

## 2. Abgeschlossenes Teilprojekt A5

### Zwischenbericht

Thema des Projekts: **CCK-induzierte Mechanismen der F-Aktin-Regulation in der Azinuszelle**

Projektleiter: Dr. Dr. Michael Beil                      PD Dr. Manfred Lutz  
Abteilung Innere Medizin I, Universitätsklinikum Ulm

**Der Abschlußbericht wird im September 2004 vorgelegt.**

### 2.1 Kenntnisstand bei der letzten Antragstellung und Ausgangsfragestellung

Die Sekretion aus azinären Zellen des Pankreas hängt vom kontrollierten Umbau des Aktin-Zytoskeletts ab. Die Mechanismen der Reorganisation des filamentären Aktins (F-Aktin) und ihre Regulation sind noch unvollständig aufgeklärt. Im Modellsystem der isolierten Pankreasazini der Ratte ist die Sekretion durch Cholecystokinin (CCK) dosisabhängig induzierbar. Eine Stimulation mit supramaximal sekretorischen Konzentrationen von CCK hemmt jedoch die Sekretion mit nachfolgender intrazellulärer Aktivierung von Trypsinogen und schwerer Zellschädigung (Raraty et al., 2000). Im Rattenmodell führen diese Prozesse zu einer akuten Pankreatitis, die der humanen odematösen Pankreatitis ähnelt. Der Zusammenbruch des apikalen Aktin-Zytoskeletts ist ein frühes Ereignis, das nur nach supramaximaler CCK-Stimulation beobachtet wird, und scheint die wesentliche Ursache für die Sekretionshemmung in der Induktionsphase der akuten Pankreatitis zu sein (O'Konski & Pandol, 1991).

Die Architektur des Aktin-Zytoskeletts resultiert aus Prozessen, die die Polymerisation bzw. Depolymerisation monomerer Aktin-Moleküle modulieren. Regulatoren dieser Prozesse sind membranständige Ankerproteine, Aktin-bindende Proteine und Zytolinker-Proteine, z.B. Plectin (McGough, 1998). Zentrale Ankermechanismen für Aktinfilamente sind *focal adhesions* und *focal contacts*, deren Funktion vor allem durch Tyrosinphosphorylierung reguliert wird (Garcia et al., 1997). Tyrosinkinase der Src-Familie, wie z.B. Yes, haben dabei eine zentrale Funktion. In Azinuszellen scheinen Src Kinasen für die Struktur des Aktinfilamentensystems bedeutsam zu sein, da nach Hemmung der Src Kinasen das Aktinfilamentensystem selbst bei supramaximal sekretorischer Stimulation mit CCK intakt bleibt (Leser et al., 2000).

Basierend auf diesem Kenntnisstand sollten in der letzten Antragsphase die Funktion und Regulation des Zytolinkerproteins Plectin und der Tyrosinkinase Yes in azinären Zellen untersucht werden. Insbesondere sollten die Auswirkungen von Funktionsänderungen dieser Proteine auf die Struktur des F-Aktins charakterisiert werden. Dafür war es notwendig, neue Verfahren der Strukturanalyse für dieses Zytoskelett-Kompartiment zu entwickeln.

### **Zitierte Literatur:**

- Garcia LJ, Rosado JA, Gonzalez A, Jensen RT. Cholecystokinin-stimulated tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin is mediated by phospholipase C-dependent and -independent mechanisms and requires the integrity of the actin cytoskeleton and participation of p21rho. *Biochem J* 1997; 327:461-72
- Leser J, Beil MF, Musa OA, Adler G, Lutz MP. Regulation of adherens junction protein p120(ctn) by 10 nM CCK precedes actin breakdown in rat pancreatic acini. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278:G486-91
- McGough A. F-actin-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 1998;8:166-76
- O'Konski MS, Pandol SJ. Cholecystokinin JMV-180 and caerulein effects on the pancreatic acinar cell cytoskeleton. *Pancreas* 1993; 8:638-46
- Raraty M, Ward J, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemos JP, Sutton R, Petersen OH. Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97:13126-31

## **2.2 Methoden und Ergebnisse**

Die Expression von Tyrosinkinasen der Src-Familie wurde in Azinuszellen der Ratte mittels Western Blot untersucht. Dabei konnten Yes und Lyn, jedoch nicht Fyn und Src, nachgewiesen werden. Nach Stimulation isolierter Azini mit supramaximal sekretorischer Konzentration von CCK konnte eine Phosphorylierung und Aktivierung von Yes mittels Immunpräzipitation und nachfolgendem Kinaseassay detektiert werden. Eine Inhibition der Kinaseaktivität von Yes durch PP2 verhindert teilweise den Zusammenbruch des F-Aktins und die damit assoziierte Inhibition der Sekretion. Während der supramaximal sekretorischen Stimulation mit CCK kommt es zu einer verstärkten Bindung von Yes mit Pyk2, einem Protein des *focal adhesion* Komplexes. Die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion für die Regulation des Aktin-Zytoskeletts bleibt jedoch noch zu klären. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in folgender Publikation dargestellt:

Lynch G, Kohler S, Leser J, Beil M, Garcia-Marin LJ, Lutz MP. The tyrosine kinase Yes regulates actin structure and secretion during pancreatic acinar cell damage in rats. Pflugers Arch. (in press)

Die Expression von Plectin in azinären Zellen des Pankreas wurde mittels Western Blot nachgewiesen. In der Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte eine Ko-Lokalisation von Plectin mit dem apikalen und basolateralen Aktin-Zytoskelett dokumentiert werden. Im Gegensatz zu sekretorisch maximalen CCK-Konzentrationen führen sekretorisch supramaximale CCK-Konzentrationen zu einer proteolytischen Degradation von Plectin. Diese Degradation geht dem Zusammenbruch des F-Aktins voraus, wie mittels einer neuen mikroskopischen Methode zur *in situ* Quantifizierung von intaktem Plectin und F-Aktin nachgewiesen werden konnte. Verantwortlich für diesen Prozeß scheint eine Aktivierung der Caspase 8 zu sein, da deren spezifische Inhibition sowohl die Degradation von Plectin als auch die Depolymerisation von F-Aktin verhindert. Diese Ergebnisse sind in der folgenden Publikation dargelegt:

Beil M, Leser J, Lutz MP, Gukovskaya A, Seufferlein T, Lynch G, Pandol SJ, Adler G. Caspase 8-mediated cleavage of plectin precedes F-actin breakdown in acinar cells during pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002; 282:G450-60

Beil M, Micoulet A, von Wichert G, Paschke S, Walther P, Omary MB, Van Veldhoven P, Gern U, Wolff-Hieber E, Eggermann J, Waltenberger J, Adler G, Spatz J, Seufferlein T. Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells. Nat Cell Biol 2003; 5:803-11).

Die im Arbeitsplan vorgesehene ultrastrukturelle Analyse der Interaktionen zwischen F-Aktin und Plectin setzt ein neues Verfahren zur Darstellung von Zytoskelettstrukturen mittels hochauflösender Rasterelektronenmikroskopie voraus. Wir konnten ein solches Verfahren etablieren. Aktuell konzentrieren sich die Arbeiten auf den Einsatz dieser Methodik für Untersuchungen des Aktin-Zytoskeletts in azinären Zellen. Weiterhin soll die dynamische Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts während der Sekretion in Ar42J-Zellen charakterisiert werden. Dafür werden neue fluoreszenzmikroskopische Verfahren eingesetzt, um den Aktin-Polymerisationsgrad in verschiedenen Kompartimenten azinärer Zellen zu bestimmen. Ein

Abschluß dieser Arbeiten ist im Sommer 2004 zu erwarten. Der Abschlußbericht wird im September 2004 vorliegen.

Herr Lutz und Herr Beil haben Leitungspositionen ausserhalb der Universität Ulm übernommen. Herr Beil ist als Gastwissenschaftler weiterhin in die morphologischen Arbeiten des SFBs eingebunden.

In Zusammenarbeit mit anderen Teilprojekten des SFB sind folgende Arbeiten entstanden:

Wagner M, Kunsch S, Duerschmied D, Beil M, Adler G, Mueller F, Gress TM. Transgenic overexpression of the oncofetal RNA binding protein KOC leads to remodeling of the exocrine pancreas. *Gastroenterology* 2003; 124:1901-14

Algul H, Tando Y, Beil M, Weber CK, Von Weyhern C, Schneider G, Adler G, Schmid RM. Different modes of NF-kappaB/Rel activation in pancreatic lobules. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 283:G270-81