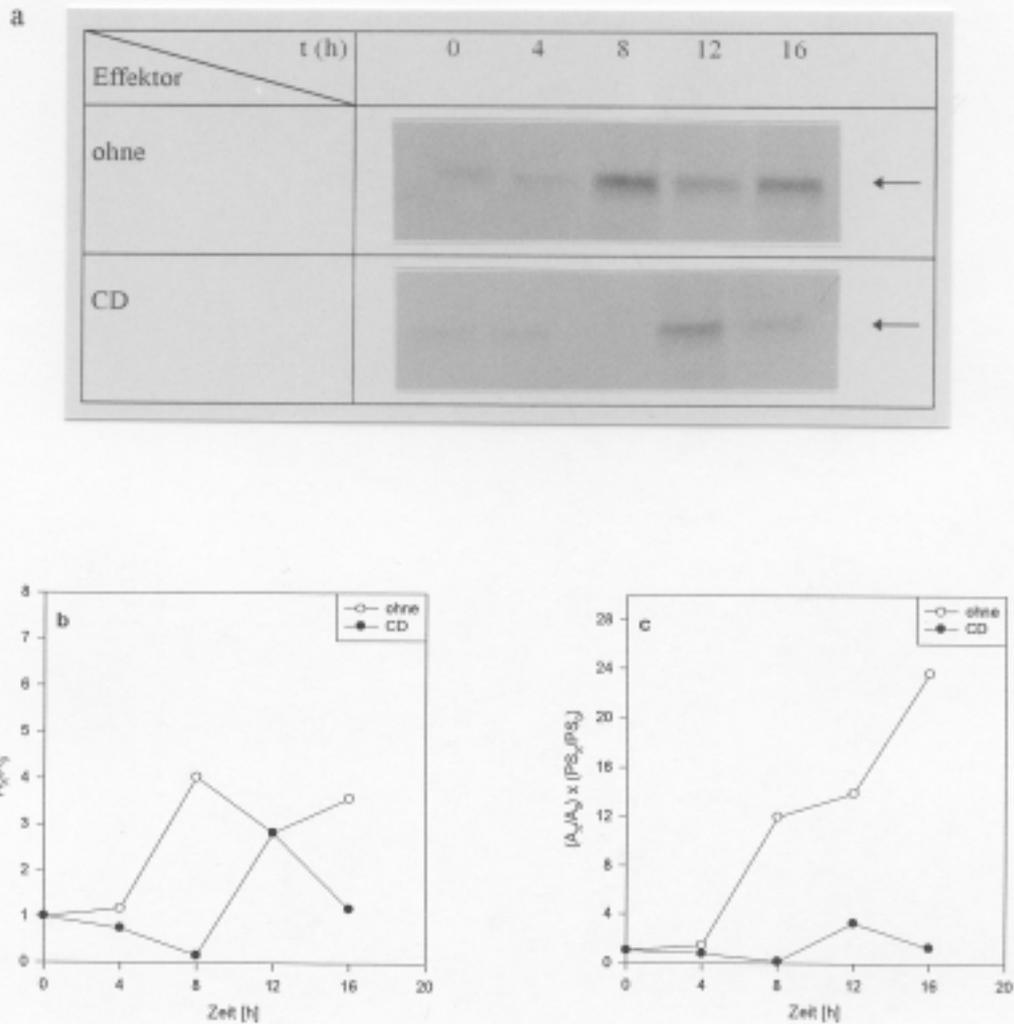


Abb. 20: Einfluß von CD auf die Synthese von Cyclin A bei Reaktivierung von Wi-38-Fibroblasten nach Suspensionskultur

Versuchsdurchführung: s.Legende zu Abb. 18, S.56

Immunpräzipitation und SDS-PAGE unter Verwendung des hergestellten Zellysats gemäß Kap. 2.6.2 (s.S.16) und Kap.2.6.3 (s.S.17)

Radioaktivität des eingesetzten Zellysats: 42 kBq ( $=2,5 \times 10^6$  dpm)

**a:** Autoradiographische Darstellung der Cyclin A-Banden ( $M_r$  50 kD ←)

**b:** Graphische Darstellung der relativen Absorption ( $A_x/A_0$ ) der Cyclin A-Banden von a)

$A_0$ : Absorption der Cyclin A-Bande vor Reaktivierung (=Kontrolle)

$A_x$ : Absorption der Cyclin A-Banden nach Reaktivierung

**c:** Cyclin A-Synthese bezogen auf eine gleichgroße Zellpopulation:

Die unter b) ermittelte Neusynthese von Cyclin A ( $A_x/A_0$ ) wurde mit einem Faktor multipliziert, der sich aus der relativen Proteinsynthese ( $PS_x/PS_0$ ) der Zellpopulation (s. Abb. 18b, S.56) ergab.

## 4 Diskussion

### 4.1 Verfahren zur Lösung der Aufgabenstellung

#### 4.1.1 Auswahl der zu untersuchenden Proteine

Die Desintegration des Mikrofilamentsystems durch CD, LAT A oder B wirkte bei einer Reihe von nichttransformierten Zelllinien hemmend auf den Neueintritt in die S-Phase (IWIG et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die Synthese von Proteinen, denen eine wichtige Rolle beim G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-S-Phase-Übergang zuerkannt wird, durch Einwirkung dieser Effektoren ändert. Die drei Proto-Onkogen-Proteine c-fos, c-jun, c-myc und die Cycline D1, E und A wurden aus folgenden Gründen zur Bearbeitung der Fragestellung ausgewählt:

1. Für jedes dieser Proto-Onkogen-Proteine und Cycline war eine Verhinderung der S-Phase beschrieben worden, wenn die Proteinfunktion durch Antikörper aufgehoben bzw. die Proteinsynthese durch antisense-cDNA/RNA unterdrückt wurde (HEIKKILA et al., 1987; IGUCHI-ARIGA et al., 1987; NISHIKURA und MURRAY, 1987; KOVARY und BRAVO, 1991b; SMITH und PROCHOWNIK, 1992; GRANA und REDDY, 1995).
2. Diese Proteine werden in der G<sub>1</sub>-Phase in der Reihenfolge c-fos/c-jun, c-myc, Cyclin D1, E und A induziert, wobei c-fos/c-jun äußerst früh und Cyclin A äußerst spät in G<sub>1</sub> auftreten (CHIARUGI et al., 1994; SHERR, 1996). Deshalb schien es möglich, die G<sub>1</sub>-Phase in ihrem Verlauf zu untersuchen.
3. Es waren für die Immunpräzipitation getestete Antikörper zum Nachweis dieser Proto-Onkogen-Produkte und Cycline verfügbar.

#### 4.1.2 Auswahl der Zelllinie

Zum Nachweis von Cyclin E und Cyclin A waren nur Antikörper verfügbar, die spezifisch mit humanen Antigenen reagierten. Daher mußte der ursprüngliche Plan aufgegeben werden, die Experimente mit bovinen Linsenepithelzellen durchzuführen und statt dessen eine geeignete humane Zelllinie gefunden werden. Die Entscheidung fiel zugunsten der Wi-38-Fibroblasten. Diese waren nichttransformiert, besaßen eine begrenzte Lebenszeit, wuchsen nicht in Suspension und hatten sich als normale humane Zelllinie etabliert (HAYFLICK und MOORHEAD 1961; HAYFLICK 1965).

Wichtig bei der Entscheidung für diese Fibroblasten war auch, daß Untersuchungen zum Zellzyklus an dieser Zelllinie bereits erfolgreich durchgeführt worden waren (XIONG et al., 1992; LUCIBELLO et al., 1993; SEWING et al., 1993).

#### 4.1.3 Bestimmung der Gesamtproteinsynthese und der Synthese von Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen

Das Radionuklid Schwefel-35 wurde während der Einwirkungszeit von [<sup>35</sup>S]-Met in die neusynthetisierten Proteine eingebaut. Freies, nicht eingebautes, extrazelluläres [<sup>35</sup>S]-Met wurde anschließend durch Spülung des Zellbelages mit PBS entfernt. Die Gesamtproteinsynthese konnte dann durch Messung der eingebauten Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt werden.

Daneben wurde stichprobenweise der nicht in Protein eingebaute Anteil von [<sup>35</sup>S]-Met durch TCA-Fällung ermittelt. Dieser Anteil, der nicht größer als 10 % sein sollte, lag in keiner der Messungen über 5 %.

Die Proto-Onkogen-Proteine und Cycline wurden aus Zellysaten gleicher Radioaktivität immunpräzipitiert. Damit konnte die Synthese dieser Proteine, bezogen auf die **gleiche Menge neusynthetisierten Gesamtproteins**, somit unabhängig vom Verlauf der Gesamtproteinsynthese, untersucht werden. Wurde also ein Anstieg oder Abfall der Neusynthese eines einzelnen Proteins festgestellt, so war diese Veränderung nicht als Folge einer zu- oder abnehmenden Gesamtproteinsynthese aufgetreten. Eine Reihe von Autoren hat in ihren Arbeiten zur Wachstumsregulation die Synthese untersuchter Proteine ebenfalls auf gleiche Mengen neusynthetisierten Gesamtproteins bezogen (HANN und EISENMAN, 1984; MÜLLER et al., 1984; PERSSON et al., 1985).

Andere Autoren dagegen führten Immunpräzipitationen aus Zellysaten gleichen Volumens (≈gleiche Zellzahl) durch (LUCIBELLO et al., 1993; SEWING et al., 1993). Auch wurde in einer Reihe von Veröffentlichungen zur Wachstumsregulation das Western Blotting angewandt, bei dem die Synthese von Proteinen, bezogen auf die gleiche Menge Gesamtprotein (≈gleiche Zellzahl), bestimmt wird (BALDIN et al., 1993; BÖHMER et al., 1996). Beide Verfahren, Immunpräzipitation aus Zellysaten gleichen Volumens und Western Blotting, bestimmen also die Synthese von Proteinen, bezogen auf die gleiche Zellzahl. In der vorliegenden Arbeit war die Synthese der einzelnen Proteine jedoch bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierten Gesamtproteins untersucht worden. Um einen Vergleich der verschiedenen Methoden zu ermöglichen, mußten die experimentell ermittelten Werte so umgerechnet werden, daß die Neusynthese von Cyclinen und Proto-Onkogen-Proteinen, **bezogen auf die gleiche Zellzahl**, ebenfalls bestimmt wurde.

Die Synthese der Proto-Onkogen-Proteine und Cycline wurde durch Messung der Bandenabsorptionen (Bandenschwärzungen) ermittelt. Die densitometrische

Auswertung von Autoradiogrammen ist bei einer Reihe von Veröffentlichungen zur Zellzykluskontrolle angewendet worden (PERSSON et al., 1985; KOVARY und BRAVO, 1991a; GENG und WEINBERG, 1993; BÖHMER et al., 1996).

Die in verschiedenen, voneinander unabhängigen Versuchen ermittelten Einflüsse von CD, LAT A oder B auf die Synthese der Proto-Onkogen-Proteine und Cycline konnten aufgrund uneinheitlicher Expositionszeiten nur begrenzt untereinander verglichen werden. Einerseits macht die Art der Auswertung, bei der die Synthese der untersuchten Proteine auf eine Kontrolle desselben Experimentes bezogen wurde, gleiche Expositionszeiten nicht zwingend notwendig. Andererseits hätten bei einheitlicher Dauer der Exposition weitere wichtige Informationen gesammelt werden können. So wäre beispielsweise ein Vergleich der Synthese der Proto-Onkogen-Proteine und Cycline bei den ansonsten gleichartig behandelten Kontrollen möglich gewesen.

Weder in exponentiell wachsenden, noch in serumrestimulierten Wi-38-Fibroblasten war das Proto-Onkogen-Protein c-myc sicher nachweisbar. Bei exponentiell wachsenden Zellen ist dieser Befund in Übereinstimmung mit Untersuchungen von HANN und EISENMAN (1984), welche bei einer normalen humanen Lungenfibroblastenzelllinie die c-myc-Synthese als sehr gering beschrieben. In serumrestimulierten humanen embryonalen Lungenfibroblasten (MRC-5) war die Synthese dieses Proto-Onkogen-Proteins zwischen 3 und 5 Stunden nach FKS-Zugabe maximal (WATERS et al., 1991). PERSSON et al. (1985) ermittelten mit Hilfe der Immunpräzipitation die höchste c-myc-Synthese in Maus 3T3-Fibroblasten zwischen 2 und 4 Stunden nach Serumreaktivierung.

Da in der vorliegenden Arbeit alle anderen untersuchten Proteine aus denselben Lysaten immunpräzipitiert und nachgewiesen wurden, bieten sich zwei Erklärungen für den nicht möglichen c-myc-Nachweis in serumrestimulierten Wi-38-Fibroblasten an:

1. Die c-myc-Synthese war auch in reaktivierten Wi-38-Fibroblasten zu gering, um durch Immunpräzipitation nachgewiesen zu werden. WATERS et al. (1991) hatten den Anstieg der c-myc-Synthese mittels ELISA bestimmt.
2. Der verwendete Antikörper war nicht geeignet, c-myc aus den Lysaten zu präzipitieren. Nach Angaben der Firma DIANOVA jedoch, war dieser Antikörper für die Immunpräzipitation menschlicher Antigene sehr gut zu gebrauchen.

## **4.2 Einfluß der Organisation des Mikrofilamentsystems auf exponentiell wachsende Wi-38-Fibroblasten**

Das in abgeflachten Zellen in „stress fibers“ organisierte Mikrofilamentsystem kann durch CD, LAT A oder B desintegriert werden. Alle drei Effektoren treten in Wechselwirkung mit Aktin, dem Hauptbestandteil der Mikrofilamente. Während Cytochalasine die Filamentelongation verhindern, indem sie v.a. am Schwanz- (Plus-) Ende des F-Aktins angreifen (BONDER und MOOSEKER, 1986; COOPER, 1987), komplexieren die Latrunculine wahrscheinlich mit G-Aktin im Verhältnis 1:1 (COUE et al., 1987).

Bereits bei Zusatz geringer Konzentrationen von CD (0,01 µmol/l) kommt es zur Desintegration einzelner Mikrofilamentbündel. Bei Konzentrationen von 1 µmol/l CD und höher, sind fast alle „stress fibers“ zerfallen. Wi-38-Fibroblasten zeigen bei Zugabe dieser hohen Konzentrationen das Bild eines „arborized state“. Diese Veränderungen der Zellform und des Cytoskeletts von Wi-38-Fibroblasten sind im Einklang mit an Linseneithelzellen, Hautfibroblasten und Niereneithelzellen erhobenen Befunden (IWIG und GLAESSER, 1991; IWIG et al., 1995).

Eine Alteration des Mikrofilamentsystems durch CD oder LAT B ruft bei exponentiell wachsenden Wi-38-Fibroblasten eine deutliche Abnahme der DNA-Synthese in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer der Effektoren hervor. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit Untersuchungen, bei denen Zugabe von CD zu bovinen Linseneithelzellen (IWIG et al., 1989), Niereneithelzellen, Rattenfibroblasten und humanen Hautfibroblasten (CZESLICK, 1994) bzw. Zusatz von LAT B zu Hamsterfibroblasten (SPECTOR et al., 1989) und bovinen Linseneithelzellen (CZESLICK, 1994) eine drastische Abnahme des Markierungsindex bewirkte.

In Versuchen mit exponentiell wachsenden Fibroblasten wurde gezeigt, daß die Gesamtproteinsynthese mit Konzentration und Einwirkungsdauer von CD negativ korreliert war. Dieses Ergebnis bestätigt Experimente mit bovinen Linseneithelzellen, bei denen ebenfalls eine Abnahme der Gesamtproteinsynthese bei Zusatz von CD auftrat (IWIG et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte desweiteren gezeigt werden, daß LAT A und B ebenfalls zu einer deutlichen Hemmung der Proteinneusynthese führen. ORNELLES et al. (1986) führten interessante Untersuchungen zur Ursache der Proteinsyntheseinhibition nach CD-Zugabe durch:

Nach Zusatz des Effektors wurde ein Teil der am Cytoskelett gebundenen mRNA und Polyribosomen von diesem gelöst. Die vom Cytoskelett in das Cytoplasma übergegangene mRNA wurde nicht weiter translatiert. Die Abnahme der Gesamtproteinsynthese und die Lösung der mRNA vom Cytoskelett waren positiv miteinander korreliert. Die Frage, warum die mRNA mit dem Cytoskelett assoziiert sein mußte, damit die Translation ablief, war nicht befriedigend beantwortbar. Interessant in diesem Zusammenhang waren Experimente mit Retikulozyten, welche keine nachweisbaren cytoskelettalen Strukturen besitzen und in denen keine Inhibition der Proteinsynthese nach CD-Zugabe auftrat. IWIG et al. (1995) beschrieben eine Verminderung der RNA-Synthese nach Zusatz von CD zu bovinen Linsenepithelzellen. Eine hieraus möglicherweise resultierende Verminderung der mRNA-Translation wäre eine weitere Möglichkeit, den Abfall der Proteinsynthese nach Alteration des Mikrofilamentsystems zu erklären.

Bezogen auf die gleiche Menge eingebauter Radioaktivität, war in exponentiell wachsenden Fibroblasten keine wesentliche Änderung der Neusynthese von c-jun, Cyclin D1, E und A nach Zugabe von CD, LAT A oder B sichtbar. Die Synthese der Proteine fiel damit lediglich im Rahmen der durch die Effektoren inhibierten Gesamtproteinsynthese ab. Dieses Ergebnis unterstützt die von ORNELLES et al. (1986) postulierte These, daß eine unspezifische CD-induzierte Lösung der mRNA vom Cytoskelett zu einer verminderten Synthese fast aller Einzelproteine ohne Selektivität führen könnte.

Das Proto-Onkogen-Produkt c-fos war in exponentiell wachsenden Wi-38-Fibroblasten nicht quantitativ auswertbar. Dies ist in Einklang mit an Maus 3T3-Fibroblasten erhobenen Befunden (KOVARY und BRAVO, 1992).

### **4.3 Einfluß der Organisation des Mikrofilamentsystems auf die Restimulation von Wi-38-Fibroblasten nach Serummangel**

Wurden die durch 60stündigen Serummangel in  $G_0$  arretierten Wi-38-Fibroblasten durch Serumzugabe restimuliert, so kam es zum Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus. Der Zellzyklus verläuft in der Reihenfolge  $G_1$ -, S-,  $G_2$ -, M-Phase und ermöglicht die Entstehung von zwei Tochterzellen aus einer Mutterzelle (GRANA und REDDY, 1995). Der Wiedereintritt der Wi-38-Zellen in den Zellzyklus nach FKS-Zugabe konnte durch Ansteigen des kumulativen Markierungsindex von <1% vor Restimulation auf 14,5% einen Tag nach Serumreaktivierung nachgewiesen werden.

Um ruhende Zellen zur Proliferation zu stimulieren, sind spezifische Signaltransduktionswege notwendig, welche extrazelluläre Signale mit der Zellzyklusmaschinerie verbinden (GRANA und REDDY, 1995). Extrazelluläre Wachstumsfaktoren binden an für sie spezifische Rezeptoren, was zur Bildung von zweiten Boten führt, z.B. aktivierte Tyrosinkinasen, Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>), Diacylglycerol (DAG) und vermehrte intrazelluläre Kalziumionen (HESKETH, 1995). Anhand des im FKS enthaltenen PDGF kann die Signaltransduktion exemplarisch erläutert werden: PDGF, ein unter anderem in Thrombozyten gebildeter dimerer Wachstumsfaktor mit einer molaren Masse von 30 kD, tritt zunächst in Wechselwirkung mit der extrazellulären ligandenbindenden Domäne des PDGF-Rezeptors. Jede Untereinheit des Wachstumsfaktors bindet einen Rezeptor, was zu dessen Dimerisation führt. Hierdurch werden die intrazellulären Tyrosinkinasendomänen des PDGF-Rezeptors aktiviert. Durch die Phosphorylierung von Zielproteinen, z.B. Phospholipase C- $\gamma$ , kommt es zur Signaltransduktion in das Zellinnere (HELDIN und WESTERMARK, 1990; CADENA und GILL, 1992).

Die Aktivierung zweiter Boten führt innerhalb von 6 Stunden zur vermehrten Transkription von ca. 100 Genen, darunter die „immediate early response genes“ c-fos und c-jun. Als „immediate early response genes“ bezeichnet man Proteine, die innerhalb der ersten Stunde nach Wachstumsfaktorenzugabe induziert werden (HESKETH, 1995). Die Proto-Onkogen-Produkte c-fos und c-jun bilden Heterodimere, die an DNA-Sequenzen binden, welche als „activation protein-1 (AP-1) site“ bezeichnet werden. Hier fungieren sie dann als positive und negative Transkriptionsfaktoren. Dabei scheinen sie vor allem eine Kontrollfunktion in der frühen G<sub>1</sub>-Phase beim G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-Phase-Übergang wahrzunehmen (KOVARY und BRAVO, 1991b, 1992). In der vorliegenden Arbeit war die Synthese der Proto-Onkogen-Proteine c-fos und c-jun bei Reaktivierung nach G<sub>0</sub>-Arrest bereits in den ersten zwei Stunden nach FKS-Zugabe maximal. Danach fiel die Synthese beider Proteine rasch ab. Während jedoch c-fos bereits 4 Stunden nach Restimulation nicht mehr nachgewiesen werden konnte, war c-jun auch 8 Stunden nach Reaktivierung noch detektierbar. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit Untersuchungen von KOVARY und BRAVO (1991a) an Maus 3T3-Fibroblasten. Auch sie beschrieben eine Induktion von c-fos und c-jun in der Frühphase der Restimulation nach Serumangel, wobei eine c-fos-Synthese 3 Stunden nach FKS-Zugabe nicht mehr nachweisbar war, das Proto-Onkogen-Protein c-jun dagegen auch noch 8 Stunden nach Reaktivierung detektiert wurde.

Das weiter erfolgreiche Durchlaufen der G<sub>1</sub>-Phase und die S-Phase-Initiierung werden durch CDK's kontrolliert, die wiederum sequentiell durch die Cycline D1, E und A aktiviert werden (SHERR, 1996). Wichtige Zielproteine dieser Cyclin/CDK-Holoenzyme sind das Retinoblastoma-Antigen (pRb) und weitere Mitglieder der Retinoblastoma-Antigen-Familie (HAMEL und HANLEY-HYDE, 1997). Eine Familie von heterodimeren Transkriptionsfaktoren, in ihrer Gesamtheit als E2F bezeichnet, werden durch die hypophosphorylierte Form von pRb gebunden. Hierdurch wird die durch E2F hervorgerufene Transaktivierung von Genen, welche die zelluläre Proliferation unterstützen, unterdrückt. Wird pRb phosphoryliert, so löst es sich von E2F, was zur Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren führt (DYNLACHT, 1997).

Cyclin D1 wird nach mitogener Stimulation in der G<sub>1</sub>-Phase als sogenanntes „delayed early response gene“ synthetisiert, verbindet sich v.a. mit CDK4, die so aktiviert, pRb phosphoryliert (SHERR, 1996). Nachdem in den durchgeführten Experimenten Wi-38-Zellen durch FKS-Zugabe restimuliert wurden, war die Cyclin D1-Induktion, bezogen auf die gleiche Zellzahl, zwischen 8 und 12 Stunden nach Serumzugabe maximal. Dieses Experiment bestätigte weitgehend die durch SEWING et al. (1993) an Wi-38-Fibroblasten erhobene Befunde: Das [<sup>35</sup>S]-Met-markierte Cyclin D1 wurde in diesen Untersuchungen aus Lysaten gleichen Volumens (≈gleiche Zellzahl) immunpräzipitiert. Die maximale Cyclin D1-Induktion trat dabei 9 Stunden nach Reaktivierung auf. Auch sind diese Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Einklang mit Befunden, die durch BÖHMER et al. (1996) an humanen Vorhautfibroblasten erhoben wurden: Cyclin D1, das durch Western Blotting (≈gleiche Zellzahl) nachgewiesen wurde, war 11 Stunden nach Mitogenstimulation maximal.

Cyclin E wird, z.T. durch E2F aktiviert, nach Cyclin D1 in der G<sub>1</sub>-Phase synthetisiert. Es verbindet sich mit CDK2 und hält pRb im phosphorylierten Zustand. Da E2F die Transkription von Cyclin E induzieren und Cyclin E/CDK2-Heterodimere wiederum die Lösung von E2F vom pRb aufrechterhalten, ergibt sich ein positiver Regelkreis, der zu einem raschen Anstieg der E2F- und Cyclin E/CDK2-Aktivitäten nahe dem G<sub>1</sub>-S-Phase-Übergang führt. Wahrscheinlich z.T. auch durch E2F induziert, wird zeitlich nach Cyclin E, spät in der G<sub>1</sub>-Phase, Cyclin A synthetisiert. Dieses Protein verbindet sich ebenfalls mit CDK2 und hält das pRb im phosphorylierten Zustand. Während Cyclin E durch Proteolyse zu Beginn der S-Phase rasch abgebaut wird, kommt es zum ständigen Anstieg der Cyclin A-Menge in den Zellen während der

S-Phase (SHERR, 1996). Cyclin A/CDK2-Komplexe binden E2F-Heterodimere, phosphorylieren diese spezifisch und inaktivieren sie dadurch. Diese Inaktivierung der E2F durch Cyclin A/CDK2 scheint eine wichtige Voraussetzung für das erfolgreiche Durchlaufen der S-Phase zu sein (KREK et al., 1994, 1995). Bezogen auf die gleiche Zellzahl, war in der vorliegenden Arbeit die Synthese von Cyclin E 8 Stunden, von Cyclin A 12 Stunden nach FKS-Zugabe maximal. Die Cycline E und A werden, wie bereits beschrieben, nach Cyclin D1 in der G<sub>1</sub>-Phase synthetisiert und erreichen ihre maximale Induktion am G<sub>1</sub>-S-Phase-Übergang (Cyclin E) bzw. in der G<sub>2</sub>-Phase (Cyclin A) (SHERR, 1996). BALDIN et al. (1993) beispielsweise beschrieben eine maximale Cyclin A-Synthese erst 28 Stunden nach Serumrestimulation an einer anderen humanen embryonalen diploiden Lungenfibroblasten-Zelllinie (IMR-90). Die zitierten Literaturstellen untermauern die Möglichkeit, daß in den vorliegenden Untersuchungen mit 16 Stunden nach Restimulation ein zu kurzer Zeitabschnitt gewählt wurde, um die maximale Cyclin E- und Cyclin A-Synthese darzustellen. Es ist wahrscheinlich, daß die maximale Induktion beider Cycline erst nach dem Beobachtungszeitraum erfolgte.

Die beschriebenen Restimulationsvorgänge konnten durch Desintegration des Mikrofilamentsystems durch CD und LAT A in folgender Weise gestört werden:

Wurde Wi-38-Fibroblasten unmittelbar nach Serumrestimulation CD oder LAT A zugesetzt, so wurde das Wiedereintreten der Zellen in den Zellzyklus deutlich gehemmt. Einen Tag nach Reaktivierung war kein Anstieg des kumulativen Markierungsindex (MI<sub>c</sub>) eingetreten. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Befunden, die unter Einwirkung von CD an Affennierenzellen (OHTA et al., 1985), Linsenepithelzellen (IWIG et al., 1989) sowie Nierenepithelzellen und humanen Hautfibroblasten (CZESLICK, 1994) erhoben wurden. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigten außerdem erneut die Hemmung der DNA-Synthese bei Desintegration des Mikrofilamentsystems durch LAT A (SPECTOR et al., 1989; IWIG et al., 1995).

Bei Restimulation nach Serumangel wurde der Anstieg der Gesamtproteinsynthese durch Desintegration des Mikrofilamentsystems durch CD und LAT A wirkungsvoll gehemmt. Einen entsprechenden Befund hatten auch OHTA et al. (1985) erhalten, wenn Affennierenzellen im Beisein von CD nach Serumentzug reaktiviert wurden.

Die Induktionskurven der Cycline E und A zeigten, bezogen auf die gleiche Menge eingebauter Radioaktivität, keine wesentlichen Unterschiede zwischen CD bzw.

LAT A behandelten und unbehandelten Kulturen. Wie in den Untersuchungen an exponentiell wachsenden Fibroblasten gezeigt, fiel die Synthese dieser beiden Proteine im Rahmen der Gesamtproteinsynthese ab.

Die schon in Kap. 4.2 (s.S.62) beschriebene These von ORNELLES et al. (1986), wurde durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weitgehend gestützt. Eine wesentliche Ausnahme war Cyclin D1 bei Restimulation nach Serumangel: Die bei den Kontrollen sichtbare Induktion dieses Proteins war nach Zugabe von CD oder LAT A nicht mehr feststellbar. Dies war die einzige sicher nachgewiesene, über den Abfall der Gesamtproteinsynthese hinausgehende, Inhibition eines Proteins nach Effektorenzugabe in dieser Arbeit. Als Ursache hierfür wären folgende Mechanismen denkbar:

1. Eine Desintegration des Mikrofilamentsystems durch CD und LAT A führt zu einer Hemmung der Transkription von Cyclin D1-mRNA. BÖHMER et al. (1996) beschrieben eine Verminderung der Cyclin D1-mRNA-Induktion, wenn humanen Vorhautfibroblasten 2 Stunden vor Mitogenzugabe CD zugesetzt wurde.
2. CD und LAT A führen zu einer Behinderung des Cyclin D1-mRNA-Transports zu dem Proteinsyntheseapparat der Polysomen.
3. Die Translation der Cyclin D1-mRNA ist bei Zugabe von CD und LAT A spezifisch vermindert.

Die Induktion der Cyclin D1-Synthese ist, im Gegensatz zu Cyclin E und A, abhängig vom Vorhandensein von Wachstumsfaktoren. Cyclin D1 wird deshalb auch als „Wachstumsfaktorensensor“ bezeichnet (SHERR, 1993). Eine Verminderung seiner Synthese nach Entzug von Mitogenen ist beschrieben worden (MATSUSHIME et al., 1991).

Möglicherweise ist auch dadurch das unterschiedliche Verhalten von Cyclin D1 gegenüber den Cyclinen E und A zu erklären: Mehrere Komponenten der intrazellulären Signalkaskade, die durch Zugabe von Wachstumsfaktoren ausgelöst wird, scheinen cytoskelettassoziiert zu sein, z.B. Teile des Proteinkinase C-Signaltransduktionssystems (PAPADOPOULOS und HALL, 1989; PAVLATH et al., 1993) und das Proto-Onkogen *ncx* (HUNTER, 1997). Eine Desintegration des Mikrofilamentsystems könnte diese Signaltransduktion unterbrechen und, ähnlich einem Wachstumsfaktorenentzug, zur Verminderung der Cyclin D1 Synthese führen. Die Hemmung der Synthese dieses Proteins wäre dabei über einen der oben genannten Mechanismen denkbar.

#### **4.4 Einfluß der Organisation des Mikrofilamentsystems auf die Restimulation von Wi-38-Fibroblasten nach Suspensionskultur**

STOKER et al. beschrieben 1968 erstmals das Phänomen der „anchorage dependence“. Danach ist für eine Reihe von Zelllinien die Anhaftung an ein geeignetes Substratum eine Voraussetzung für proliferatives Wachstum. Auch Wi-38-Fibroblasten wachsen „anchorage dependent“ (HAYFLICK und MOORHEAD 1961; HAYFLICK 1965).

Der Stopp der Proliferation ist reversibel, d.h. wird den vitalen Zellen die Wiederanhaftung an ein geeignetes Substratum ermöglicht, so kommt es zum Wiedereintritt in den Zellzyklus (IWIG et al., 1989; IWIG et al., 1995).

Nachdem Wi-38-Fibroblasten durch Kultivierung in Suspension, trotz Anwesenheit von FKS, in ihrem proliferativen Wachstum gehemmt worden waren, erfolgte die Reaktivierung durch Überführung der suspendierten Zellen in unbeschichtete Gewebekulturschalen, die ihnen die Wiederanhaftung und Abflachung ermöglichten.

Wie auch bei serumreaktivierten Wi-38-Fibroblasten wurde der Anstieg der Gesamtproteinsynthese nach Zellhaftung und Zellausbreitung durch Zugabe von CD wirkungsvoll unterdrückt. Der Anstieg der Cyclin D1-Neusynthese verlief, bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierten Proteins, bei CD-Zusatz nur wenig flacher als in den unbehandelten Kontrollen. Trotz CD-Zugabe war 12 Stunden nach Reaktivierung eine Cyclin D1-Induktion feststellbar. Somit scheint nicht sicher, ob auch bei dieser Form der Reaktivierung die Cyclin D1-Synthese durch Alteration des Mikrofilamentsystems über die Gesamtproteinsynthese hinaus gehemmt wurde.

#### **4.5 Modell zur Beteiligung des Mikrofilamentsystems an der Wachstumsregulation**

Die Regulation des Wachstums ist ein multifaktorieller Prozeß. Neben Proto-Onkogenen und Wachstumsfaktoren spielen auch Zell-Substratum-Interaktionen und Zellform eine wesentliche Rolle (IWIG et al., 1995).

Eine wichtige Voraussetzung für den Eintritt von nichttransformierten Zellen in den Zellzyklus ist ein intaktes Mikrofilamentsystem. Eine Desintegration der kontraktilen Filamente hat nicht nur Auswirkungen auf die Zellform, sondern behindert auch den G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-S-Phase-Übergang und führt damit zu einem Stopp der DNA-Synthese (IWIG und GLAESSER, 1985). Es wird vermutet, daß die von den Mikrofilamenten erzeugte isometrische Kontraktion auf den Zellkern übertragen wird und eine replikationskompetente Chromatinstruktur erzeugt (PUCK, 1977; IWIG et al., 1981;

IWIG und GLAESSER, 1985; BURRIDGE, 1986; IWIG und GLAESSER, 1990). INGBER et al. (1995) diskutierten die Hemmung des nucleo-cytoplasmatischen Transports als mögliche Ursache der DNA-Synthesehemmung.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß unter verschiedenen Versuchsbedingungen eine Alteration des Mikrofilamentsystems durch CD, LAT A oder B stets mit einer Hemmung der Proteinsynthese einhergeht. Als Ursache hierfür käme eine Verminderung der Translation aufgrund der nachgewiesenen Hemmung der RNA-Synthese (IWIG et al., 1995) sowie die von ORNELLES et al. (1986) beschriebene Ablösung der mRNA vom Cytoskelett in Frage. ROSSOW et al. (1979) wiesen eine Hemmung des Neueintritts von Maus 3T3-Fibroblasten in die S-Phase nach, wenn diesen Zellen Cycloheximid, ein häufig verwendeter unspezifischer Proteinsyntheseinhibitor, zugesetzt wurde. Sie führten die DNA-Synthesehemmung auf die verminderte Bildung eines serumabhängigen labilen Proteins zurück, welches in der frühen G<sub>1</sub>-Phase synthetisiert wird und den Zellzyklus kontrolliert. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß mit dem Abfall der Gesamtproteinsynthese eine deutliche Reduzierung verschiedener an der Signaltransduktion beteiligter Proto-Onkogen-Proteine (c-jun) und Cycline (D, E, A) einhergeht. Besonders eindrucksvoll ist dabei das fast vollständige Ausbleiben einer Induktion des in der frühen G<sub>1</sub>-Phase auftretenden Cyclin D1 bei Restimulierung nach Serummangelkultur unter CD und LAT A. Wird nun in den Zellen beispielsweise eine erforderliche Mindestmenge von Cyclin D1 oder Cyclin E nicht mehr erreicht, so kommt es, durch verminderte Aktivierung von CDK4 bzw. CDK2, zu einer Verhinderung der Phosphorylierung von pRb und damit zum Stopp des Zellzyklus. Unterstützt wird dieses Modell durch Untersuchungen von BÖHMER et al. (1996), die an humanen Vorhautfibroblasten durchgeführt wurden: Sie wiesen eine Verhinderung der Phosphorylierung von pRb nach spezifischer Alteration des Mikrofilamentsystems durch CD nach.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Inhibition des S-Phase-Eintritts nach Desintegration des Mikrofilamentsystems sehr gut durch die verminderte Neusynthese von Proteinen erklärt werden kann, die wichtig für die Progression des Zellzyklus sind. Ob Zellformveränderung oder Alteration des Cytoskeletts noch über andere, nicht untersuchte Proteine bzw. andere Mechanismen das proliferative Wachstum regulieren, muß allerdings weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

## 5 Zusammenfassung

An verschiedenen nichttransformierten Zelllinien ist nachgewiesen worden, daß neben Wachstumsfaktoren auch Zellhaftung, Zellabflachung sowie intakte Mikrofilamente eine wesentliche Voraussetzung für das proliferative Wachstum sind. Daher sollte überprüft werden, welcher kausale Zusammenhang zwischen der Organisation des Mikrofilamentsystems und dem proliferativen Wachstum besteht. Aus diesem Grund wurde die Gesamtproteinsynthese und die Neusynthese einzelner Proteine, denen eine wichtige Funktion bei der G<sub>1</sub>-Phase-Progression bzw. S-Phase-Initiierung zukommt, bei Alteration des Mikrofilamentsystems untersucht.

Da zum Nachweis der interessierenden Proteine mittels Immunpräzipitation teilweise nur Antikörper gegen die entsprechenden humanen Antigene verfügbar waren, wurde für die geplanten Untersuchungen eine geeignete humane Zelllinie ausgewählt. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, daß die embryonalen Lungenfibroblasten Wi-38 „anchorage dependent“ wachsen und auch intakte Mikrofilamente für den Eintritt in die S-Phase benötigen. Zur Desintegration der Mikrofilamente wurden sowohl bei exponentiell wachsenden Zellen als auch bei Reaktivierung von G<sub>0</sub>-Phase-Fibroblasten nach Serumangel bzw. Suspensionskultur Cytochalasin D und Latrunculine eingesetzt. Der Anteil von DNA-synthetisierenden Zellen an der Gesamtzellzahl wurde mittels Autoradiographie bestimmt. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, den Einfluß des Mikrofilamentsystems auf das Proliferationsverhalten der Zellen zu ermitteln. Um den Zusammenhang zwischen der Organisation des Cytoskeletts und der Gesamtproteinsynthese zu untersuchen, wurden die neusynthetisierten Proteine mit [<sup>35</sup>S]-Met radioaktiv markiert und anschließend im Flüssigkeitsszintillationszähler vermessen. Die Proteine c-jun, c-fos, c-myc, Cyclin D1, E und A wurden durch Immunpräzipitation, SDS-PAGE sowie Autoradiographie dargestellt. Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden ließ Rückschlüsse auf die Synthese dieser Proto-Onkogen-Proteine und Cycline bei Alteration des Mikrofilamentsystems zu.

Wurde das Mikrofilamentsystem von Wi-38-Fibroblasten durch CD, LAT A oder B alteriert, so kam es zu einem Abfall der **DNA-Synthese**. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit zuvor an anderen nichttransformierten Zelllinien erhobenen Befunden. Außerdem wurde nach Zugabe von CD eine Abnahme der **Gesamtproteinsynthese** beobachtet, die mit der Konzentration des Effektors und der Einwirkungsdauer positiv korreliert war. Auch wurde der Anstieg der Gesamtproteinsynthese bei Reaktivierung

nach Serummangelkultur oder Suspensionskultur durch Zugabe von CD wirkungsvoll unterdrückt. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit an nichttransformierten Linseneithelzellen und Affennierenzellen erhobenen Befunden. Die Wirkung von LAT A und B auf die Gesamtproteinsynthese entsprach weitgehend der von CD.

In exponentiell wachsenden Zellen bewirkte CD eine deutliche Hemmung der Neusynthese von **Proto-Onkogen-Proteinen** und **Cyclinen**, die aber das Ausmaß der Hemmung der Gesamtproteinsynthese nicht übertraf. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit früheren Untersuchungen, die eine unspezifische Hemmung der Gesamtproteinsynthese nach CD-Zugabe postulieren. Die Wirkung von LAT A und B auf die Synthese von c-jun, Cyclin D1, E und A in exponentiell wachsenden Fibroblasten entsprach weitgehend der von CD.

Bei Reaktivierung nach Serummangelmedium wurde der Anstieg der Cyclin D1-Synthese durch Zugabe von CD bzw. LAT A stärker gehemmt als die Gesamtproteinsynthese. Es wurden mehrere Mechanismen für diese, über den Rahmen der Gesamtproteinsynthese hinausgehende, Inhibition diskutiert. Die Synthesen der Cycline E und A waren bei diesen Versuchen nach Effektorzugabe nur im Rahmen der inhibierten Gesamtproteinsynthese abgefallen.

Wurde Wi-38-Fibroblasten nach 12stündiger Suspensionskultur die Anhaftung an ein geeignetes Substratum ermöglicht, so verlief, bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierten Proteins, der Anstieg der Cyclin D1-Synthese nach CD-Zugabe nur wenig flacher als in den unbehandelten Kontrollen.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Inhibition des S-Phase-Eintritts nach Alteration des Mikrofilamentsystems sehr gut durch die verminderte Neusynthese von Proteinen erklärt werden kann, die wichtig für die Progression des Zellzyklus sind, obwohl weitere Mechanismen nicht ausgeschlossen wurden und denkbar sind. Besonders interessant erscheint dabei der Befund, daß die Stimulierung der Cyclin D1-Synthese durch FKS nur bei Zellen mit einem intakten Mikrofilamentsystem zu beobachten war.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Aita N**: Morphological study of the cytoskeleton of endothelial cells in vitro. *Jpn J Oral Biol* 31 (1989) 184-197
2. **Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G**: Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 7 (1993) 812-821
3. **Böhmer R-M, Scharf E, Assoian RK**: Cytoskeletal integrity is required throughout the mitogen stimulation phase of the cell cycle and mediates the anchorage-dependent expression of cyclin D1. *Mol Biol Cell* 7 (1996) 101-111
4. **Bonder EM, Mooseker MS**: Cytochalasin B slows but does not prevent monomer addition at the barbed end of the actin filament. *J Cell Biol* 102 (1986) 282-288
5. **Burridge K**: Are stress fibres contractile? *Nature* 294 (1981) 691-692
6. **Burridge K**: Substrate adhesions in normal and transformed fibroblasts: Organization and regulation of cytoskeletal, membrane and extracellular matrix components at focal contacts. *Cancer Rev* 4 (1986) 18-78
7. **Cadena DL, Gill GN**: Receptor tyrosine kinases. *FASEB J* 6 (1992) 2332-2337
8. **Charollais RH, Tiwari S, Thomas NSB**: Into and out of G1: The control of cell proliferation. *Biochimie* 76 (1994) 887-894
9. **Chiarugi V, Magnelli L, Cinelli M, Basi G**: Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res* 40 (1994) 603-612
10. **Cooper JA**: Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 105 (1987) 1473-1478
11. **Coue M, Brenner SL, Spector I, Korn ED**: Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS LETTERS* 213 (1987) 316-318
12. **Cross F, Roberts J, Weintraub H**: Simple and complex cell cycles. *Annu Rev Cell Biol* 5 (1989) 341-396
13. **Czeslick E**: Autoradiographische Untersuchungen zur Rolle der Mikrofilamente bei der Wachstumsregulation. Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Dissertationsschrift (1994)

14. **Dynlacht BD:** Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature* 389 (1997) 149-152
15. **Elledge SJ:** Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science* 274 (1996) 1664-1672
16. **Fey EG, Ornelles DA, Penman S:** Association of RNA with the cytoskeleton and the nuclear matrix. *J Cell Sci Suppl* 5 (1986) 99-119
17. **Folkman J, Moscona A:** Role of cell shape in growth control. *Nature* 273 (1978) 345-349
18. **Geng Y, Weinberg RA:** Transforming growth factor  $\beta$  effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 10315-10319
19. **Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJC:** Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67 (1991) 1169-1179
20. **Good L, Dimri GP, Campisi J, Chen KY:** Regulation of dihydrofolate reductase gene expression and E2F components in human diploid fibroblasts during growth and senescence. *J Cell Physiol* 168 (1996) 580-588
21. **Grana X, Reddy EP:** Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11 (1995) 211-219
22. **Hamel PA, Hanley-Hyde J:** G1 cyclins and control of the cell division cycle in normal and transformed cells. *Cancer Invest* 15 (1997) 143-152
23. **Hann SR, Eisenman RN:** Proteins encoded by the human c-myc oncogene: Differential expression in neoplastic cells. *Mol Cell Biol* 4 (1984) 2486-2497
24. **Hartwell LH, Weinert TA:** Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246 (1989) 629-634
25. **Hayflick L, Moorhead PS:** The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25 (1961) 585-621
26. **Hayflick L:** The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37 (1965) 614-636

27. **Heikkila R, Schwab G, Wickstrom E, Loke SL, Pluznik DH, Watt R, Neckers LM:** A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G0 to G1. *Nature* 328 (1987) 445-449
28. **Heldin C-H, Westermark B:** Platelet-derived growth factor: Mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul* 1 (1990) 555-566
29. **Hesketh R:** The Oncogene Handbook. 2.Aufl. Academic Press Limited, London, 1995
30. **Hunter T:** Oncoprotein networks. *Cell* 88 (1997) 333-346
31. **Iguchi-Ariga SMM, Itani T, Kiji Y, Ariga H:** Possible function of the c-myc product: Promotion of cellular DNA replication. *EMBO J* 6 (1987) 2365-2371
32. **Ingber DE, Prusty D, Sun Z, Betensky H, Wang N:** Cell shape, cytoskeletal mechanics, and cell cycle control in angiogenesis. *J Biomech* 28 (1995) 1471-1484
33. **Iwig M, Czeslick E, Müller A, Gruner M, Spindler M, Glaesser D:** Growth regulation by cell shape alteration and organization of the cytoskeleton. *Eur J Cell Biol* 67 (1995) 145-157
34. **Iwig M, Glaesser D:** Beteiligung der Mikrofilamente an der Ausbildung der Adhäsionsplaque und ihre Bedeutung für die Zellform und proliferatives Wachstum. *Acta histochem* 39 (1990) 403-418
35. **Iwig M, Glaesser D:** Cell-substratum interactions and the cytoskeleton in cell shape-mediated growth regulation of lens epithelial cells. *Lens and Eye Tox Res* 8 (1991) 281-309
36. **Iwig M, Glaesser D:** On the role of microfilaments in cell-shape-mediated growth control of lens epithelial cells. *Cell Tiss Kinet* 18 (1985) 169-182
37. **Iwig M, Glaesser D:** Zur Bedeutung der Mikrofilamente für die Regulation des mitotischen Wachstums von kultivierten Linsenepithelzellen. *Wiss Z Univ Jena, Naturwiss R* 36 (1987) 189-191
38. **Iwig M, Ngoli D, Glaesser D:** Autoradiographic investigations on cell shape-mediated growth regulation of lens epithelial cells in culture. *Biomed Biochim Acta* 48 (1989) 121-127

39. **Kovary K, Bravo R:** Existence of different fos/jun complexes during the G0-to-G1 transition and during exponential growth in mouse fibroblasts: Differential role of fos proteins. *Mol Cell Biol* 12 (1992) 5015-5023
40. **Kovary K, Bravo R:** Expression of different jun and fos proteins during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts: In vitro and in vivo associations. *Mol Cell Biol* 11 (1991a) 2451-2459
41. **Kovary K, Bravo R:** The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 11 (1991b) 4466-4472
42. **Krek W, Ewen ME, Shirodkar S, Arany Z, Kaelin WG, Livingston DM:** Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* 78 (1994) 161-172
43. **Krek W, Xu G, Livingston DM:** Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. *Cell* 83 (1995) 1149-1158
44. **Lucibello FC, Sewing A, Brüsselbach S, Bürger C, Müller R:** Deregulation of cyclins D1 and E and suppression of cdk2 and cdk4 in senescent human fibroblasts. *J Cell Sci* 105 (1993) 123-133
45. **Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ:** Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65 (1991) 701-713
46. **McPherson MA, Ramachandran J:** Inhibition of DNA synthesis in adrenocortical cells by cytochalasin B. *J Cell Biol* 86 (1980) 129-134
47. **Müller R, Bravo R, Burckhardt J, Curran T:** Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* 312 (1984) 716-720
48. **Nishikura K, Murray JM:** Antisense RNA of proto-oncogene c-fos blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 7 (1987) 639-649
49. **Ohta T, Takasuka T, Ishibashi S, Ide T:** Cytochalasin D inhibits the progression from the G0 to S phase at the mid-prereplicative stage in GC-7 cells stimulated with serum. *Cell Struct Funct* 10 (1985) 37-46

50. **Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M:** Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15 (1995) 2612-2624
51. **Ornelles DA, Fey EG, Penman S:** Cytochalasin releases mRNA from the cytoskeletal framework and inhibits protein synthesis. *Mol Cell Biol* 6 (1986) 1650-1662
52. **Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G:** Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 11 (1992) 961-971
53. **Papadopoulos V, Hall PF:** Isolation and characterization of protein kinase C from Y-1 adrenal cell cytoskeleton. *J Cell Biol* 108 (1989) 553-567
54. **Pavlath GK, Shimizu Y, Shimizu N:** Cytoskeletal active drugs modulate signal transduction in the protein kinase C pathway. *Cell Struct Funct* 18 (1993) 151-160
55. **Persson H, Gray HE, Godeau F:** Growth-dependent synthesis of c-myc-encoded proteins: Early stimulation by serum factors in synchronized mouse 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 5 (1985) 2903-2912
56. **Puck TT:** Cyclic AMP, the microtubule-microfilament system, and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (1977) 4491-4495
57. **Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato J-Y, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ:** Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* 7 (1993) 1559-1571
58. **Rosow PW, Riddle VGH, Pardee AB:** Synthesis of labile, serum-dependent protein in early G1 controls animal cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 (1979) 4446-4450
59. **Sanger JW, Sanger JM, Jockusch BM:** Differences in the stress fibers between fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* 96 (1983) 961-969
60. **Schliwa M:** Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. *J Cell Biol* 92 (1982) 79-91
61. **Selden SC, Rabinovitch M, Schwartz SM:** Effects of cytoskeletal disrupting agents in replication of bovine endothelium. *J Cell Physiol* 108 (1981) 195-211

62. **Sewing A, Bürger C, Brüsselbach S, Schalk C, Lucibello FC, Müller R:** Human cyclin D1 encodes a labile nuclear protein whose synthesis is directly induced by growth factors and suppressed by cyclic AMP. *J Cell Sci* 104 (1993) 545-554
63. **Sherr CJ:** Cancer cell cycles. *Science* 274 (1996) 1672-1677
64. **Sherr CJ:** Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73 (1993) 1059-1065
65. **Smith MJ, Prochownik EV:** Inhibition of c-jun causes reversible proliferative arrest and withdrawal from the cell cycle. *Blood* 79 (1992) 2107-2115
66. **Spector I, Shochet NR, Blasberger D, Kashman Y:** Latrunculins-novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: Comparison with cytochalasin D. *Cell Mot Cytoskeleton* 13 (1989) 127-144
67. **Stoker M, O'Neill C, Berryman S, Waxman V:** Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells. *Int J Cancer* 3 (1968) 683-693
68. **Waters CM, Littlewood TD, Hancock DC, Moore JP, Evan GI:** c-myc protein expression in untransformed fibroblasts. *Oncogene* 6 (1991) 797-805
69. **Weinert T:** A DNA damage checkpoint meets the cell cycle engine. *Science* 277 (1997) 1450-1451
70. **Xiong Y, Zhang H, Beach D:** D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71 (1992) 505-514
71. **Zindy F, Lamas E, Chenivresse X, Sobczak J, Wang J, Fesquet D, Henglein B, Brechot C:** Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182 (1992) 1144-1154

**Einfluß der Organisation des Mikrofilamentsystems auf die Synthese von  
Proto-Onkogen-Proteinen und Cyclinen**

T H E S E N

zur

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr.med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Institut für Physiologische Chemie

von Mathias Faßhauer  
geboren am 13.06.1974 in Halle

1. Mikrofilamente bilden zusammen mit den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli das Cytoskelett, das für die Zellform und die zellformabhängige Wachstumsregulation von großer Bedeutung ist.
2. Die Synthese der Proto-Onkogen-Proteine c-fos, c-jun, c-myc und der Cycline D1, E, A in zeitlich abgestimmter Reihenfolge ermöglicht Zellen die G<sub>1</sub>-Phase-Progression und S-Phase-Initiierung.
3. Die humanen embryonalen Wi-38-Lungenfibroblasten sind nichttransformiert, weisen eine endliche Lebenszeit auf, besitzen einen diploiden Karyotyp, wachsen nicht in Suspension und haben sich aufgrund dieser Merkmale als Modell für eine normale humane diploide Zelllinie etabliert.
4. Die Autoradiographie stellt eine geeignete Methode dar, um den Anteil DNA-synthetisierender Zellen an der Gesamtzellzahl zu bestimmen.
5. Durch radioaktive [<sup>35</sup>S]-Methionin-Markierung von Proteinen ist es möglich, die Gesamtproteinsynthese im Markierungszeitraum zu ermitteln.
6. Die Immunpräzipitation ist ein geeignetes Verfahren, um Proteine aus einem Zellysat zu gewinnen, und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie nachzuweisen. Die Intensität der Bandenschwärzung ist dabei ein relatives Maß für die Neusynthese der untersuchten Proteine.
7. Zugabe von Cytochalasin D, Latrunculin A und B zu Wi-38-Zellen führt zum Zerfall der Mikrofilamente und zur Alteration der Zellform.
8. Eine Desintegration des Mikrofilamentsystems durch Cytochalasin D und Latrunculin B geht einher mit einer Abnahme der Zahl DNA-synthetisierender Zellen in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer der Effektoren.
9. Wird das Mikrofilamentsystem von exponentiell wachsenden Wi-38-Fibroblasten durch Zusatz von Cytochalasin D, Latrunculin A oder B spezifisch alteriert, so kommt es zum Abfall der Gesamtproteinsynthese in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkungsdauer der Effektoren.
10. Die Synthese von c-jun, Cyclin D1, E und A nimmt in exponentiell wachsenden Wi-38-Zellen im Rahmen der durch Cytochalasin D, Latrunculin A und B gehemmten Gesamtproteinsynthese ab. Bezogen auf gleiche Mengen

neusynthetisierten Proteins, ist keine Abhängigkeit der Neusynthese dieser Proteine von den Effektoren erkennbar.

11. Die Proto-Onkogen-Proteine c-fos und c-myc sind in exponentiell wachsenden Wi-38-Zellen nicht nachweisbar.
12. Durch Serummangel in G<sub>0</sub> arretierte Wi-38-Fibroblasten können durch Zugabe von Serum reaktiviert werden. Der Wiedereintritt der Fibroblasten in den Zellzyklus wird durch Zugabe von Cytochalasin D und Latrunculin A nach Restimulation wirkungsvoll unterdrückt.
13. Die Reaktivierung von Wi-38-Zellen nach Serummangelkultur durch Serumzusatz geht einher mit einem erheblichen Anstieg der Gesamtproteinsynthese. Dieser Anstieg wird durch Cytochalasin D und Latrunculin A stark inhibiert.
14. Die Neusynthese der Cycline D1, E und A nach Serumrestimulierung reagiert unterschiedlich auf die Zugabe von Cytochalasin D oder Latrunculin A. Während die Synthese der Cycline E und A lediglich im Rahmen der Gesamtproteinsynthese abfällt, wird Cyclin D1 darüber hinaus gehemmt. Der, bezogen auf gleiche Mengen neusynthetisierten Gesamtproteins, in unbehandelten Kulturen sichtbare Anstieg der Cyclin D1-Synthese wird durch Effektorenzugabe vollständig unterdrückt.
15. Die Reaktivierung von Wi-38-Fibroblasten nach Suspensionskultur durch Anhaftung an ein geeignetes Substratum geht einher mit einem starken Anstieg der Gesamtproteinsynthese. Dieser Anstieg wird durch CD-Zugabe bei Restimulation wirkungsvoll unterdrückt.
16. Werden Wi-38-Fibroblasten nach Suspensionskultur in Anwesenheit von CD reaktiviert, so ist der Anstieg der Cyclin D1-Synthese, bezogen auf die gleiche Menge neusynthetisierten Proteins, nur wenig flacher als in den unbehandelten Kontrollen.
17. Die verminderte Synthese der für die G<sub>1</sub>-Phase-Progression bzw. S-Phase-Initiierung wichtigen Proteine c-jun, Cyclin D1, E und A nach Zugabe von CD, LAT A oder B kann zumindest teilweise die proliferationshemmende Wirkung der untersuchten Effektoren erklären. Von besonderem Interesse hierbei ist die Cyclin D1-Synthese, welche bei Restimulation nach Serummangel durch Alteration des Mikrofilamentsystems über die Gesamtproteinsynthese hinaus inhibiert wird.

## Lebenslauf

Name: Mathias Faßhauer  
Geburtstag: 13.06.1974  
Geburtsort: Halle (Saale)  
Familienstand: verheiratet mit Maria V. Faßhauer (geb. Müller)  
Eltern: Wilhelm Faßhauer, Dipl.-Physiker  
Dr.med.Edeltraud Faßhauer, Ärztin  
Geschwister: Christiane Wohlrab (geb. Faßhauer)  
Ausbildung: 1981-1989  
Polytechnische Oberschule, Halle (S.)  
1989-1993  
Erweiterte Oberschule, Halle (S.) (Abitur)  
seit 1993  
Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Halle, März 1998

Hiermit erkläre ich, daß nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens von mir eingereicht wurde.

Halle, März 1998

## **DANKSAGUNG**

Hiermit danke ich Herrn Prof. Dr. med. habil. D. Gläßer und Herrn Prof. Dr. med. habil. M. Iwig für ihre Bemühungen, die mir die Arbeit am Institut für Physiologische Chemie ermöglichten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. M. Iwig für die Überlassung des Themas, das sorgfältige Heranführen an die Problematik, seine geduldige Hilfe bei der Durchführung der Experimente und die Betreuung während der Erstellung der Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Michel, die mich sachkundig in die Methodik der Zellkultivierung einführte und mir bei auftretenden Problemen stets hilfreich zur Seite stand.

Auch danke ich Herrn Prof. I. Spector von der Universität in Tel Aviv für die Übersendung der Latrunculine A und B.

Herrn Prof. Th. Wieland vom Max-Planck-Institut für medizinische Forschung Heidelberg danke ich für die Bereitstellung des Rhodamin-Phalloin.

Ein Teil der zur Bearbeitung des Promotionsthemas notwendigen Mittel und Materialien wurden dankenswerterweise über ein Projekt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Iw 3/2-2) zur Verfügung gestellt.