

Aus der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie
der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow-Klinikum
Leiter: Prof. Dr. Bertram Wiedenmann
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bertram Wiedenmann,
Prof. Dr. Stefan Rosewicz

**Molekulare Mechanismen der p16-vermittelten Anoikisinduktion
in humanen Pankreaskarzinom-Zellen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung
der Doktorwürde der Naturwissenschaften
am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Anja Rabien

aus

Berlin

Berlin 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Bertram Wiedenmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker A. Erdmann

Tag der Disputation: 17.5.2004

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Pankreaskarzinome	1
1.2.	Der Zellzyklusinhibitor p16 ^{INK4a}	2
1.2.1.	Das p16 ^{INK4a} -Protein als Tumorsuppressor	3
1.3.	Anoikis	4
1.3.1.	Anoikis-Signaltransduktion	5
1.4.	Die Ras-Familie	6
1.4.1.	Ras-Funktionen und Ras-Signaltransduktion	8
1.4.2.	Ras als Onkogen	9
1.5.	Fragestellung	10
2.	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1.	MATERIAL	11
2.1.1.	Eukaryotische Zellen und Lösungen für die Zellkultur	11
2.1.2.	Prokaryotische Zellen und ihr Nährmedium	11
2.1.3.	Antibiotika	12
2.1.4.	Antikörper	12
2.1.5.	Enzyme und Enzympuffer	12
2.1.6.	Rekombinante Proteine	13
2.1.7.	Größenstandards	13
2.1.8.	Kits	13
2.1.9.	Mono- und Oligonukleotide	13
2.1.10.	Vektoren und Plasmide	14
2.1.11.	Chemikalien und Radiochemikalien	14
2.1.12.	Sonstige Materialien	15
2.1.13.	Geräte	16

2.2.	METHODEN	18
2.2.1.	Zellbiologische Methoden	18
2.2.1.1.	Durchlicht-Fotografie	18
2.2.1.2.	Anoikis-Test	18
2.2.1.3.	FACS-Analyse	18
2.2.1.4.	Transfektion von Oligonukleotiden	19
2.2.1.5.	Stabile Transfektion	20
2.2.1.6.	Koloniebildungstest	21
2.2.1.7.	Tumorbildung in der Nacktmaus	21
2.2.1.8.	Allgemeine Methoden der Zellkultur	22
2.2.2.	Nukleinsäuretechniken	22
2.2.2.1.	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	22
2.2.2.2.	Agarosegelelektrophorese	22
2.2.2.3.	Klonierungstechniken	23
2.2.2.4.	Geextraktion von DNA-Fragmenten	24
2.2.2.5.	Isolierung von Plasmid-DNA	24
2.2.2.6.	RNA-Isolierung	25
2.2.2.7.	Nuclear Run-Off	25
2.2.2.8.	RT-PCR	25
2.2.3.	Proteintechniken	27
2.2.3.1.	Herstellung von Zelllysaten	27
2.2.3.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	28
2.2.3.3.	Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli	28
2.2.3.4.	Western Blot	29
2.2.3.5.	Kopräzipitation von Proteinen	30
2.2.3.6.	Ras-Aktivitätsassay	31
2.2.3.7.	Pulse-Chase Experiment	31
2.2.4.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	32

3.	ERGEBNISSE	33
3.1.	P16-Reexpression restituiert die Anoikissensibilität in Capan-1 Zellen	33
3.2.	Inhibition Anoikis-relevanter Signalwege in Capan-1 Zellen	35
3.3.	K-Ras Regulation durch p16 in Capan-1 Zellen	39
3.3.1.	P16-Reexpression führt zum Verlust der K-Ras Aktivität in Capan-1 Zellen	39
3.3.2.	P16-Reexpression in Capan-1 Zellen reduziert die Expression von K-Ras signifikant	41
3.4.	K-Ras Inhibition in Capan-1 Zellen	43
3.4.1.	K-Ras in Capan-1 Zellen ist nicht durch den Ras-Inhibitor FTS zu inhibieren	43
3.4.2.	Ras-Inhibition durch Antisense-Oligonukleotide restituiert die Anoikis in Capan-1 Zellen	44
3.5.	K-ras Restitution in Capan-1/p16 Zellen	46
3.5.1.	Klonierung der K-rasV12 Sense Konstrukte	46
3.5.2.	Semi-stabile Transfektion von K-ras2A und K-ras2B in Capan-1/p16 Zellen	49
3.5.3.	Stabile Transfektion von K-ras2A und K-ras2B in Capan-1/p16 Zellen	51
3.5.4.	Charakterisierung der Capan-1/p16/K-ras Klone	52
3.5.5.	K-ras Substitution in Capan-1/p16 Zellen restituiert die Anoikissensitivität signifikant	54
3.5.6.	K-ras Substitution in Capan-1/p16 Zellen restituiert klonales Wachstum in Soft-Agar	56
3.5.7.	Der p16-vermittelte Verlust der Tumorigenität wird durch die K-ras Reexpression in Capan-1/p16 Zellen nicht beeinflusst	57
3.6.	Mechanismus der K-Ras Regulation durch p16 in Capan-1 Zellen	58
3.6.1.	K-ras scheint nicht transkriptionell reguliert in Capan-1 Zellen +/-p16	58
3.6.2.	Die K-Ras Regulation durch p16 in Capan-1 Zellen ist posttranslational	60
3.7.	Onkogenes K-Ras wird auch in anderen Zellsystemen durch p16 reguliert	62

4.	DISKUSSION	65
4.1.	Anoikis-relevante Signalwege	65
4.2.	Negative Regulation von K-Ras durch den Tumorsuppressor p16 ^{INK4a} in Capan-1 Zellen	66
4.3.	Onkogenes K-Ras vermittelt Anoikisresistenz in Capan-1 Zellen	67
4.4.	Onkogenes K-Ras bestimmt den Transformationscharakter von Capan-1 Zellen	68
4.5.	Der p16-bedingte Verlust der Tumorigenität von Capan-1 Zellen bleibt trotz onkogener K-Ras Aktivität bestehen	69
4.6.	P16 reguliert K-Ras in Capan-1 Zellen posttranslational	70
4.7.	Die Bedeutung der Negativ-Regulation von onkogenem K-Ras durch p16 ^{INK4a}	72
4.8.	Weiterführende Fragestellungen	73
5.	ZUSAMMENFASSUNG	75
6.	SUMMARY	76
7.	LITERATURVERZEICHNIS	77
8.	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	88
9.	ABKÜRZUNGEN	89
10.	Lebenslauf	92
11.	Danksagung	93