

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In über 90% humaner Pankreaskarzinome sind sowohl die funktionelle Inaktivierung des Zellzyklus-Inhibitors p16<sup>INK4a</sup> (p16) als auch eine konstitutive Aktivierung von Kirsten-Ras (K-Ras) nachweisbar. Unsere Voruntersuchungen zeigten eine Restitution der Sensitivität für Anoikis durch p16-Reexpression in humanen Pankreaskarzinom-Zellen, so dass die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen dieser möglicherweise therapeutisch relevanten Reversion in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen waren. Am Modell der humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie Capan-1 konnte eine essentielle Funktion von onkogenem K-Ras für die Anoikisresistenz der Tumorzellen sowie eine Beteiligung von Caspase-8 an der p16-vermittelten Anoikis belegt werden.

Capan-1 Pankreaskarzinom-Zellen exprimierten überwiegend die K-Ras Isoform, auf die auch die detektierbare Ras-Aktivität zurückgeführt werden konnte. Kultivierung der Zellen in Suspension führte zu einem ausgeprägten Anstieg der K-Ras Aktivität. Interessanterweise wiesen Capan-1 Klone mit stabiler p16-Reexpression nicht nur einen vollständigen Verlust der K-Ras Aktivität sowohl unter adhärennten als auch unter Suspensionsbedingungen, sondern auch eine ausgeprägte Reduktion des zellulären K-Ras Gehaltes im Vergleich zu Kontrollzellen auf. Die Verringerung der Ras-Expression von Capan-1 Zellen mit K-rasV12 Antisense Oligonukleotiden führte zu einer erhöhten Anoikisrate, während umgekehrt die Restitution von onkogenem K-Ras in Capan-1/p16 Zellen deren Anoikisfraktion wieder stark reduzierte. Dabei wurde die durch p16-Reexpression verringerte Fähigkeit von Capan-1 Zellen, Kolonien in Soft-Agar zu bilden, durch die stabile Expression von onkogenem K-Ras wiederhergestellt. Der Verlust der Tumorigenität von Capan-1/p16 Zellen in Nacktmäusen blieb jedoch trotz K-Ras Substitution bestehen. Die p16-bedingte K-Ras Regulation zeigte sich statt auf transkriptioneller Ebene in verringerter Proteinstabilität der Ras-Isoform, wahrscheinlich durch eine direkte Assoziation mit p16 und infolgedessen beschleunigten Abbau. Eine Regulation von K-Ras durch p16 in einer weiteren Pankreaskarzinom- und einer Kolonkarzinom-Zelllinie lässt dahinter ein generelles Prinzip vermuten.

Die bisherigen Beobachtungen belegen erstmalig eine funktionell relevante Regulation des Onkoproteins K-Ras durch den Tumorsuppressor p16 und charakterisieren die K-Ras Inhibition als notwendiges Ereignis im Kontext der p16 vermittelten Anoikis. Diese neue, funktionelle Interaktion der beiden häufigsten genetischen Alterationen im humanen Pankreaskarzinom bestimmt wahrscheinlich durch das zentrale tumorbiologische Phänomen der Anoikisresistenz den typischen aggressiven Krankheitsverlauf.