
1. EINLEITUNG

1.1. Pankreaskarzinome

Pankreaskarzinome sind maligne Tumore epithelialen Ursprungs aus der Bauchspeicheldrüse und werden für den Menschen als fünfthäufigste Ursache tumorbedingter Todesfälle in Europa und Nordamerika genannt (Jemal et al., 2002). Mit der niedrigsten Fünf-Jahres-Überlebensrate aller Krebserkrankungen zählen sie zu den aggressivsten Tumorarten überhaupt. Etwa 90% der Pankreaskarzinome leiten sich aus den exokrinen Organanteilen ab und weisen einen duktaalen Phänotyp auf, während neuroendokrine Pankreastumore und Azinuszellkarzinome nur 2–5% der Pankreastumore ausmachen (Rosewicz und Wiedenmann, 1997). Duktaale Pankreasadenokarzinome sind, bedingt durch frühe Metastasierung und weitgehende Resistenz gegenüber chemo- und radiotherapeutischer Behandlung, kaum therapierbar und werden zumeist erst in fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert, so dass auch operative Maßnahmen nur wenige Erfolge zeitigen (Lionetto et al., 1995; Rosewicz und Wiedenmann, 1997).

Die Entwicklung von Pankreaskarzinomen scheint der Adenom-Karzinom-Sequenz kolorektaler Karzinome (Kinzler und Vogelstein, 1996) vergleichbar, bei der sich aus normalen duktaalen Pankreaszellen über verschiedene Stadien intraepithelialer Neoplasien invasive Adenokarzinome bilden (Hruban et al., 2000; Klein et al., 2002). Zu den häufigsten genetischen Defekten im Pankreaskarzinom zählen die konstitutive Aktivierung des Kirsten-ras Onkogens in 90% (Bos, 1989) und die Inaktivierung des Tumorsuppressors p16^{INK4a} in 98% aller Pankreaskarzinome (Schutte et al., 1997), die sehr früh, z.T. schon in normalem Pankreasgewebe, (Kirsten-ras) bzw. etwas später ab dem ersten neoplastischen Stadium (p16^{INK4a}) im Modell der Tumorprogression auftreten. Während der fortschreitenden Tumorigenese kommen oft noch inaktivierende Mutationen der Tumorsuppressorgene TP53 und SMAD4/DPC4 (in über 50% der Fälle) hinzu. Über 75% aller Pankreaskarzinome weisen gleichzeitig drei oder vier dieser charakteristischen Gendefekte auf, die eine Deregulation des Zellzyklus und Resistenz gegen den programmierten Zelltod, Apoptose, bewirken (Übersicht in Bardeesy und DePinho, 2002; Schneider und Schmid, 2003).

1.2. Der Zellzyklusinhibitor p16^{INK4a}

Der Genort INK4a/ARF auf dem menschlichen Chromosomenabschnitt 9p21 kodiert die zwei Proteine p14ARF und p16^{INK4a} (p16), die durch verschiedene erste Exone und ein alternatives Leseraster für die restlichen Exone 2 und 3 zwei völlig voneinander verschiedene Moleküle ergeben, jedoch beide als Tumorsuppressoren fungieren (Sherr und Roberts, 1995). Während p14ARF den Tumorsuppressor p53 stabilisiert, der Zellzyklusarrest oder Apoptose auslösen kann (Michael und Oren, 2002), ist p16 aus der Familie der INK4-Proteine ein direkter Zellzyklusinhibitor (Serrano, 1997). Die Phasen des Zellzyklus werden durch die Bildung verschiedener Cyclin / CDK (Cyclin-abhängige Kinase) Komplexe bestimmt, deren Aktivität auch durch inhibitorische Proteine der INK4- und Cip/Kip-Familien reguliert wird (Abb. 1).

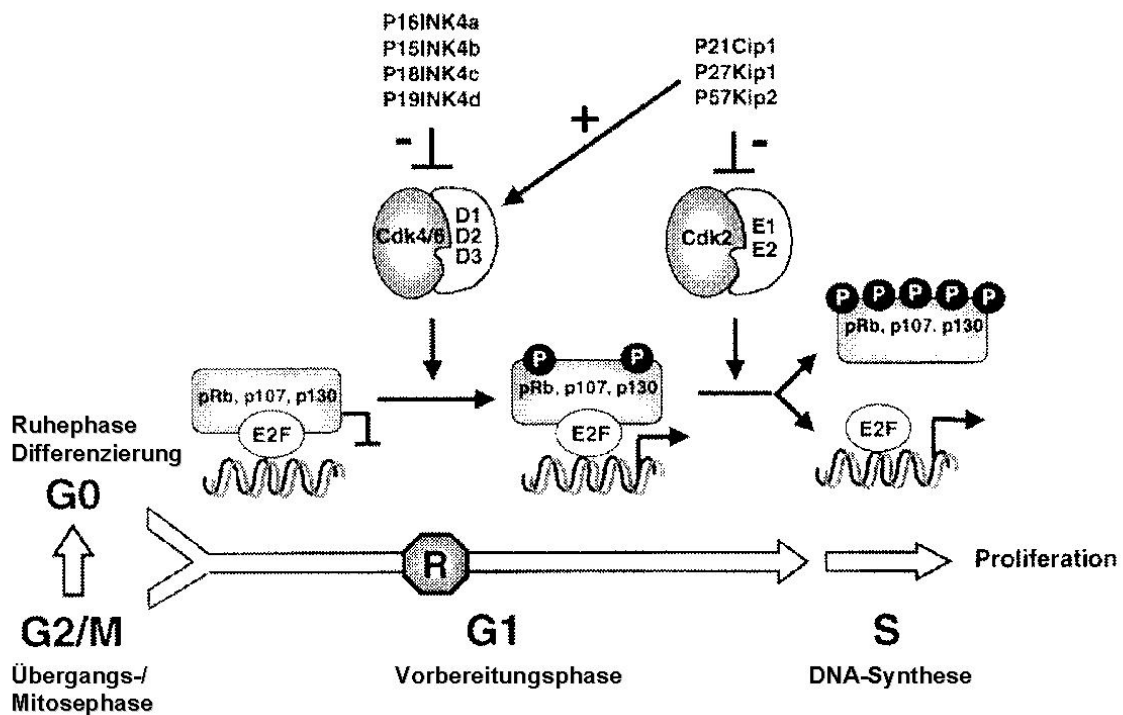


Abb. 1: Der Zellzyklus und die Regulation des G1/S-Überganges durch den CDK4/6-Cyclin D/Ink4/Rb Signalweg

Die Aktivität der Rb-Proteine pRb, p107 und p130 bestimmt die Progression während der Vorbereitungsphase G1. In der Ruhephase G0 sind die Proteine der Rb-Familie nicht phosphoryliert, binden E2F-Transkriptionsfaktoren und verhindern dadurch E2F-abhängige Transkription. Am Beginn der G1-Phase werden die CDK4/6 durch die mitogenabhängigen Cycline D1, 2 und 3 aktiviert, mit denen sie Komplexe bilden. Diese Komplexe phosphorylieren die Rb-Proteine und inaktivieren sie damit partiell, so dass Zellzyklus-relevante Gene wie Cyclin E1, das CDK2 für den Übergang in die S-Phase aktivieren kann, mit Hilfe von E2F transkribiert werden können. Die Regulation der Rb-Proteine scheint für die Überwindung des Restriktionspunktes R verantwortlich zu sein, nach dem die weitere Zellzyklusprogression mitogenunabhängig wird. Die CDK4/6-Aktivität wird durch die INK4-Zellzyklusinhibitoren p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d} negativ reguliert, die CDK2-Aktivität wird durch die Cip/Kip-Proteine p21Cip1, p27Kip1 und p57Kip2 inhibiert. Für den G1/S-Übergang in die DNA-Synthesephase werden die Rb-Proteine durch CDK2-Cyclin E Komplexe hyperphosphoryliert. (modifiziert nach Ortega et al., 2002)

Über diese CDK-Assoziation wurde das Protein p16^{INK4a} entdeckt (Serrano et al., 1993). Das humane p16-Protein besteht aus 156 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 16,57 kDa und enthält vier Ankyrindomänen für Protein-Protein Interaktionen (Ruas und Peters, 1998). Durch die Assoziation mit Komplexen aus CDK4 oder CDK6 mit Cyclin D in der Vorbereitungsphase für die DNA-Synthese, der G1-Phase, kann p16 deren Aktivität inhibieren. Dies verhindert dann die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins pRb bzw. der „Taschenproteine“ p107 und p130 und damit die Freisetzung an sie gebundener E2F-Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität für die Fortsetzung des Zellzyklus nötig ist (Dyson, 1998). So hat p16 neben den anderen Zellzyklusinhibitoren eine wichtige Kontrollfunktion vor dem Eintritt in die DNA-Synthesephase, um defekte Zellen aus dem Proliferationszyklus zu entfernen (Sherr, 2001).

1.2.1. Das p16^{INK4a}-Protein als Tumorsuppressor

Neben seiner Entdeckung über die Funktion des Proteins als CDK-Inhibitor wurde parallel das Gen für p16^{INK4a} in einer tumorsuppressiven Region auf dem Chromosom 9p21 als MTS1 („multiple tumor suppressor 1“) identifiziert, das durch die Untersuchung von Chromosomen-Aberrationen, besonders in Melanomen, auffiel (Kamb et al., 1994a und b). Da aber ein MTS1-Gen bereits existierte, wurden die Bezeichnungen CDKN2a („cyclin-dependent kinase inhibitor 2a“) oder p16^{INK4a} gebräuchlich.

„Knock-out“ Mäuse mit funktionsfähigem ARF, jedoch mit deletiertem, instabilem p16 bzw. ohne p16-Expression entwickeln B-Zelllymphome in geringer Zahl bzw. verschiedene Tumore in 25% der Fälle bei langer Latenz (Krimpenfort et al., 2001; Sharpless et al., 2001). In diversen Tumoren und transformierten Zelllinien wurde eine Inaktivierung von p16 entdeckt (Serrano, 1997), die durch homozygote Deletion, Mutation und / oder Promotor-Hypermethylierung verursacht worden war (Caldas et al., 1994; Liggett und Sidransky, 1998; Yang et al., 1995). Trotz vieler Studien, die die Rolle von p16 als Tumorsuppressor belegen, ist über die genaue biologische Funktion des INK4-Proteins neben der Zellzyklusregulation noch wenig bekannt. In seneszenten Zellen wurde aber eine erhöhte Expression von p16 festgestellt (Übersicht in Rocco und Sidransky, 2001). In humanen Gliomen konnte durch Restitution von p16 die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors VEGF verringert und Angiogenese inhibiert werden (Harada et al., 1999), während in verschiedenen Zellen das Zellspreiten auf Vitronectin, vermittelt durch das Integrin $\alpha_v\beta_3$, nach p16-Überexpression verhindert wurde (Fahraeus und Lane, 1999). P16 und pRb regulieren sich gegenseitig transkriptionell: Während pRb die p16-Expression inhibieren kann (Li et al.,

1994; Serrano, 1997), wurde bei p16-Restitution eine Verringerung der pRb-Expression beobachtet (Fang et al., 1998; Frizelle et al., 1998; Sandig et al., 1997). Auch für den Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde eine negative transkriptionelle Regulation durch p16 beschrieben (Wolff und Naumann, 1999). Eine neue Verbindung zwischen p16 und der Regulation von Anoikis konnte in unserer Arbeitsgruppe hergestellt werden: Eine Reexpression des INK4-Proteins in verschiedenen p16-defizienten Zelllinien restituierte die Anoikis-Sensibilität (Plath et al., 2000).

1.3. Anoikis

Anoikis, griechisch: „Heimatlosigkeit“, bezeichnet eine Sonderform der Apoptose, die durch den Verlust epithelialer oder endothelialer Zellkontakte zur extrazellulären Matrix ausgelöst wird (Frisch und Francis, 1994; Meredith et al., 1993). Sie dient als physiologischer Schutzmechanismus, um aus dem Gewebeverband gelöste Zellen zu eliminieren, wie z.B. in der Haut (Polakowska et al., 1994), in Kolonepithel (Hall et al., 1994) und bei der Rückbildung von Brustgewebe (Boudreau et al., 1995). Sie spielt auch im ersten Schritt der Kavitation bei der Embryogenese eine wichtige Rolle (Coucouvanis et al., 1995). Bei der malignen Transformation erwerben epitheliale Zellen typischerweise eine Resistenz gegen Anoikis, die das Tumorwachstum fördert und die Bildung von Metastasen ermöglicht. Die Bedeutung der Anoikisresistenz für die Malignität von Krebszellen wurde bereits für Mamma-, Kolon- und hepatozelluläre Karzinome sowie für nicht-epitheliale Krebsformen wie Melanome und Neuroblastome belegt (Frisch und Screaton, 2001).

Die Reexpression von p16 in der Pankreaskarzinom-Zelllinie Capan-1 restituierte nicht nur die Sensibilität für Anoikis, sondern resultierte auch in einem Verlust der Tumorigenität in Nacktmäusen. Dies wurde auf eine gesteigerte Expression der Untereinheit $\alpha 5$ des Integrins $\alpha 5\beta 1$ und damit des vollständigen Fibronektinrezeptors an der Zelloberfläche zurückgeführt (Plath et al., 2000). Integrine sind transmembranäre Glykoproteine, die neben der Zellverankerung in der extrazellulären Matrix eine zentrale Rolle in der Übertragung von „Outside-In“ und „Inside-Out“ Signalen spielen und damit die Organisation des Aktin-Zytoskeletts, Proliferation, Migration, Differenzierung, Angiogenese und Anoikis regulieren (Fitzgerald, 2001; Frisch und Ruoslahti, 1997; Hynes, 1992). Welche molekularen Signale durch den Verlust der Integrinverankerung in der Matrix entstehen und Anoikis auslösen, ist aber bisher nur unzureichend geklärt. Auch der Anoikisprozess selbst ist trotz seiner zentralen biologischen Bedeutung molekular noch nicht vollständig definiert.

1.3.1. Anoikis-Signaltransduktion

Einige Studien in Modell-Zelllinien belegen eine Beteiligung des JNK (Jun-Aminoterminal Kinase)-Signalweges (Frisch et al., 1996) sowie von Caspase-8 bei der Induktion von Anoikis, wohingegen FAK („focal adhesion kinase“), ILK („integrin-linked kinase“), E-Cadherin, die MAP-Kinasen p42/44 ERK und das antiapoptotische Protein Bcl-2 Anoikisresistenz vermitteln können (Übersicht in Frisch, 2000). Zusätzlich ist eine anoikisprotektive Funktion der Signaltransduktion über PI3K (Phosphatidylinositol-3-phosphat Kinase) und Akt/ProteinkinaseB gut untersucht (Khwaja et al., 1997). Die molekularen Mechanismen der Anoikis sind Gegenstand intensiver Forschung, aber zum Teil noch sehr umstritten (Übersicht in Grossmann, 2002), (Abb. 2).

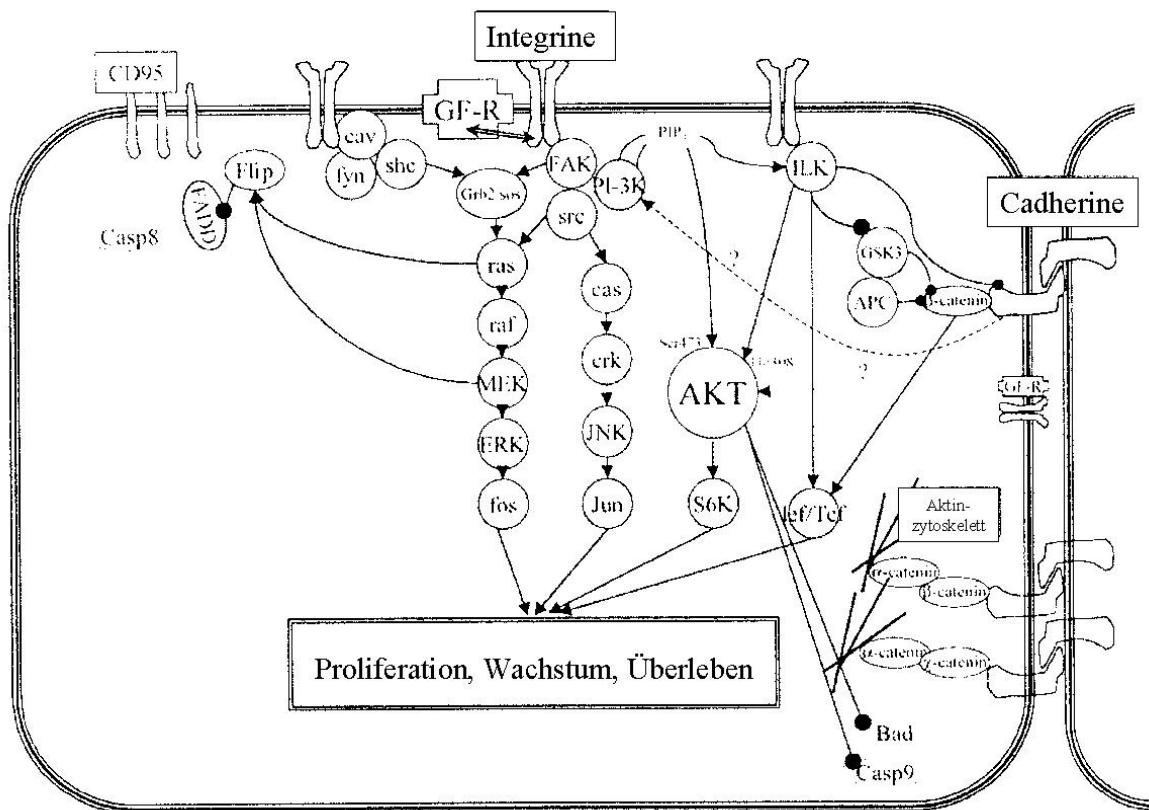


Abb. 2: Anoikis-relevante Signalwege

Bei der Induktion von Anoikis kann der CD95/Fas-Signalweg bzw. Caspase-8 oder JNK-Signaltransduktion beteiligt sein, letztere ist jedoch umstritten und möglicherweise auch nur für Überlebenssignale bei Ligandenbindung der Integrine zuständig. Anoikis-protektive Funktionen werden Cadherinen und der Signaltransduktion über Integrine und ILK, FAK und Proteine der Src-Familie wie Fyn und c-Src zugeschrieben. Besonders bekannt für die Vermittlung von Anoikisresistenz sind der PI3K/Akt-Signalweg und die Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade. Akt: ProteinkinaseB/Akt, APC: „adenomatosis coli gene product“, Casp: Caspase, Cav: Caveolin, ERK: „Ras extracellular signal regulated kinase“, FADD: Fas-assoziiertes „death domain“ Protein, FAK: „focal adhesion kinase“, Flip: FLICE-inhibitorisches Protein, GF-R: Wachstumsfaktor-Rezeptoren, GSK-3: Glykogen-Synthasekinase, ILK: „integrin-linked kinase“, JNK: Jun-Aminoterminal Kinase, Lef/Tcf: „lymphoid enhancer factor“ / T-Zellfaktor, MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase, PI3K: Phosphatidylinositol-3-phosphat Kinase, PIP3: Phosphatidylinositol-(3,4,5)triphosphat 3, S6K: p70 Ribosomenprotein S6 Kinase (modifiziert nach Grossmann, 2002)

Besonders bekannt für die Vermittlung von Anoikisresistenz ist jedoch onkogenes Ras, das „upstream“ der ER- und PI3-Kinasen liegt und bereits bei der Prägung des Anoikisbegriffes in der Isoform H-Ras als Inhibitor dieser Form der Apoptose beschrieben wurde (Frisch und Francis, 1994). Dieser Befund konnte in weiteren Studien auf onkogenes K-Ras (Rosen et al., 2000), N-Ras und die Ras-Verwandten TC-21 und R-Ras (McFall et al., 2001) ausgeweitet werden. Ein Vergleich onkogener K-ras Mutationen in Kodon12 und Kodon13 ergab, dass die Zellproliferation in Suspension durch Kodon 12 Mutanten sehr begünstigt wurde (Guerrero et al., 2000).

1.4. Die Ras-Familie

Die kleine GTPase Ras wurde erstmals als mutante Form in Maus- und Rattenviren beschrieben, daher der Name Ras (Rattensarkom), von der schon damals zwei unterschiedliche Isoformen, Harvey-Ras (H-Ras) und Kirsten-Ras (K-Ras), bekannt wurden (Harvey et al., 1964; Kirsten et al., 1967). Später wurden die proto-onkogenen Homologe des Menschen entdeckt, die zur Ras-Superfamilie mit inzwischen über 150 bekannten Mitgliedern zählen. Die kleinen GTPasen unterteilen sich in die sechs Subfamilien Ras, Rho, Ran, Rab, Arf und Kir/Rem/Rad. Ihre Aktivität wird über den Austausch von gebundenem GDP gegen GTP reguliert, der durch GEFs („guanine-nucleotide exchange factors“) vermittelt wird (Ehrhardt et al., 2002; Reuther und Der, 2000). Bei der Inaktivierung, d.h. der Hydrolyse von GTP zu GDP, haben GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) eine essentielle Funktion, da sie die sehr schwache intrinsische GTPase-Aktivität von Ras auf das erforderliche Maß verstärken (Bourne et al., 1990). So wird die Aktivität von Ras in einem „molecular switch“ geregelt. Die klassischen Ras-Proteine sind N-Ras (Neuroblastom-Ras), H-Ras und K-Ras, das in den alternativen Spleißformen K-Ras2A (K-Ras4A) und K-Ras2B (K-Ras4B) vorkommt, mit 189 Aminosäuren (N-, H- und K-Ras2A) bzw. 188 Aminosäuren (K-Ras2B) und einem Molekulargewicht von 21 kDa (Barbacid, 1987), (Abb. 3).

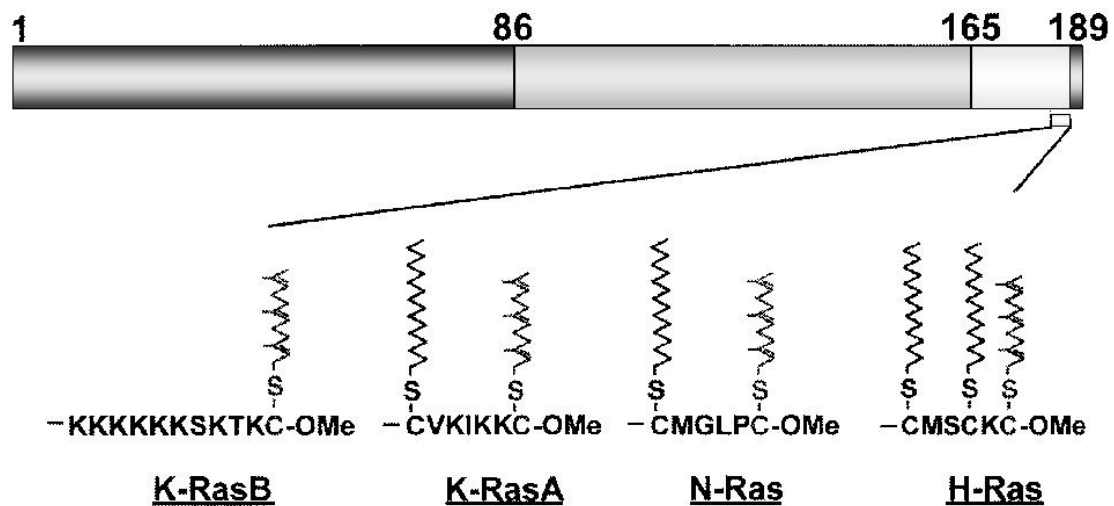


Abb. 3: Die Ras-Isoformen N-Ras, H-Ras und K-RasA/B

Die Sequenzen der Isoformen sind in den ersten 86 und in den letzten vier Aminosäuren des CAAX-Motives zu 100% (dunkelgrau) und in den Aminosäuren 87-165 zu 85% (hellgrau) identisch. Sie unterscheiden sich nur in der C-terminalen hypervariablen Region (weiß) stark voneinander. Die für die Verankerung in der Membran zuständige Region ist mit allen posttranslationalen Veränderungen vergrößert dargestellt. Alle Isoformen werden nach Entfernung des AAX-Restes methyliert und farnesyliert (alternativ z.T. auch geranylgeranyliert), K-RasA, N-Ras und H-Ras werden zusätzlich palmitoyliert. K-RasB hat als Lokalisationssignal eine polybasische Domäne aus Lysinresten. Die Bindung von Ras-Effektoren erfolgt in der hoch homologen Region (Aminosäuren 32-40). (modifiziert nach Bar-Sagi, 2001)

Die Bindungsdomäne für Ras-Effektoren (Aminosäuren 32-40) liegt in einer Region, die in den Isoformen zu 100% identisch ist, während die Domänen für die GTPase-Funktion in den ersten 165 Aminosäuren mit 100% bzw. 85% Identität zu finden sind. Daran schließt sich die C-terminale hypervariable Region an, in der nur das CAAX-Motiv (C: Cystein, A: Aliphatische Aminosäure, X: Methionin oder Serin) am Ende konserviert ist. Bei der posttranslationalen Prozessierung wird der Cystein-Rest farnesyliert und nach Entfernung des AAX-Restes methyliert. Zusammen mit einem Lokalisierungssignal aus der hypervariablen Region, ein oder zwei Palmitylresten (N-, H- und K-Ras2A) oder einer polybasischen Domäne (K-Ras2B), befähigt diese Prozessierung die Ras-Proteine zum Transport und zur Bindung an die Membran, wo sie aktiv sind (Bar-Sagi, 2001). Dabei wird K-Ras2B direkt vom Endoplasmatischen Retikulum an die Plasmamembran gebracht, im Gegensatz zu den anderen Isoformen, die über den sekretorischen Weg und den Golgi-Apparat transportiert werden (Apolloni et al., 2000; Choy et al., 1999). Während K-Ras2B eher in den ungeordneten Bereichen der Plasmamembran zu finden ist, sind andere Ras-Isoformen wie H-Ras auch in cholesterolreichen Mikrodomänen, sogenannten „lipid rafts“, lokalisiert (Niv et al., 2002; Prior et al., 2001). Eine Kolokalisation mit Bestandteilen der „lipid rafts“ in geringerem Ausmaß wurde aber auch für K-Ras2B beschrieben (Parmryd et al., 2003). Ras

kann außerdem an Endomembranen lokalisiert sein (Übersicht in Hingorani und Tuveson, 2003). In einer aktuellen Studie konnten aktives K- und H-Ras sogar verschiedenen Bereichen der schwerer zu unterscheidenden cholesterolumabhängigen Mikrodomänen zugeordnet werden (Prior et al., 2003), ein Befund, der die Annahme verschiedener Funktionen der Isoformen wiederum bekräftigt.

1.4.1. Ras-Funktionen und Ras-Signaltransduktion

Die vier klassischen Ras-Genprodukte von Säugern zeigen sich in der Evolution hoch konserviert (Barbacid, 1987) und werden mit mindestens einer Isoform in allen Organen und Zelllinien exprimiert (Furth et al., 1987; Leon et al., 1987), K-Ras2B wird ubiquitär exprimiert (Watzinger und Lion, 1999). Nicht nur strukturell, sondern auch funktionell spielt K-Ras eine Sonderrolle: Während die Effekte des N-ras oder H-ras „Knock-outs“ in Mäusen zu vernachlässigen sind, verursacht die Deletion des K-ras Genes embryonale Lethalität (Koera et al., 1997; Johnson et al., 1997). Ras spielt eine zentrale Rolle bei der Übertragung extrazellulärer Stimuli in intrazelluläre Signale, in der Regulation des Zellzyklus und der Differenzierung, bei der Induktion von Seneszenz oder Apoptose und bei der Zelladhäsion (Crespo und Leon, 2000; Spandidos et al., 2002; Erhardt et al., 2002). Dabei ist Ras-Aktivität für den Ablauf des Zellzyklus, besonders in der frühen Phase nach der Stimulation und während der G1-Phase bis zum Beginn der DNA-Synthese, essentiell (Stacey und Kazlauskas, 2002; Takuwa und Takuwa, 2001).

Die Stimulation von Ras-Signalwegen erfolgt über die Aktivierung von Zelloberflächen-Rezeptoren wie dem EGFR („epidermal growth factor receptor“), dem PDGFR („platelet derived growth factor receptor“), G-Protein gekoppelten Rezeptoren, Integrinen und Zytokinrezeptoren, wie z.B. dem Interleukin-2 Rezeptor. Ras aktiviert dann eine Vielzahl von Effektoren, Raf-Kinasen, PI3Kinasen, PKC ζ , Mitglieder der RalGDS-Familie, AF-6, Nore-1, Mekk1, Rin1 etc. in Signalkaskaden, die z.B. transkriptionelle Prozesse steuern (Übersicht in Malumbres und Pellicer, 1998; Shields et al., 2000), (Abb. 4).

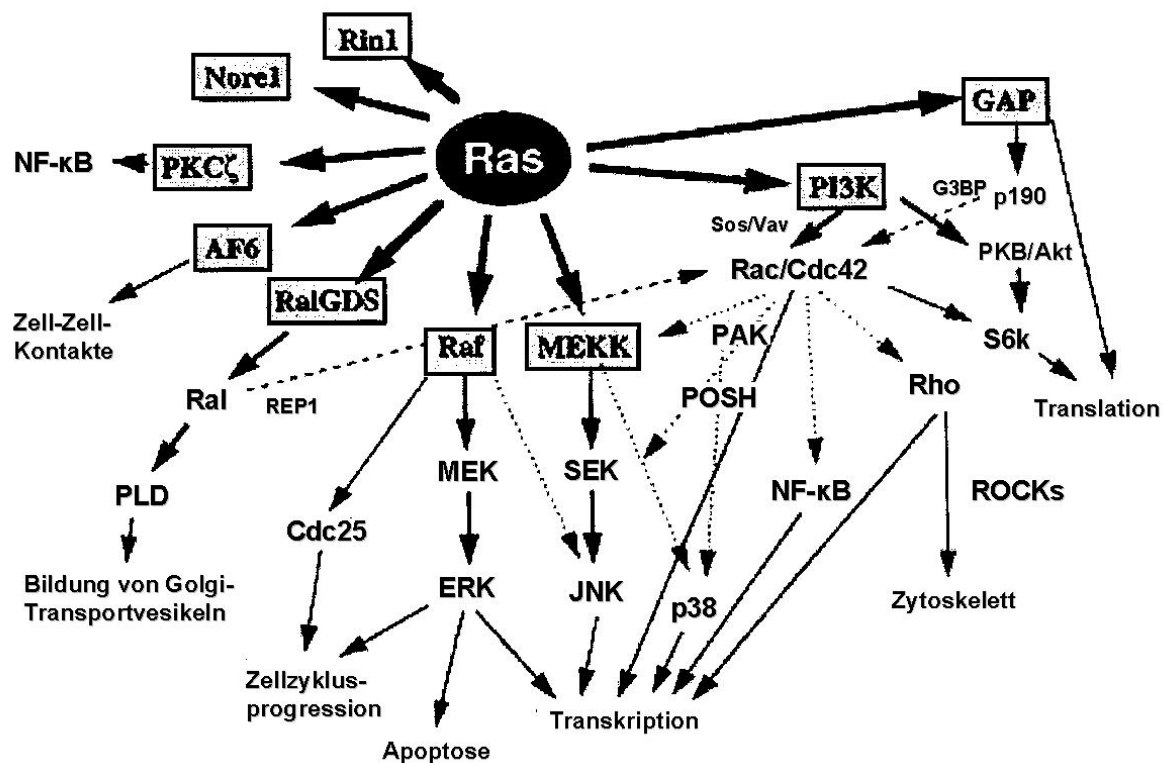


Abb. 4: Signaltransduktion „downstream“ von Ras

Ras ist ein zentrales Bindeglied zwischen extrazellulären Stimuli und der intrazellulären Signalübertragung bis in den Zellkern und vermittelt darüber Zell-Zell-Kontakte, die Bildung von Golgi-Transportvesikeln, Veränderungen des Zytoskeletts, transkriptionelle und Translations-Prozesse, Zellzyklusprogression und Apoptoseregulationen. Die best untersuchten Signalwege sind die Raf-MEK-ERK Kaskade oder PI3K/Akt Signaltransduktion. (modifiziert nach Malumbres und Pellicer, 1998)

1.4.2. Ras als Onkogen

Etwa 70% aller Neoplasien weisen Mutationen eines ras-Gens auf, besonders in den Kodons 12, 13, 59 und 61 (Macaluso et al., 2002). Die Punktmutationen, die eine Inaktivierung von Ras durch GAPs verhindern (Trahey und McCormick, 1987; Scheffzek et al., 1998), oder Ras-Überexpression (Barbacid, 1987; Scheele et al., 1995) führen zu konstitutiver Aktivität der kleinen GTPase, durch die Angiogenese und Metastasierung von Tumoren forciert werden. Interessanterweise sind Mutationen einer Isoform für bestimmte Krebsarten charakteristisch: Das H-ras Gen ist in Blasenkarzinomen und Hypernephromen (je 10%), N-ras in Melanomen (13%), hepatozellulären Karzinomen (30%) und akuter myeloischer Leukämie (30%) und das K-ras Gen in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (33%), kolorektalen Karzinomen (44%) und Pankreasadenokarzinomen (90%) mutiert (Macaluso et al., 2002). Durch onkogenes Ras wird der Eintritt in den Zellzyklus ohne Stimulation durch Wachstumsfaktoren ermöglicht, wie in der Mausfibroblasten-Zelllinie NIH3T3 gezeigt wurde (Stacey und Kung, 1984; Mulcahy et al., 1985), in Primärzellen wird jedoch zur

Transformation zusätzlich ein immortalisierendes Onkogen wie z.B. c-myc oder die Inaktivierung eines Tumorsuppressors, z.B. eine p16^{INK4a}-Deletion, benötigt, da sonst durch die Ras-Aktivität Seneszenz oder Zellzyklusarrest ausgelöst wird (Malumbres und Pellicer, 1998). Eine erhöhte Ras-Aktivität führt nämlich unter anderem zu einer gesteigerten Expression der Zellzyklusinhibitoren p16 (Serrano et al., 1995) und p21 (Michieli et al., 1996). Mausmodelle geben dabei nur bedingt die Situation im Menschen wieder, da humane Zellen schwerer zu transformieren sind. Neben onkogenem Ras ist zur Transformation humaner Zellen z.B. die Inaktivierung zweier, des pRb- und des p53-Signalweges, für Mauszellen aber nur eines Signalweges über ARF/p53 erforderlich (Hahn und Weinberg, 2002). Charakteristisch für Ras-transformierte Zellen sind Änderungen im Ionentransport, in der Kontrolle des Zellvolumens und in der Organisation des Zytoskeletts und außer Mitogen-unabhängigem auch substratunabhängiges Wachstum, das zur Tumorigenese beiträgt (Barbacid, 1987; Meyer et al., 1991; Wahrman et al., 1985).

1.5. Fragestellung

Anoikisresistenz stellt eine charakteristische Eigenschaft humaner Pankreaskarzinome dar. Durch die Reexpression des Tumorsuppressors p16^{INK4a}, unter anderen in der humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie Capan-1, konnte die Sensibilität für Anoikis wiederhergestellt werden (Plath et al., 2000). Da die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die an der Restitution von Anoikis durch den Tumorsuppressor p16^{INK4a} beteiligt sind, neue Ansätze zur Therapie des aggressiven und bisher kaum therapierbaren Pankreaskarzinoms liefern könnte, untersuchte die vorliegende Arbeit am Modell der Zelllinie Capan-1 die p16-spezifische Regulation von Anoikis und Anoikisresistenz. Dabei sollten mögliche Anoikis-relevante Signalwege im Zellsystem

Capan-1 Kontrollzellen	- p16 / - Anoikis
Capan-1/p16 Zellen	+ p16 / + Anoikis

durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren identifiziert werden. Wegen seiner Anoikis-protektiven Eigenschaften und seiner besonderen Bedeutung für den voll transformierten Phänotyp humaner Pankreaskarzinomzellen stand hierbei als Signalmolekül das Onkoprotein K-Ras im Mittelpunkt des Interesses, dessen prominente Rolle bei der p16-vermittelten Anoikisinduktion näher charakterisiert wurde.