

3. ERGEBNISSE

3.1. P16-Reexpression restituiert die Anoikissensibilität in Capan-1 Zellen

Als Modell in Untersuchungen zu den molekularen Grundlagen des humanen Pankreasadenokarzinoms wurden Capan-1 Zellen verwendet, da sie die häufigsten Defekte in Pankreastumoren aufweisen. Hierzu gehören die konstitutive Aktivierung von K-Ras, die Inaktivierung des Zellzyklusinhibitors p16 und zwei weitere typische Mutationen, die eine Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p53 und DPC4 zur Folge haben. Darüberhinaus ist die humane Pankreaskarzinom-Zelllinie Capan-1 durch Anoikisresistenz gekennzeichnet. Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die stabile Transfektion des Tumorsuppressors p16 in Capan-1 Zellen zu einer erhöhten Expression der $\alpha 5$ -Untereinheit des Fibronektinrezeptors $\alpha 5\beta 1$, einer Restitution von Anoikis und zum Verlust der Tumorigenität in Nacktmäusen führte (Plath et al., 2000). Infolge der p16-Reexpression zeigen sich deutliche Änderungen der Zellmorphologie: Während Capan-1 Zellen und die zur Kontrolle mit dem Vektor pRC_{CMV} transfizierten Capan-1 Klone (Mock) meist Zellhaufen aus Zellen mit kurzen Ausläufern bilden, wachsen Capan-1/pRC_{CMV}p16 Klone (p16) flächiger und erscheinen oft durch ihre langen Ausläufer und den gestreckten Zellkörper fibroblastenartig (Abb. 5).

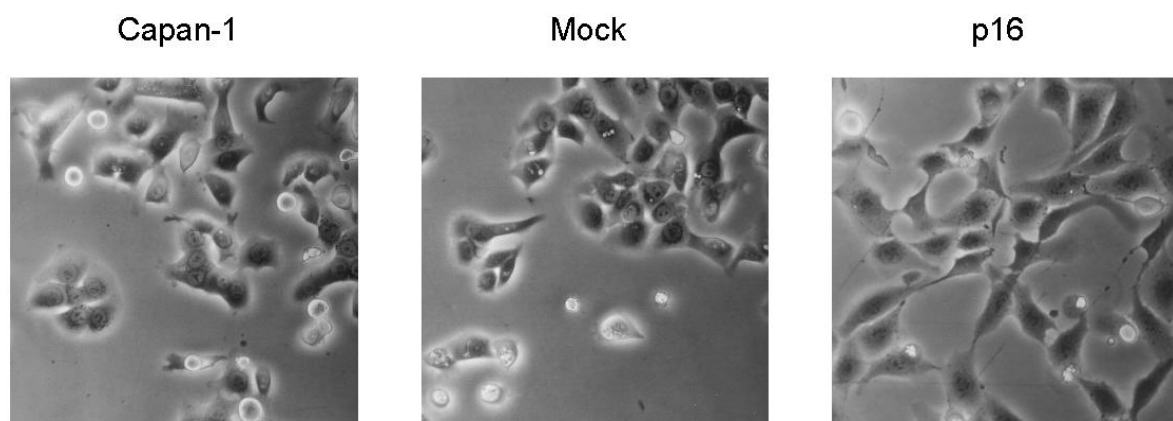


Abb. 5: Änderung der Morphologie durch die p16-Reexpression in Capan-1 Zellen

Typisch für die adhärenzte Zelllinie Capan-1 sind Zellen mit kurzen Ausläufern und die Bildung von Zellhaufen (Capan-1). Durch die stabile p16-Substitution wachsen die Zellen flächiger, bilden längere Ausläufer und ähneln eher Fibroblasten als epithelialen Zellen (p16); zur Kontrolle mit dem Vektor pRC_{CMV} stabil transfizierte Capan-1 Klone (Mock) verändern sich jedoch morphologisch nicht. Hier sind exemplarisch Capan-1 Zellen, der Klon Mock2 und der Klon p16/3 in 40facher mikroskopischer Vergrößerung gezeigt.

Capan-1 Zellen sind in besonderer Weise permissiv für die p16-Reexpression, da in dieser Zelllinie eine ausgeprägte pRb-Inhibition auftritt und p16 so keinen G1-Arrest verursacht. Die Expression der Proteine pRb und p16 in Capan-1 Zellen +/- p16 wurde hier mittels Western Blot nachgewiesen (Abb. 6).

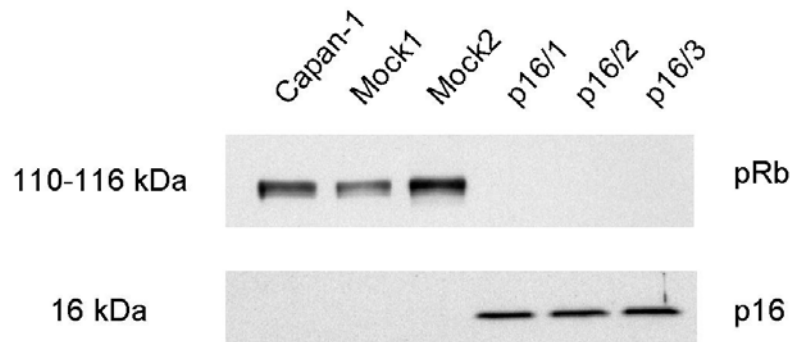


Abb. 6: Verlust von pRb nach p16-Substitution in Capan-1 Zellen

Capan-1 Zellen, zwei zur Kontrolle mit dem Vektor pR_{CMV} transfizierte (Mock1, Mock2) und drei mit p16 transfizierte Capan-1 Klone (p16/1, p16/2, p16/3) wurden auf Proteinebene analysiert. Für die Western Blots wurden je 15 µg NP-40-Proteinlysate in einem 7,5%igen (pRb) bzw. 15%igen (p16) SDS-PA(Polyacrylamid)-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde pRb mit einem Antikörper gegen humanes pRb in unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen bei 110-116 kDa und p16 mit einem p16-humanspezifischen Antikörper bei 16 kDa detektiert. In Capan-1 Kontrollzellen war pRb deutlich, p16 jedoch gar nicht nachweisbar, während in allen drei p16-Klonen eine gleichmäßige p16-Expression, aber ein völliger Verlust der pRb-Expression festzustellen war.

Zur Ermittlung der Anoikisrate wurden die Capan-1/p16 Klone und die Kontrollzellen für 24 Stunden adhärent bzw. in Suspension auf PolyHEMA-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert. Nach Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid wurde der DNA-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch im FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter) analysiert, so dass die Phasen des Zellzyklus unterschieden werden konnten. Auf Abb. 7 sind repräsentative Zytogramme für einen Capan-1/Mock- und einen Capan-1/p16-Klon gezeigt. Links vom höchsten Peak (G1-Phase) befindet sich die Fraktion der Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt, d.h. der apoptotischen Zellen. Die Differenz des apoptotischen Zellanteils von Zellen in Suspension zu adhärent gewachsenen Zellen ergibt die Anoikisrate. P16-Klone wiesen im Vergleich zu den niedrigen Werten der Kontrollzellen einen starken Anstieg der Anoikis auf. Somit konnte bestätigt werden, dass die p16-Reexpression in Capan-1 Zellen deren Anoikissensibilität wiederherstellte.

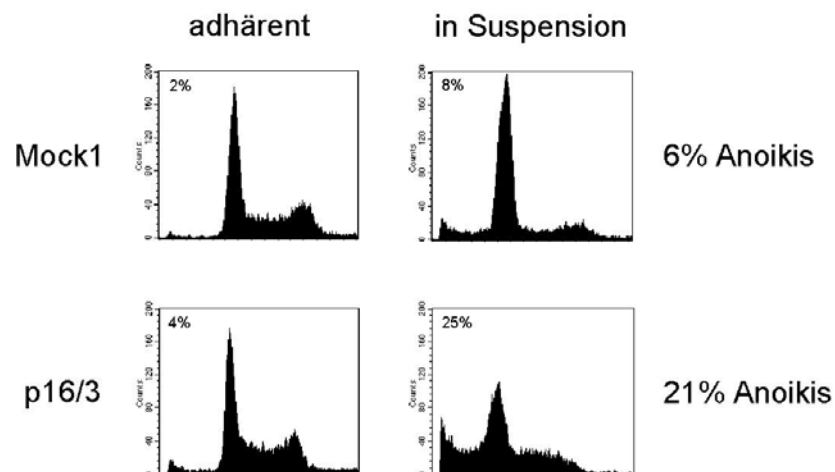


Abb. 7: P16-Reexpression restituiert die Anoikis in Capan-1 Zellen

Die Zellzyklusanalysen sind exemplarisch für Capan-1/Mock (oben) und Capan-1/p16 Zellen (unten) gezeigt, die 24 Stunden adhärent (links) oder in Suspension (rechts) kultiviert worden waren. Links vom großen Peak der Zellen in der G1-Phase sind Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt, d.h. apoptotische Zellen zu sehen. Ihr Anteil stieg repräsentativ in Mock1-Zellen von 2% auf 8% nach Substratverlust und im p16/3-Klon von 4% auf 25%, so dass sich die Anoikis durch die p16-Reexpression sprunghaft von 6% auf 21% steigerte.

3.2. Inhibition Anoikis-relevanter Signalwege in Capan-1 Zellen

Zur Aufklärung des Mechanismus der p16-vermittelten Anoikisinduktion im Modell der Capan-1 Zellen wurden in einem ersten Ansatz pharmakologische Inhibitoren Anoikis-relevanter Signaltransduktion eingesetzt. Einerseits könnte Anoikis in Capan-1/p16 Zellen durch den Caspase-8 Inhibitor Z-IETD-FMK inhibiert werden, wie für epitheliale Zellen bereits beschrieben (Puviani et al., 2003; Rytomaa et al., 1999), d.h. der Anteil apoptotischer p16-Zellen in Suspension sollte sich verringern. Die Anoikisresistenz in Capan-1 Zellen andererseits könnte durch MEK/ERK- oder PI3K/Akt-Signalwege vermittelt werden, die durch den MEK-Inhibitor PD98059 und den PI3K-Inhibitor LY294002 überprüft werden sollten. PD98059 steigerte die Anoikissensibilität in Brustkarzinomzellen, Keratinozyten und transformierten Rattennierenzellen (Fukazawa et al., 2002; Jost et al., 2001; Weng et al., 2002), während LY294002 eine solche Funktion in Kolonkarzinomzellen mit hoher Src-Aktivität zugeschrieben wurde (Windham et al., 2002). Die MEK- bzw. PI3K-Inhibition könnte also die Apoptosefraktion suspendierter Capan-1 Zellen erhöhen. Die Inhibitoren wurden nach Literaturangaben bzw. Konzentrationstests in DMSO gelöst und in einer Verdünnung von 1:100 folgendermaßen eingesetzt:

Tab. 1: Inhibitoren

Inhibitor	Zielmolekül	Konzentration	Vorinkubation	Literatur
Z-IETD-FMK	Caspase-8	10 μ M	60 min	Martin et al., 1998; Sweeney et al., 1998
PD98059	MEK	50 μ M	30 min	Alessi et al., 1995; Dudley et al., 1995
LY294002	PI3K	50 μ M	30 min	Vlahos et al., 1994

Capan-1, Capan-1/Mock und Capan-1/p16-Zellen wurden nach Vorinkubation mit einem Inhibitor oder zur Kontrolle mit dem Lösungsmittel passagiert und in demselben Medium für 24 Stunden adhärent oder in Suspension kultiviert. Die Wirkung der Inhibitoren wurde dann per Durchflusszytometrie und Quantifizierung der apoptotischen Fraktionen ermittelt, die in Abb. 8 zu sehen sind. Da sich zum Teil auch erhebliche Auswirkungen auf den Apoptoseanteil adhärenter Zellen zeigten, wurde diese Form der Darstellung gewählt.

Durch die Inhibition von Caspase-8 mit Z-IETD-FMK war in suspendierten Capan-1 Kontrollzellen (Capan-1 und Capan-1/Mock) und adhärent gewachsenen p16-Transfektanten schon eine geringe Erniedrigung der Apoptosefraktion zu erkennen. Verglichen wurde dabei mit Zellen, die mit 0,1% DMSO behandelt worden waren. Bei suspendierten p16-transfizierten Capan-1 Zellen jedoch verringerte sich der Anteil der apoptotischen Zellen deutlich, so dass hier die Differenz des Apoptoseanteils in Suspension zu dem der adhärenter Kultur, d.h. die Anoikisrate, um ein Drittel reduziert wurde. Caspase-8 ist also an der p16-vermittelten Anoikisinduktion in Capan-1 Zellen beteiligt.

Beim Einsatz des MEK-Inhibitors PD98059 wurde ein Anstieg der Apoptose sowohl bei adhärent als auch in Suspension kultivierten Capan-1/p16 Zellen festgestellt. Eine Wirkung auf die Kontrollzellen war dagegen nicht erkennbar. Mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 stieg der Anteil apoptotischer Zellen in adhärenter Kulturen mit und ohne p16, in p16-Suspensionszellen erschien aber die Apoptosefraktion vermindert. So ergab sich nach diesen Experimenten folgendes Bild: Sowohl MEK- als auch PI3K-Signaltransduktion schienen Apoptoseresistenz, aber keine Anoikisresistenz zu vermitteln. Es deutete sich vielmehr die Möglichkeit an, dass der PI3K-Signalweg Anoikis-fördernd wirken könnte. Da der Anteil apoptotischer Zellen von Experiment zu Experiment erheblich schwankte, war die Bewertung der Ergebnisse schwierig. Zur Sicherheit wurde die inhibitorische Wirkung von PD98059 und LY294002 an der Aktivierung von „downstream targets“ überprüft.

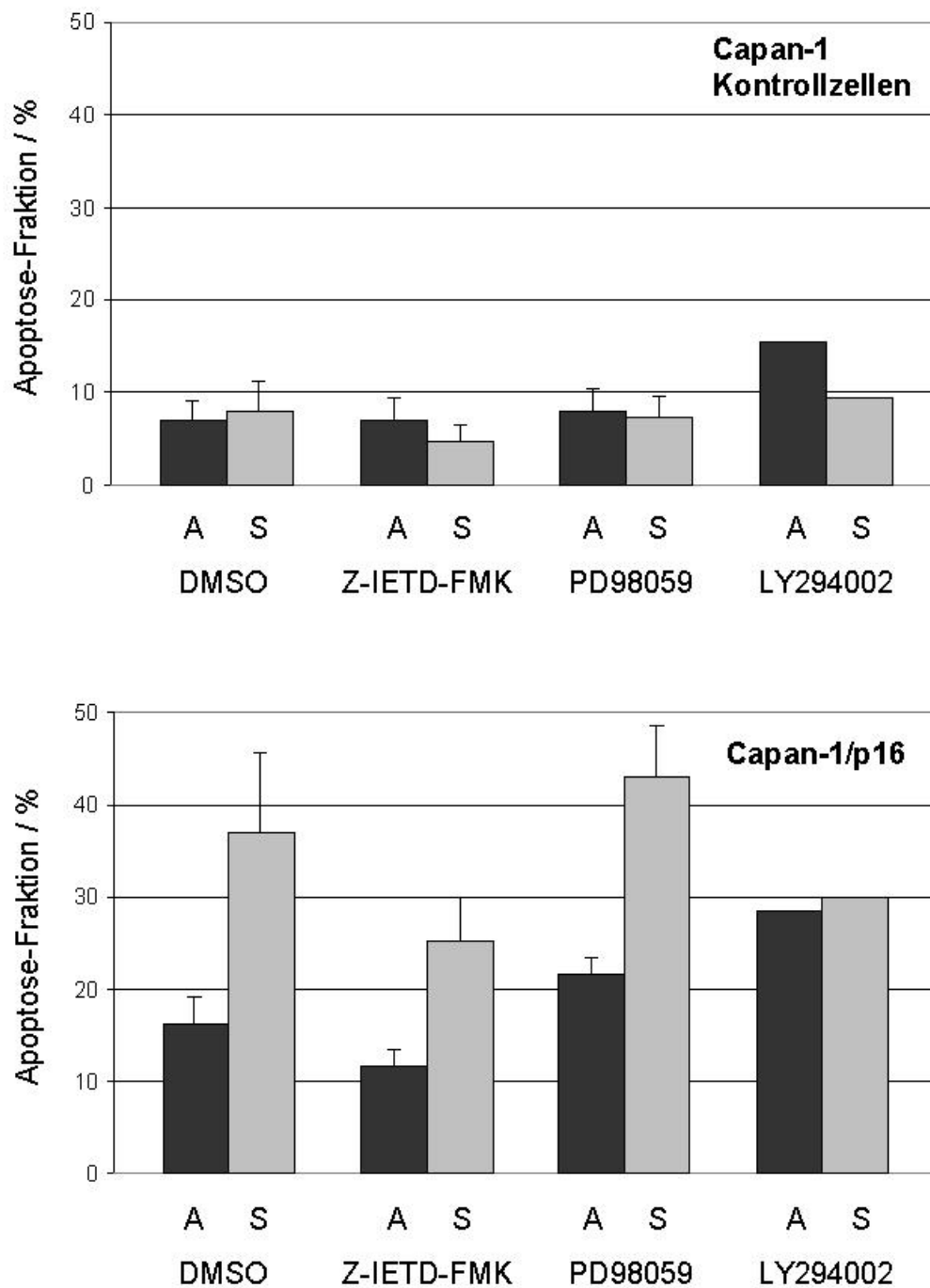


Abb. 8: P16-vermittelte Anoikis wird durch Caspase-8 Inhibition gehemmt

Der Anteil apoptotischer Capan-1 Zellen +/- p16 wurde nach 24 Stunden adhärenter (A, dunkelgraue Balken) oder Kultur in Suspension (S, hellgraue Balken) mit den Inhibitoren (mit Vorinkubation) oder zur Kontrolle mit 0,1% DMSO in der FACS-Analyse bestimmt. Die Anoikis reduzierte sich durch den Einsatz des Caspase-8 Inhibitors Z-IETD-FMK in Capan-1 Kontrollzellen im Rahmen der Messgenauigkeit nur geringfügig, in p16-Klonen jedoch um 34%. Eine Steigerung der Anoikis in Capan-1 Kontrollzellen durch den Einsatz der „Anoikisresistenz-Inhibitoren“ PD98059 und LY294002 konnte nicht festgestellt werden (n=3, für LY294002 n=2, daher hier ohne Fehlerangabe).

Eine Reduktion der Aktivität von ER-Kinasen durch den MEK-Inhibitor bzw. der Akt-Aktivität durch den PI3K-Inhibitor konnte im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 9). Dazu wurden Capan-1 Zellen wie oben beschrieben mit den Inhibitoren bzw. nicht oder kontrollbehandelt und lysiert. Die Proteinanalyse erfolgte mit phosphospezifischen Antikörpern zur Überprüfung der Aktivität und nach dem „Stripping“ auf derselben Membran mit den zugehörigen Antikörpern für die Proteinexpression.

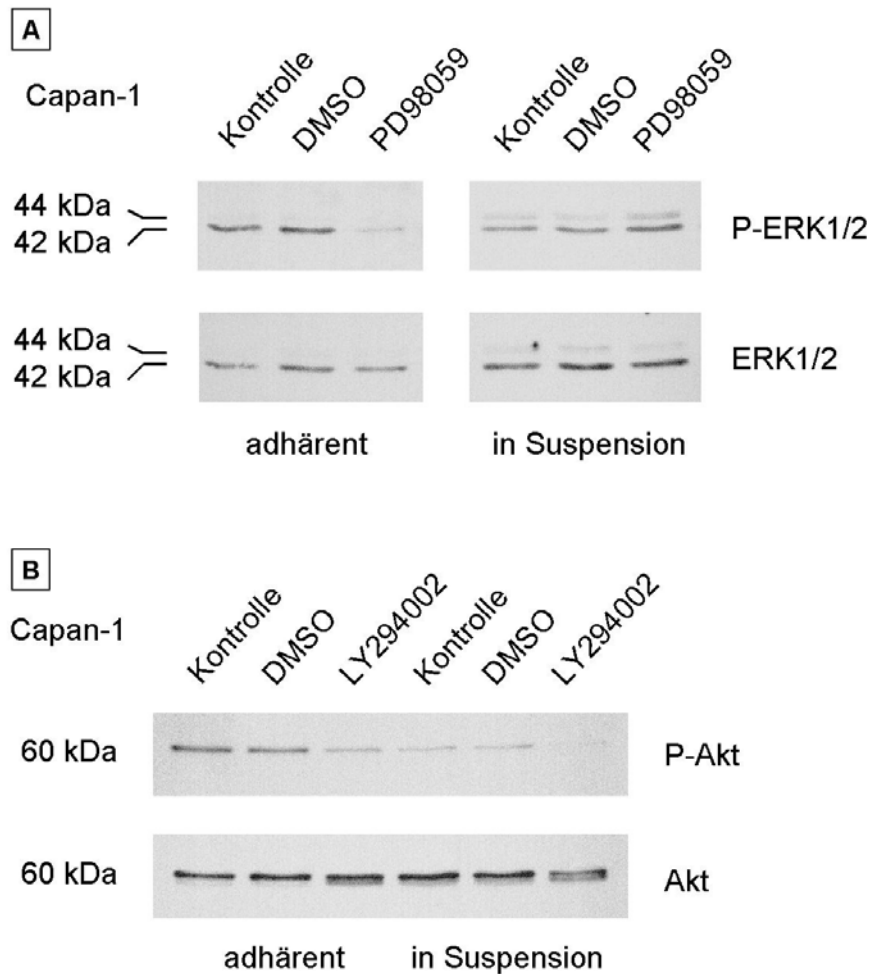


Abb. 9: PD98059 und LY294002 hemmen die Aktivität der „downstream targets“ ERK und Akt

Capan-1 Zellen wurden nach der Inkubation mit den Inhibitoren oder ohne (Kontrolle) / mit 0,1% DMSO (DMSO) in adhärenter oder Suspensions-Kultur, den Bedingungen für die FACS-Analyse entsprechend, in NP-40-Puffer lysiert. Je 20 µg Protein wurden in 10%igen SDS-PA-Gelen aufgetrennt und im Western Blot analysiert. A: In adhären Capan-1 Zellen wurde die Aktivität der ER-Kinasen durch die MEK-Inhibition stark reduziert, in suspendierten Zellen war aber keine reduzierte ERK-Phosphorylierung zu beobachten (P-ERK1/2). Die ERK1/2-Proteinexpression blieb dabei unverändert (ERK1/2). B: Sowohl unter adhären als auch unter Suspensions-Bedingungen war eine deutliche Reduktion der Akt-Aktivität durch den PI3K-Inhibitor zu erkennen (P-Akt) bei weiterhin ausgeprägter Akt-Proteinexpression (Akt).

Prinzipiell waren die MAP-Kinasen in den Suspensionskulturen stärker phosphoryliert als in adhären gewachsenen Capan-1 Zellen – möglicherweise ein Streßphänomen. Um Unterschiede besser hervorheben zu können, wurde hier jedoch eine schwächere

Filmexposition für den Phospho-ERK Antikörper gezeigt. Im Vergleich zum zellulären Proteingehalt konnte eine deutliche Reduktion der aktiven Formen von ERK bzw. Akt in Inhibitor-behandelten Zellen im Western Blot nachgewiesen werden. Augenscheinlich konnte aber der MEK-Inhibitor PD98059 nach Kultivierung der Zellen in Suspension die Aktivität (zumindest die Phosphorylierung) der MAP-Kinasen nicht mehr verringern. Trotz des leichten Apoptoseanstiegs in suspendierten Capan-1/p16 Zellen durch PD98059 war also keine Aussage über das Ausmaß der MEK-Inhibition zu treffen. Mit einem zweiten MEK-Inhibitor, U0126, wurde das gleiche Ergebnis erzielt (Daten nicht gezeigt). Die Akt-Inhibition war dagegen auch unter Suspensionsbedingungen nachweisbar. Die FACS-Analyse war jedoch trotzdem mit Vorsicht zu bewerten, da deutliche Auswirkungen auf die Spontanapoptose eine Beobachtung der Anoikisregulation erschwerten. Obwohl sich die Wirkung der Inhibitoren zum Teil in Änderungen der Apoptosewerte bzw. einer Reduktion der Aktivität von „downstream targets“ in den Experimenten offenbarte, war so eine Relevanz der MEK/ERK- und PI3K/Akt-Signalwege für p16-vermittelte Anoikis nicht ausreichend zu beurteilen.

3.3. K-Ras Regulation durch p16 in Capan-1 Zellen

3.3.1. P16-Reexpression führt zum Verlust der K-Ras Aktivität in Capan-1 Zellen

Ein speziell für die Genese von Pankreasadenokarzinomen äußerst bedeutsames Signalmolekül oberhalb des MEK/ERK- und des PI3K/Akt-Signalweges ist die kleine GTPase Ras, auf deren Ebene eine p16-spezifische Regulation möglicherweise besser zu erkennen wäre. Die Ras-Aktivität im Modell Capan-1/-p16/-Anoikis gegenüber Capan-1/+p16/+Anoikis war in besonderer Weise von Interesse, da mutierte Ras-Formen als Verursacher von Anoikisresistenz gelten und die Isoform K-Ras, wie für Pankreasadenokarzinome charakteristisch, durch eine Punktmutation in Capan-1 Zellen konstitutiv aktiv ist. Eine Ras-Regulation durch p16 konnte hier also in Betracht gezogen werden.

Aus Capan-1 Kontrollzellen und einem p16-Klon wurden nach adhärenter oder der Kultivierung in Suspension Proteinlysate gewonnen, aus denen aktives Ras durch Bindung an die Raf-Bindungsdomäne RBD in einem „Pull-Down Assay“ präzipitiert und im Western Blot nachgewiesen wurde. Gezeigt ist die Detektion mit einem K-Ras Antikörper (Abb. 10). In Capan-1 Kontrollzellen war deutlich K-Ras Aktivität nachweisbar, die sich durch die Kultivierung in Suspension drastisch erhöhte. Bemerkenswerterweise war jedoch in dem p16-

Klon weder unter adhärennten noch unter Suspensions-Bedingungen K-Ras Aktivität zu detektieren. Mit einem Pan-Ras Antikörper, der neben K-Ras auch N- und H-Ras erkennt, wurde das gleiche Ergebnis erzielt (Daten nicht gezeigt).

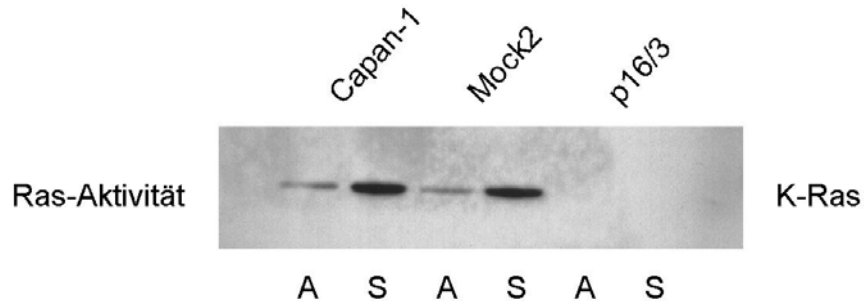


Abb. 10: Die p16-Substitution führt unabhängig von Matrixkontakten zum Verlust der K-Ras Aktivität

Adhärennte (A) und Suspensions-Kulturen (S) von Capan-1 Kontrollzellen (Capan-1, Mock2) und dem p16/3-Klon wurden nach 24 Stunden in MLB lysiert. Aus je 850 µg Lysatprotein wurde aktives Ras durch Bindung an die RB-Domäne von Raf präzipitiert. Nach Auftrennung in einem 13,5%igen SDS-PA-Gel wurde K-Ras im Western Blot mit einem Isoform-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Während der Substratverlust in Capan-1 Kontrollzellen eine erhöhte K-Ras Aktivität nach sich zog, war im p16-Klon weder unter adhärennten noch unter Suspensions-Bedingungen aktives K-Ras zu detektieren.

Um zu überprüfen, ob der Verlust der K-Ras Aktivität tatsächlich durch die p16-Reexpression verursacht wurde, wurde der Ras-Aktivitätstest mit mehreren Klonen wiederholt. Dabei bestätigte sich, dass die p16-Substitution in Capan-1 Zellen zum Verlust der K-Ras Aktivität führte, hier gezeigt in adhärennt gewachsenen Zellen (Abb. 11). Aktivität der Ras-Isoformen N- und H-Ras ließ sich - auch mit Isoform-spezifischen Antikörpern (Daten nicht gezeigt) - in keiner der Zelllinien erkennen.

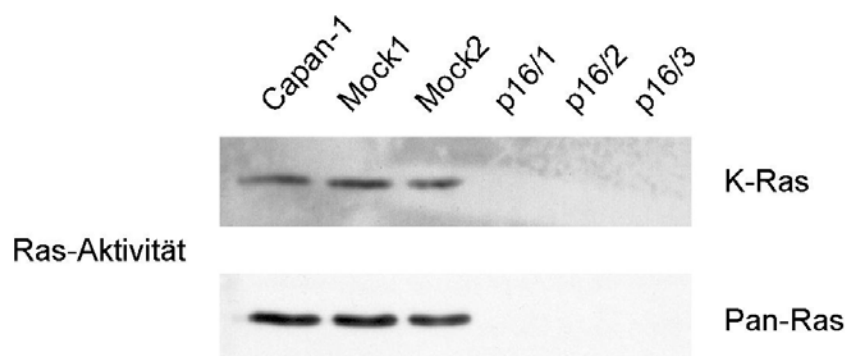


Abb. 11: Der Verlust der Ras-Aktivität steht in direkter Korrelation zur p16-Reexpression

Aus MLB-Lysaten (je 950 µg Protein) von Capan-1 Kontrollzellen und drei p16-Klonen wurde aktives Ras mit dem RBD „Pull-Down Assay“ präzipitiert. Nach Auftrennung in einem 13,5%igen SDS-PA-Gel wurde Ras im Western Blot mit einem K-Ras und einem Pan-Ras Antikörper detektiert. K-Ras Aktivität war in allen Kontrollzellen, jedoch in keinem der p16-Klone nachweisbar (K-Ras). Neben der K-Ras Bande ließ sich trotz Verwendung des Pan-Ras spezifischen Antikörpers keine weitere Aktivitätsbande darstellen (Pan-Ras).

3.3.2. P16-Reexpression in Capan-1 Zellen reduziert die Expression von K-Ras signifikant

Die nachfolgenden Experimente sollten den Mechanismus eingrenzen, der dem Verlust der K-Ras Aktivität zugrunde lag. Zunächst war zu untersuchen, ob der p16-bedingte Verlust der K-Ras Aktivität in Capan-1 Zellen auf einer verringerten Proteinexpression von K-Ras beruhte. Dies sollte gleichzeitig in mehreren Klonen überprüft werden. Dazu wurde im Western Blot die Ras-Expression in Capan-1 Kontrollzellen und p16-Klonen mit dem K-Ras spezifischen und dem Pan-Ras Antikörper dargestellt. Mit beiden Antikörpern zeigte sich eine deutliche Reduktion der K-Ras Expression in p16-substituierten Capan-1 Zellen (Abb. 12). Somit ist eine Verminderung des zellulären K-Ras Gehaltes als Ursache des Aktivitätsverlustes anzunehmen. Im Pan-Ras Blot konnte die obere Proteinbande nach „Stripping“ derselben Membran K-Ras zugeordnet werden, die schwache K-Ras Expression in den p16-Klonen war dabei mit dem Pan-Ras Antikörper nicht mehr zu detektieren. Darunter waren weitere Banden erkennbar, die nach der angegebenen Spezifität des Antikörpers N- oder H-Ras zeigen müssten. Alle Ras-Banden waren bei 21 kDa, zum Teil auch etwas darüber zu detektieren.

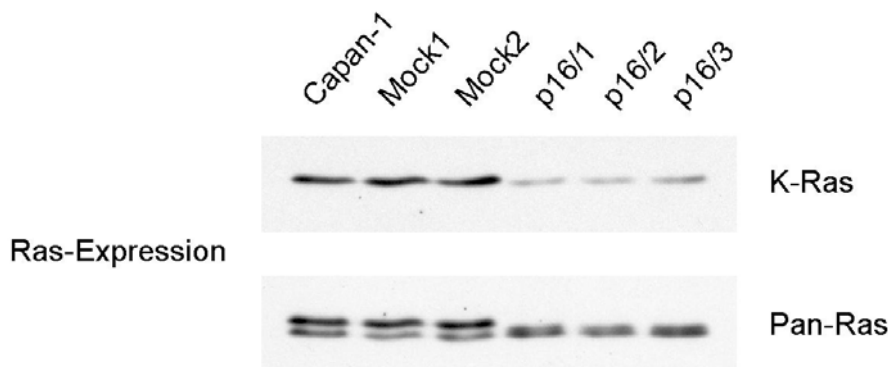


Abb. 12: Die p16-Substitution reduziert selektiv und spezifisch die K-Ras Expression

Je 50 µg Protein aus SDS-Lysaten von Capan-1 Kontrollzellen und drei p16-Klonen wurden in einem 13,5%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit einem K-Ras Antikörper und nach dem „Stripping“ der Membran mit einem Pan-Ras Antikörper analysiert. Die Expression von K-Ras (oben und obere Bande der Pan-Ras Detektion) war in den p16-Transfektanten deutlich verringert, während andere Ras-Isoformen nicht abnahmen (Pan-Ras).

Um zu überprüfen, ob neben K-Ras noch weitere Isoformen p16-abhängig reguliert waren, wurden N- und H-Ras mit Isoform-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 13). Eine p16-spezifische Änderung der N- oder H-Ras Expression war hier nicht zu beobachten.

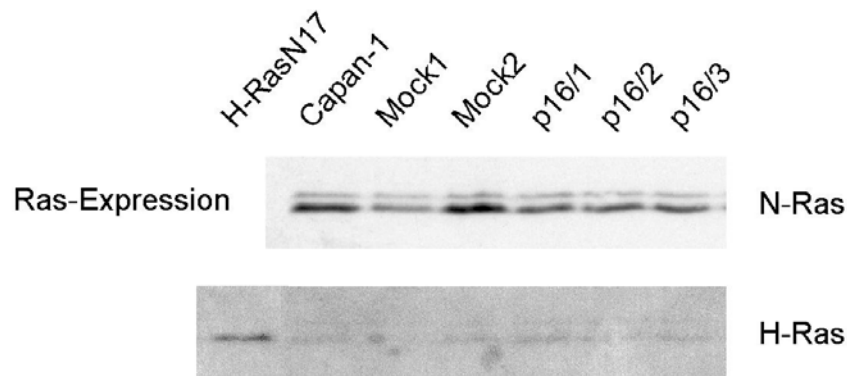


Abb. 13: Die Expression von N-Ras und H-Ras wird nicht durch p16 reguliert

Je 50 µg Protein aus SDS-Lysaten von Capan-1 Kontrollzellen und drei p16-Klonen wurden in 13,5%igen SDS-PA-Gelen aufgetrennt und im Western Blot mit einem N-Ras bzw. H-Ras Antikörper analysiert. Weder N- noch H-Ras wurden durch die p16-Reexpression reguliert, wobei H-Ras nur schwach zu erkennen war. Als Kontrolle für den H-Ras Nachweis dienten H-rasN17 transfizierte Capan-1 Zellen.

Da sich in Capan-1 Zellen +/- p16 Veränderungen in der Ras-Expression ursächlich für die Ras-Aktivitätsunterschiede zeigten, erhob sich die Frage, ob auch unter Anokisbedingungen die Expression verändert war. Dazu wurde die Ras-Expression in Capan-1 Zellen, in einem Mock- und einem p16-Klon unter substratabhängigen und -unabhängigen Bedingungen im Western Blot mit dem Pan-Ras Antikörper überprüft. Nach dem Verlust der Matrixkontakte trat jedoch nur ein geringfügiger Anstieg der Ras-Expression in den Kontrollzellen auf, der die starke Zunahme der Aktivität nicht allein verursachen konnte. Die Ras-Expression im p16/3-Klon blieb unverändert (Abb. 14).

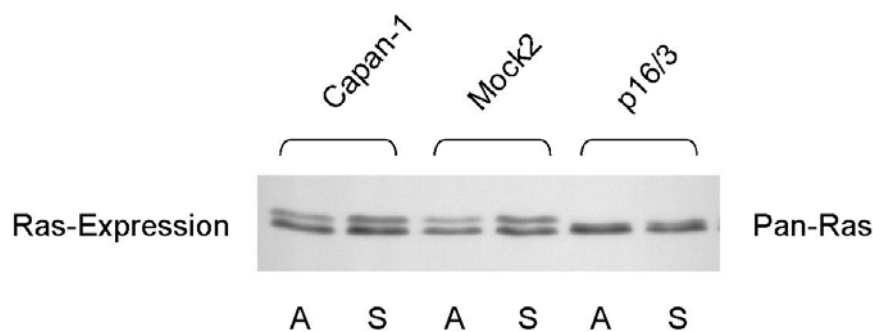


Abb. 14: Die Ras-Expression wird durch Matrixkontakte nur wenig beeinflusst

Capan-1 Kontrollzellen und ein p16-Klon wurden nach 24 Stunden adhärenter (A) oder Suspensions-Kultur (S) in SDS-Puffer lysiert. Je 30 µg Protein wurden in einem 13,5%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und mit einem Pan-Ras Antikörper im Western Blot analysiert. Nach Substratverlust erhöhte sich die Ras-Expression in Capan-1 und Mock2 Zellen nur wenig, im p16/3-Klon änderte sie sich nicht.

Zusammenfassend führte die p16-Substitution in den Capan-1 Zellen also zu einer ausgeprägten spezifischen und selektiven Reduktion der K-Ras Expression und Aktivität. Diese Befunde sind mit einer funktionellen Rolle von K-Ras in der Anokisregulation

humaner Pankreaskarzinom-Zellen vereinbar und legen eine Beteiligung der Ras-Inhibition an der Restitution von Anoikis in den p16 exprimierenden Capan-1 Zellen nahe.

3.4. K-Ras Inhibition in Capan-1 Zellen

Zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der K-Ras Regulation bei p16-vermittelter Anoikis wurden zwei Ansätze verfolgt:

1. K-Ras Inhibition in Capan-1 Zellen
2. K-Ras Reexpression in Capan-1/p16 Zellen.

Wenn K-Ras in Capan-1 Zellen Anoikisresistenz verursacht, sollte eine Inhibition dieser Isoform in den Zellen, wie in p16-transfizierten Capan-1 Klonen beobachtet, die Anoikis-Sensitivität wiederherstellen können.

3.4.1. K-Ras in Capan-1 Zellen ist nicht durch den Ras-Inhibitor FTS zu inhibieren

Die pharmakologische Inhibition von onkogenem K-Ras ist mit den üblicherweise verwendeten Ras-Inhibitoren, Hemmern der Farnesyltransferase, nicht möglich. Durch den Einsatz von FTS (S-trans,trans-Farnesylthiosalicylsäure), einer Substanz, die prenylierte Protein-Methyltransferase inhibiert, konnte jedoch in K-Ras (V12) transfizierten Mausfibroblasten eine Inhibition erreicht werden (Elad et al., 1999). Diese Art der Inhibition erleichtert den Abbau des Ras-Proteins (Marom et al., 1995; Marciano et al., 1995; Elad et al., 1999), so dass die Inhibition also an einer reduzierten Proteinexpression von K-Ras zu erkennen sein sollte. So wurde FTS in einem ersten Ansatz zur Inhibition von K-Ras in der Zelllinie Capan-1 verwendet. Nach Konzentrations- und Zeittests wurden Capan-1 Zellen für drei bzw. fünf Tage mit 200 μ M FTS oder zur Kontrolle mit DMSO inkubiert. Aus den Zellen wurden zuerst Proteinlysate mit einem wenig stringenten Tween-Puffer gewonnen, und die verbleibenden membrangebundenen Proteine wurden in SDS-Puffer gelöst, um eine mögliche Abnahme des aktiven, membrangebundenen K-Ras gut erkennen zu können. Die Ras-Expression der Zelllysate wurde im Western Blot mit einem Pan-Ras Antikörper detektiert (Abb. 15).

Die Isoform K-Ras (obere Bande) ist in Capan-1 Zellen hauptsächlich im SDS-Lysat detektierbar, d.h. der Großteil scheint membrangebunden zu sein. Die Bande wird jedoch auch nach fünf Tagen Inkubation mit FTS kaum schwächer, während eine oder mehrere andere Isoformen schon nach drei Tagen - und nach fünf Tagen noch stärker - inhibierbar sind. Da höhere FTS-Konzentrationen und längere Inkubationszeiten aus Gründen der

Zytotoxizität nicht gewählt werden konnten und schon die gewählten Bedingungen weit über den Literaturangaben lagen (Elad et al., 1999), war eine ausreichende Inhibition von K-Ras in Capan-1 Zellen durch den Inhibitor FTS nicht möglich.

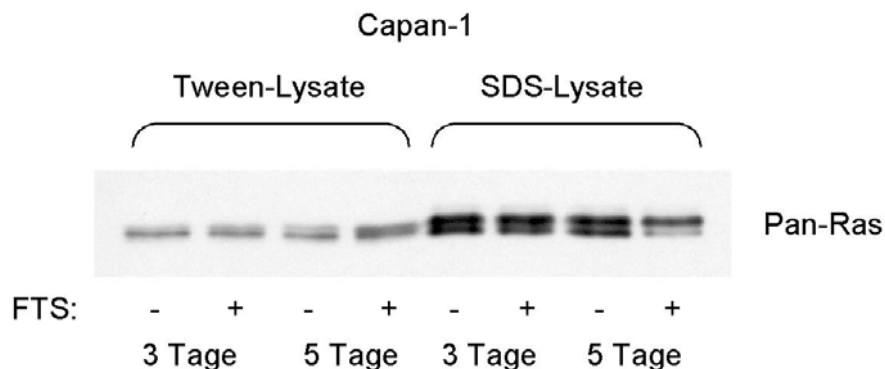


Abb. 15: Die K-Ras Expression in Capan-1 Zellen ist durch FTS nicht relevant reduzierbar

Capan-1 Zellen wurden 3 oder 5 Tage mit 200 μ M FTS (+) oder zur Kontrolle mit 0,2% DMSO (-) inkubiert und in einem Puffer mit 0,1% Tween lysiert. Nicht lösliche Zellbestandteile wurden dann in SDS-Puffer lysiert. Je 50 μ g Protein wurden in einem 13,5%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit einem Pan-Ras Antikörper analysiert. Auch nach 5 Tagen nahm die K-Ras Expression (obere Bande des SDS-Lysates) kaum ab.

3.4.2. Ras-Inhibition durch Antisense-Oligonukleotide restituiert die Anoikis in Capan-1 Zellen

Eine Möglichkeit zur spezifischen Inhibition auf RNA-Ebene ist der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden, der für mutiertes K-ras (12V) in Pankreaskarzinom-Zelllinien bereits erfolgreich beschrieben wurde (Kita et al., 1999). Ausgehend von diesen Angaben wurden für Capan-1 Zellen Konzentrations- und Zeittests mit K-rasV12 Antisense- und zur Kontrolle mit Sense- und Random-Phosphorothioat-Oligonukleotiden durchgeführt, deren Sequenzen in Tabelle 2 aufgeführt sind.

Tab. 2: Oligonukleotid-Sequenzen

Oligonukleotid	Sequenz (17mer)
Random	GAT GCG GTT GTC CAC GA
K-rasV12 Sense	TGG AGC TGT TGG CGT AG
K-rasV12 Antisense	CTA CGC CAA CAG CTC CA

Das Antisense-Oligonukleotid sollte dabei spezifisch nur K-ras mRNA mit der Punktmutation GGT→GTT in Codon 12 inhibieren, die zur Translation in Valin statt Glycin führt. Capan-1

Zellen wurden mit jeweils 5 μM Oligonukleotiden transfiziert und für fünf Tage mit den Oligonukleotiden inkubiert, da erst nach diesem langen Zeitraum eine Reduktion der Ras-Expression zu beobachten war. Nach drei Tagen konnte noch keine Inhibition festgestellt werden. Die Ras-Proteinexpression der behandelten Capan-1 Zellen wurde im Western Blot, die Apoptoserate zur Bestimmung der Anoikisfraktion nach weiteren 24 Stunden Wachstum adhärent oder in Suspension im FACS analysiert. Die Ergebnisse für die fünftägige Behandlung sind in Abb. 16 dargestellt. Nach Transfektion der K-rasV12 Antisense-Oligonukleotide, nicht aber der Kontroll-Oligonukleotide (Random und Sense) in Capan-1 Zellen war eine Reduktion des gesamten Ras-Gehaltes der Zellen zu beobachten (Abb. 16 A). Gleichzeitig wiesen diese Kulturen eine signifikant erhöhte Anoikisrate auf (Abb. 16 B).

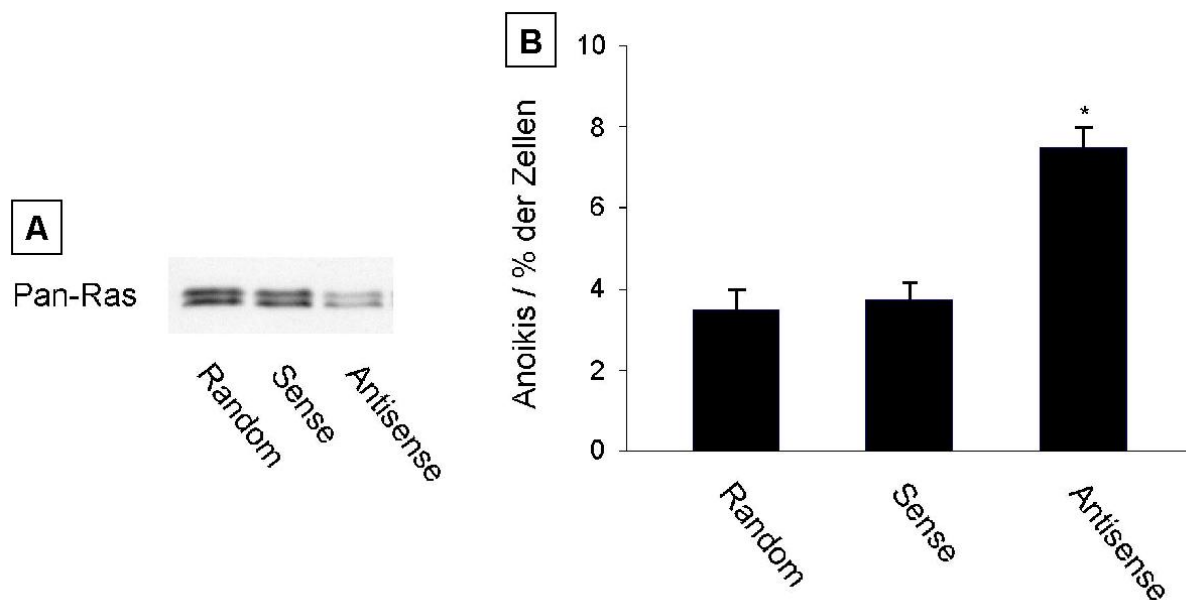


Abb. 16: Ras-Inhibition in Capan-1 Zellen erhöht die Anoikisrate

Capan-1 Zellen wurden nach der Transfektion von 5 μM Random-, K-rasV12 Sense- oder Antisense-Oligonukleotiden 5 Tage damit inkubiert. A: SDS-Lysate der Zellen (14,5 μg Protein) wurden in einem 13,5%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit einem Pan-Ras Antikörper analysiert. B: Die Zellen wurden weitere 24 Stunden adhärent oder in Suspension kultiviert, mit Propidiumiodid gefärbt und einer FACS-Analyse unterzogen. Hier ist der Anteil der Zellen in Anoikis aus 4 unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Ras-Inhibition durch das K-rasV12 Antisense-Oligonukleotid erhöhte die Anoikisrate signifikant ($p < 0,01$).

Dabei machten sich unter adhärennten Bedingungen antiproliferative und proapoptotische Wirkungen der Antisense-Oligonukleotide deutlich bemerkbar. Diese Nebenwirkungen verhinderten auch eine Bestätigung der Ergebnisse durch die stabile Transfektion eines klonierten K-rasV12 Antisense-Plasmides, da damit transfizierte Capan-1 Zellen kaum überlebensfähig waren (Daten nicht gezeigt). Trotz der experimentellen Limitation belegt die Ras-Inhibition durch K-rasV12 Antisense-Oligonukleotide in Verbindung mit der selektiven

K-Ras Aktivität (vergl. Abb. 11) jedoch schon eine Beteiligung von onkogenem K-Ras am anoikisresistenten Phänotyp der humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie Capan-1.

3.5. K-ras Restitution in Capan-1/p16 Zellen

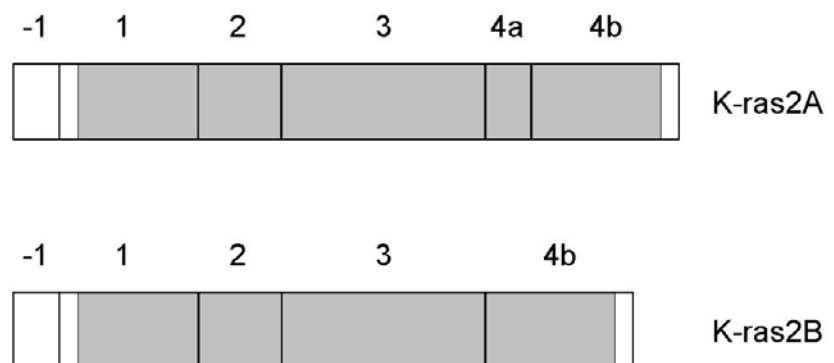
Im zweiten funktionellen Ansatz sollte überprüft werden, ob auch umgekehrt K-rasV12 Reexpression in Capan-1/p16 Zellen die Anoikissensitivität wieder verringern konnte. Dafür wurden K-rasV12 Sense Plasmide zur stabilen Transfektion eines p16-Klons hergestellt. Im folgenden wird das onkogene K-ras der Capan-1 Zellen zumeist ohne die nähere Bezeichnung der Punktmutanten (V12) erwähnt.

3.5.1. Klonierung der K-rasV12 Sense Konstrukte

Humanes K-ras kommt in den zwei verschiedenen Spleißformen K-ras2A und K-ras2B vor, die sich durch ein zusätzliches Exon 4A in K-ras2A unterscheiden (Abb. 17). In 98% der Fälle wird das K-ras2B Transkript hergestellt (Lowy und Willumsen, 1993). Die in Capan-1 Zellen vorliegende Punktmutation GGT→GTT in Codon 12 betrifft beide Spleißformen, deren Verteilung in den Zellen aber bisher nicht untersucht war.

Abb. 17: cDNA der Spleißformen K-ras2A und K-ras2B

K-ras2A besteht aus 6, K-ras2B nur aus 5 Exonen, da in der zweiten Variante Exon 4A fehlt. Kodierende Bereiche sind grau unterlegt.



Durch eine RT-PCR mit zwei Primern, die den ganzen kodierenden Bereich des onkogenen K-ras einschließen, konnte sowohl K-ras2A mRNA als auch K-ras2B mRNA in Capan-1 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 18). Beide Spleißformen wurden also in Capan-1 Zellen exprimiert, wobei wie erwartet K-ras2B trotz der geringeren Anzahl an Nukleotiden deutlich stärker zu sehen war.

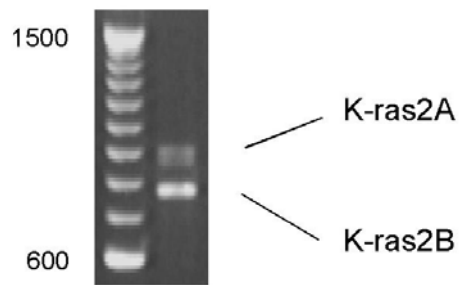
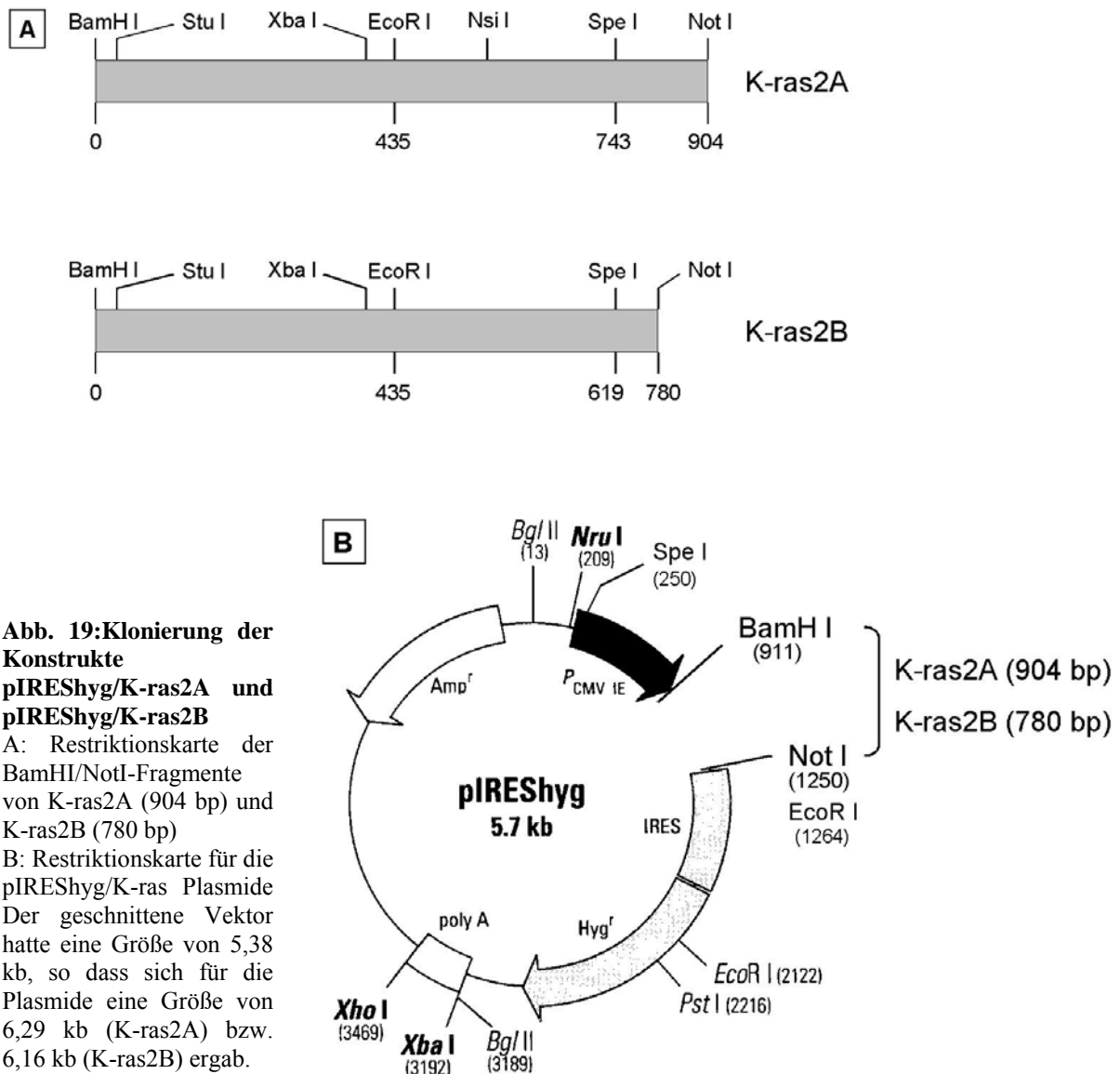


Abb. 18: Capan-1 Zellen exprimieren mRNA von K-ras2A und K-ras2B

Die mRNA der K-ras Spleißformen in Capan-1 Zellen wurde durch RT-PCR nachgewiesen. Auf einem 1%igen Agarosegel waren die cDNA-Fragmente von K-ras2A mit 897 Basenpaaren und K-ras2B mit 773 Basenpaaren durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht zu sehen. Die K-ras2B Bande erschien deutlich stärker. Links: 100-Basenpaar-Standard

Zur Substitution von K-ras in Capan-1/p16 Zellen wurde die onkogene K-ras mRNA beider Varianten aus Capan-1 Zellen zur Klonierung verwendet. Dazu wurden die gleichen Primer, jedoch mit passenden Enden für die Restriktionsschnittstellen BamH I und Not I (mit Überhang) eingesetzt. Nach der RT-PCR mit diesen Primern und der mit großer Genauigkeit arbeitenden Polymerase Pfu I wurden die K-ras Fragmente im Agarosegel aufgetrennt, daraus mit einem PCR Purification Kit isoliert und BamH I / Not I geschnitten. Der Vektor pIRESHyg (Clontech) wurde nach der Restriktion mit BamH I und Not I wie die Fragmente aus der Auftrennung im Agarosegel mit einem Qiaquick Gel Extraction Kit aufgereinigt und dann mit den K-ras Fragmenten ligiert (Abb. 19). Der Vektor pIRESHyg hat den Vorteil, dass das Insert durch eine IRES-Domäne („internal ribosome entry site“) direkt mit dem Resistenzgen für Hygromycin verbunden ist, so dass selektionierte Klone das insertierte Gen mit hoher Wahrscheinlichkeit exprimieren.



Nach der Vermehrung in *E. coli* Zellen und der Plasmidisolierung wurden die Konstrukte in Restriktionsansätzen auf den korrekten Einbau der K-ras Fragmente kontrolliert. Die Restriktion mit der Restriktionsendonuklease Spe I ergab bei korrekten Klonen wie vorher berechnet zwei Fragmente mit 4,9 kb und 1401 bp (K-Ras2A) bzw. 4,9 kb und 1277 bp (K-ras2B). Da die beiden Spleißformen im Agarosegel nicht vollständig voneinander getrennt werden konnten und viel mehr K-ras2B vorhanden war, enthielten einige der vermuteten K-ras2A Klone die kürzere Spleißform B. Aber „echte“ K-ras2A Klone konnten auch identifiziert werden (Abb. 20). Nummer 17 wurde als K-ras2A und Nummer 8 als K-ras2B Klon ausgewählt, mit denen weiter gearbeitet wurde. Mit BamHI/NotI- und EcoRI-Kontrollschnitten wurde die Richtigkeit der Konstrukte bestätigt (Daten nicht gezeigt). Aus Kostengründen wurde auf eine Sequenzierung der Klone verzichtet. Für die Transfektionen wurde aus den Klonen Nummer 8 und 17 Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab isoliert.

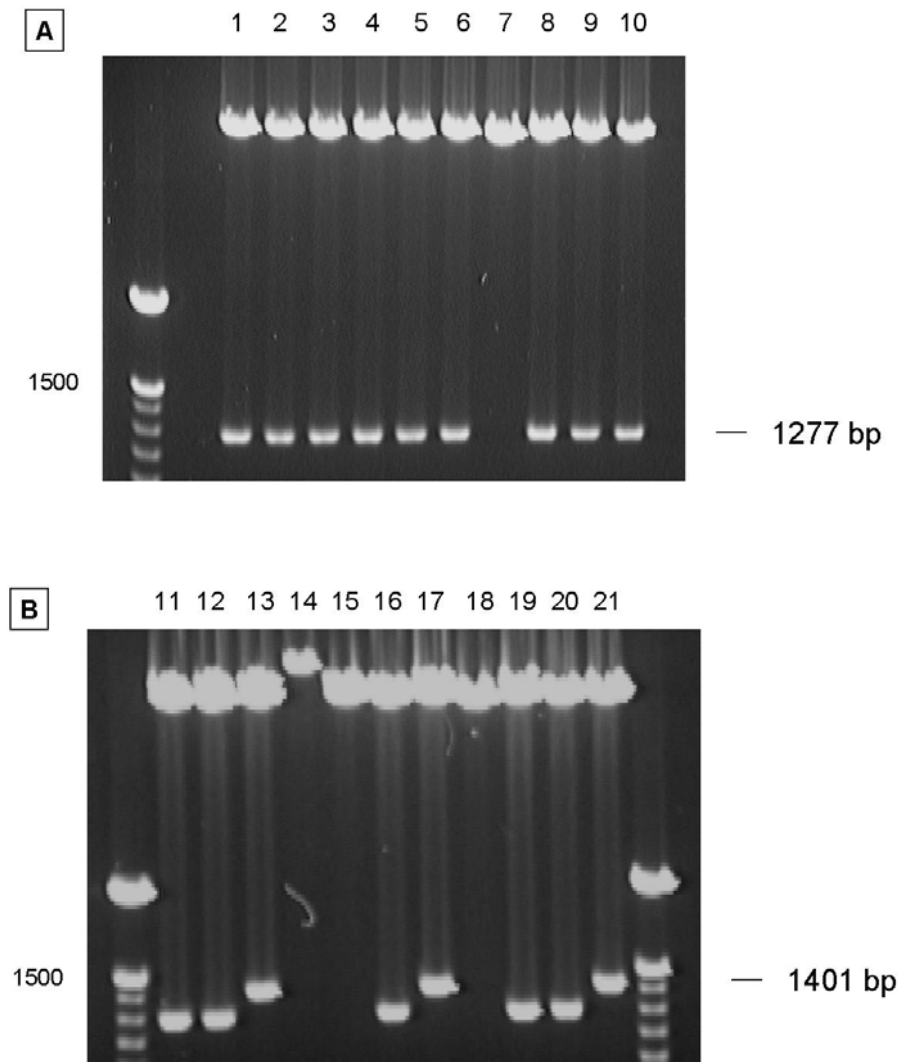


Abb. 20: Überprüfung der pIRESHyg/K-ras Klone durch Restriktion mit Spe I

Restriktionsfragmente des Verdau mit Spe I von den pIRESHyg/K-ras Klonen 1 bis 21 wurden in 1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Klone mit K-ras2B zeigten Fragmente mit 4,9 kb und 1277 bp (A und zum Teil in B), Klone mit K-ras2A zeigten Fragmente mit 4,9 kb und 1401 bp (3 Klone in B). Jeweils links bzw. rechts außen: 100-Basenpaar-Standard

3.5.2. Semi-stabile Transfektion von K-ras2A und K-ras2B in Capan-1/p16 Zellen

Um in kurzer Zeit eine Aussage über die Wirkung der K-rasV12 Substitution zu erhalten, wurde der Capan-1 Klon p16/3 semi-stabil mit den Plasmiden pIRESHyg/K-ras2A und pIRESHyg/K-ras2B transfiziert. Zwei Tage nach dem Liposomen-Transfer der Plasmide in p16/3 Zellen wurden die Populationen passagiert und mit Hygromycin unter Selektionsdruck gesetzt. Drei bis vier Wochen nach Selektionsbeginn wurden die Mischpopulationen auf ihre Ras-Expression im Western Blot und ihr Anoikisverhalten per Durchflusszytometrie getestet. SDS-Lysate von zwei unabhängigen p16/3 Populationen, die mit dem Vektor pIRESHyg transfiziert worden waren, von den p16/K-ras2A und p16/K-ras2B Transfektanten und von

pIRESHyg transfizierten Capan-1 Zellen wurden hinsichtlich ihrer Ras-Expression im Western Blot analysiert (Abb. 21). In K-ras transfizierten p16-Zellen war die Expression des K-Ras Proteins stärker nachweisbar als in den p16-Vektorkontrollen, jedoch in geringerer Menge als in Capan-1 Zellen. Im Pan-Ras Blot war sogar eine Unterscheidung der beiden Spleißvarianten möglich: Die Bande von K-Ras2A lag höher als die K-Ras2B Bande, wobei letztere genau auf der Höhe des K-Ras in Capan-1 Zellen erschien. Daher erscheint naheliegend, dass K-Ras2B eine weitaus größere Rolle in Capan-1 Zellen spielt als K-Ras2A.

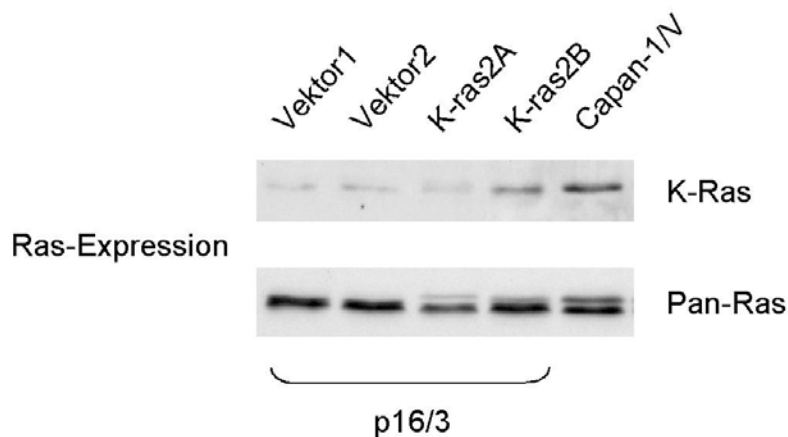


Abb. 21: Ras-Expression der Capan-1/p16/K-ras Mischpopulationen

Je 30 µg Protein von SDS-Lysaten der p16/Vektor-, p16/K-ras2A-, p16/K-ras2B- und Capan-1/Vektor-(V-) Populationen wurden in einem 13,5%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit einem K-Ras und einem Pan-Ras Antikörper analysiert. Beide K-Ras Spleißformen waren nachweisbar, wobei K-Ras2B und das K-Ras der Capan-1 Zellen (Capan-1/V) auf gleicher Höhe, die K-Ras2A Variante jedoch oberhalb dieser beiden zu finden war. K-Ras2B war besser mit dem K-Ras Antikörper und K-Ras2A besser mit dem Pan-Ras Antikörper zu detektieren.

Zur Bestimmung der Apoptoseraten wurden substratabhängig und –unabhängig kultivierte p16/Vektor und p16/K-ras transfizierte Zellen einer Analyse des DNA-Gehaltes im FACS unterzogen. Da die Apoptosewerte der Mischpopulationen größere Schwankungen zeigten, wurden hier die Apoptoseraten der K-ras Zellen bezogen auf die Kontrollen für zwei unabhängige Experimente dargestellt (Abb. 22). Unter adhärennten Bedingungen verursachte die K-ras Transfektion, sowohl der Variante A als auch B, eine zum Teil erhebliche Steigerung der Apoptoseraten. Dennoch ließ sich unter Suspensionsbedingungen bei beiden Spleißformen eine deutliche Abnahme der Apoptosefraktion im Vergleich zu p16/Vektor-Transfektanten erkennen. Somit konnte trotz proapoptotischer Effekte der K-rasV12 Transfektion gezeigt werden, dass die Substitution von onkogenem K-ras in Capan-1/p16 Zellen die Anoikis reduzierte.

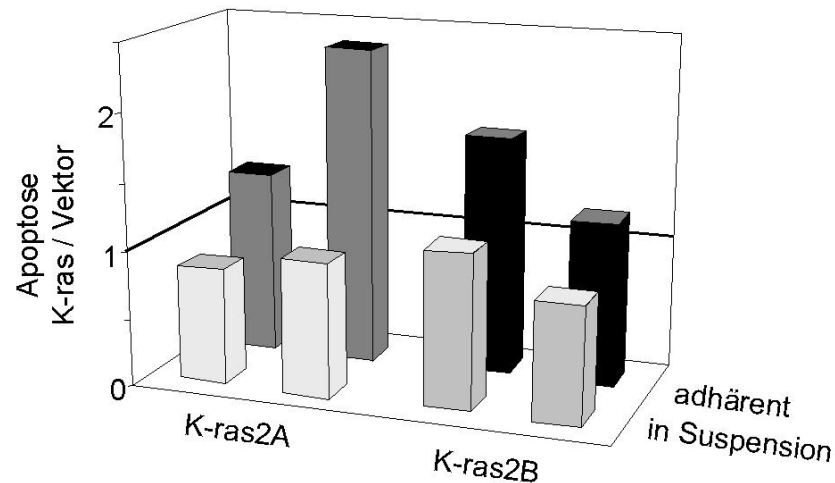


Abb. 22: Die K-ras Restitution in Capan-1/p16 Zellen verringert die Apoptoserate in Suspension

Capan-1/p16/Vektor und Capan-1/p16/K-ras Mischpopulationen wurden 24 Stunden adhärent oder in Suspension kultiviert, mit Propidiumiodid gefärbt und im FACS analysiert. Die Apoptoseraten im Verhältnis K-ras zu Vektor sind für zwei unabhängige Experimente gezeigt. In adhärennten Kulturen erhöhte sich die Apoptoserate (> 1), in Suspensionskulturen verringerte sie sich deutlich (< 1) mit K-ras2A/2B.

3.5.3. Stabile Transfektion von K-ras2A und K-ras2B in Capan-1/p16 Zellen

Um die Bedeutung der K-Ras Regulation bei der p16-vermittelten Anoikis genauer definieren zu können, wurden stabil transfizierte K-ras/p16 Einzelklone für weitere Untersuchungen generiert. Wie bei der semi-stabilen Transfektion wurden p16/3 Zellen transfiziert und unter Selektionsdruck gesetzt. Die Zellen wurden aber in höherer Verdünnung ausgesät und kultiviert, bis einzelne Klone heranwuchsen. Nach 10 Tagen wurden die Klone separiert, ca. neun Wochen in Kultur vermehrt und im Western Blot mit einem Pan-Ras Antikörper auf ihre Ras-Expression getestet (Abb. 23). Im Gegensatz zu den p16-Kontrollklonen wiesen die meisten K-ras Transfektanten eine deutliche Expression von K-Ras auf, die unterschiedlich stark, oft aber erheblich höher war als in der Ausgangszelllinie Capan-1 (hier: mit pIRESHyg kontrolltransfizierte Capan-1 Zellen Capan-1/Vektor). Für die anschließenden Untersuchungen wurden Klone mit verschiedenem K-Ras Gehalt ausgewählt, mindestens aber mit der Capan-1/Vektor entsprechenden Expression. Im folgenden wird die Charakterisierung dreier K-ras Klone im Vergleich zu Capan-1 bzw. Capan-1/p16 Kontrollzellen beschrieben.

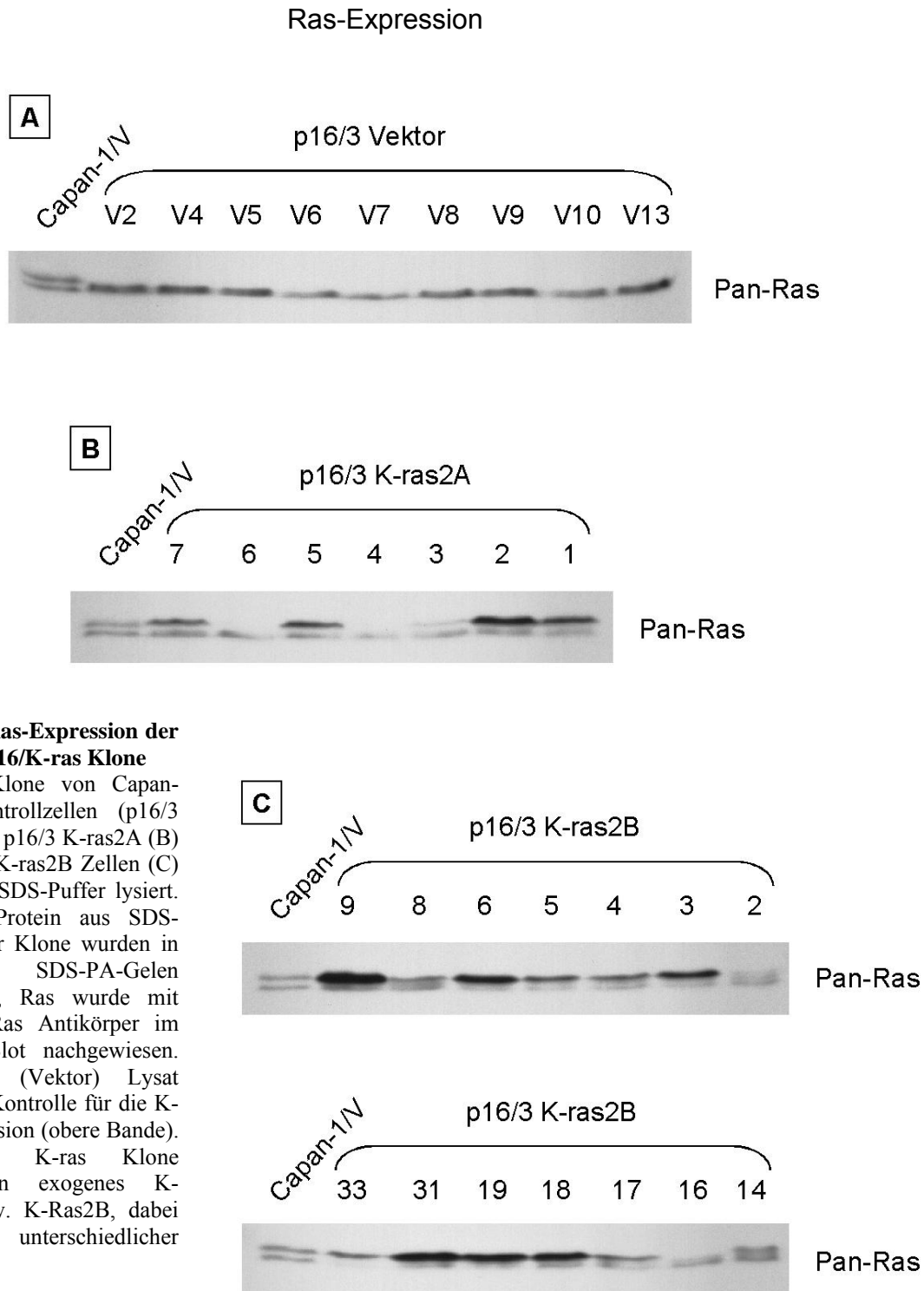


Abb. 23: Ras-Expression der Capan-1/p16/K-ras Klone

Einzelne Klone von Capan-1/p16 Kontrollzellen (p16/3 Vektor, A), p16/3 K-ras2A (B) und p16/3 K-ras2B Zellen (C) wurden in SDS-Puffer lysiert. Je 50µg Protein aus SDS-Lysaten der Klone wurden in 13,5%igen SDS-PA-Gelen aufgetrennt, Ras wurde mit dem Pan-Ras Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Capan-1/V (Vektor) Lysat diente als Kontrolle für die K-Ras Expression (obere Bande). Fast alle K-ras Klone exprimierten exogenes K-Ras2A bzw. K-Ras2B, dabei aber in unterschiedlicher Menge.

3.5.4. Charakterisierung der Capan-1/p16/K-ras Klone

Mehrere K-ras2A und K-ras2B Klone wurden mit dem „RBD Pull-Down Assay“ auf ihre Ras-Aktivität untersucht, die meistens mit der K-Ras Expression korrelierte. Da, wie vorher gezeigt, nur Protein der Spleißvarianten B in Capan-1 Zellen gefunden wurde, wurden die

drei K-ras2B Klone 4, 6 und 9 näher charakterisiert. Ihre K-Ras Aktivität wurde nach dem RBD Assay mit einem K-Ras Antikörper im Western Blot detektiert (Abb. 24). Wie bereits gezeigt führte die p16-Reexpression in Capan-1 Zellen zum Verlust der K-Ras Aktivität. Im Gegensatz hierzu war in K-ras substituierten Capan-1/p16 Zellen wiederum K-Ras Aktivität nachweisbar, die leicht erhöht (K-ras4 und K-ras6) bzw. deutlich stärker (K-ras9) erschien gegenüber den Ausgangszellen Capan-1 und Capan-1/Mock, der pRC_{CMV}- Kontrolle für die p16-Transfektion.

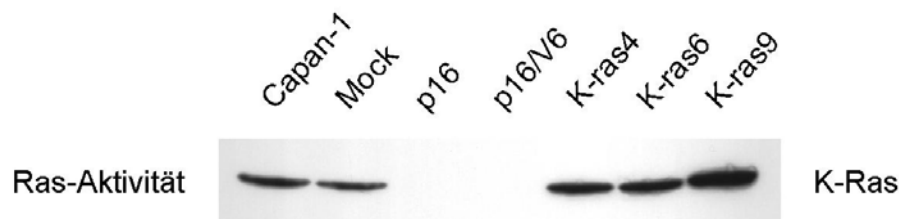


Abb. 24: K-Ras Aktivität der Capan-1/p16/K-ras Klone

Capan-1, Capan-1 Kontrollzellen (Mock pRC_{CMV}), der pRC_{CMV}/p16-Klon 3, der p16/pIRESHyg Kontrollklon V6 und die drei p16/K-ras2B transfizierten Klone 4, 6 und 9 wurden in MLB lysiert. Aktives Ras wurde aus je 640 µg Protein mit dem RBD „Pull-Down Assay“ präzipitiert, in einem 13,5%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit einem K-Ras Antikörper nachgewiesen. Alle drei K-ras Klone zeigten K-Ras Aktivität, die zum Teil erheblich höher war als die der Ursprungszellen Capan-1.

An den ausgewählten Klonen wurden wichtige Parameter des Capan-1 Modellsystems überprüft: pRb, p16 und andere Ras-Isoformen. Sie sind im Expressionsprofil des Western Blots zu sehen (Abb. 25). Durch die K-ras Substitution veränderten sich die für Capan-1/p16 Zellen typischen Expressionsparameter nicht. Im Gegensatz zu Capan-1 Kontrollen war in den K-ras Transfektanten wie in Capan-1/p16 keine pRb-Expression festzustellen, während das p16-Protein der Ersttransfektion auch weiterhin exprimiert wurde, sogar etwas mehr als in Capan-1/p16 Kontrollzellen. Die unveränderte N-Ras Expression zeigte, dass durch die K-ras Transfektion spezifisch die Kirsten-Isoform reguliert wurde ohne Auswirkungen auf nahe verwandte Ras-Varianten.

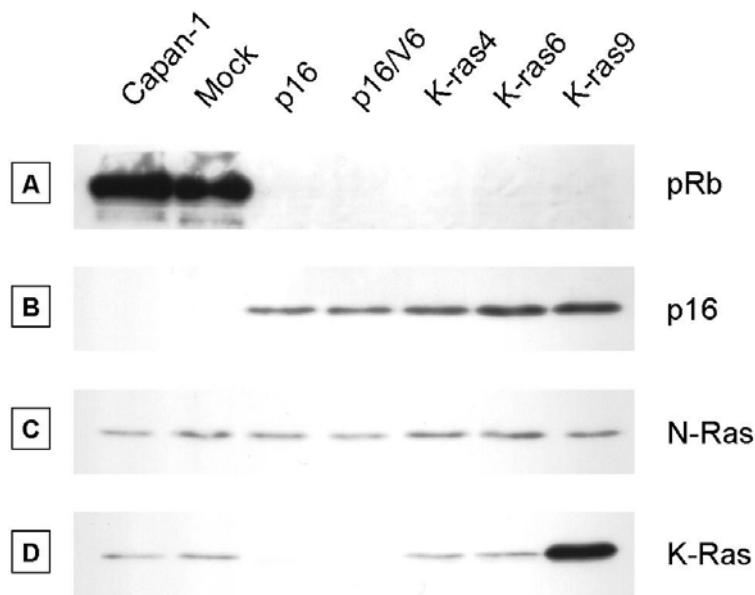


Abb. 25: Expressionsparameter der Capan-1/p16/K-ras Klone

Capan-1- und Capan-1/p16-Kontrollzellen und die drei p16/K-ras Klone wurden in SDS-Puffer lysiert. Je 30 µg Protein wurden in 13,5%igen SDS-PA-Gelen aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western Blot analysiert. Die p16/K-ras Klone blieben wie die p16-Zellen pRb-negativ (A) und p16-positiv (B). Die N-Ras Expression änderte sich nicht (C), während K-Ras durch die Zweittransfektion mindestens das Expressionsniveau der Ausgangszelllinie Capan-1 erreichte (D).

3.5.5. K-ras Substitution in Capan-1/p16 Zellen reduziert die Anoikissensitivität signifikant

Zur Untersuchung der Anoikissensitivität wurden Capan-1 und Capan-1/p16 Kontrollen und p16/K-ras Klone 24 Stunden adhärent oder in Suspension kultiviert und durchflusszytometrisch im FACS analysiert. Schon bei mikroskopischer Inspektion waren Unterschiede zu erkennen. Capan-1/p16 Zellen bildeten in Suspension zum Teil große Zellkomplexe, bei denen einzelne Zellen nicht mehr zu erkennen waren. Dagegen führte die K-ras Substitution dazu, dass die Zellen einzeln unterscheidbar in lockeren Verbänden zu beobachten waren (Abb. 26).

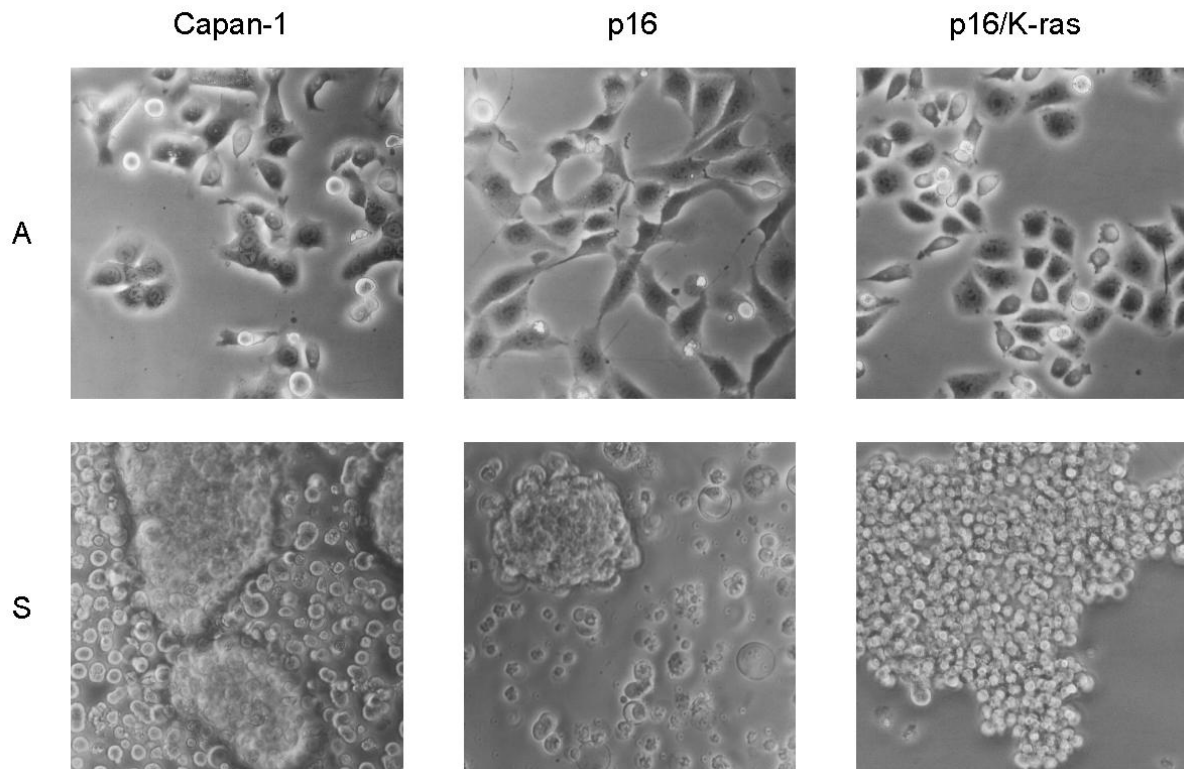


Abb. 26: Änderung der Morphologie in Suspension durch die K-ras Reexpression in Capan-1/p16 Zellen
 Capan-1, Capan-1/p16 und p16/K-ras Zellen wurden nach 24 Stunden adhärenter (A) oder Kultur in Suspension (S) in 40facher Vergrößerung im Mikroskop fotografiert. Hier sind repräsentative Bilder gezeigt. Während die adhärenter p16/K-ras Zellen im Laufe der Kultur im Erscheinungsbild uneinheitlich waren, zeigten alle K-ras Klone in Suspension die flächige Verteilung der Zellverbände im Gegensatz zu der Haufenbildung in p16- und auch Capan-1 Zellen. Die Zellhaufen der Capan-1 Kontrollzellen erschienen dabei heller als die der p16-Klone.

Die Quantifizierung der Apoptosefraktionen bestätigte die Ergebnisse der semi-stabilen Transfektion, doch hier in der Analyse der p16/K-ras Einzelklone mit Signifikanz. Nachdem die Ersttransfektion von p16 in Capan-1 Zellen die Anoikissensitivität normaler Pankreaszellen wiederhergestellt hatte, konnte mit der Zweittransfektion von K-ras die Anoikisresistenz der Capan-1 Zellen restituiert werden. Sowohl K-Ras2A als auch K-Ras2B verursachten deutlich Anoikisresistenz. Hier gezeigt ist wieder die Auswahl an K-ras2B Klonen Nummer 4, 6 und 9 (Abb. 27).

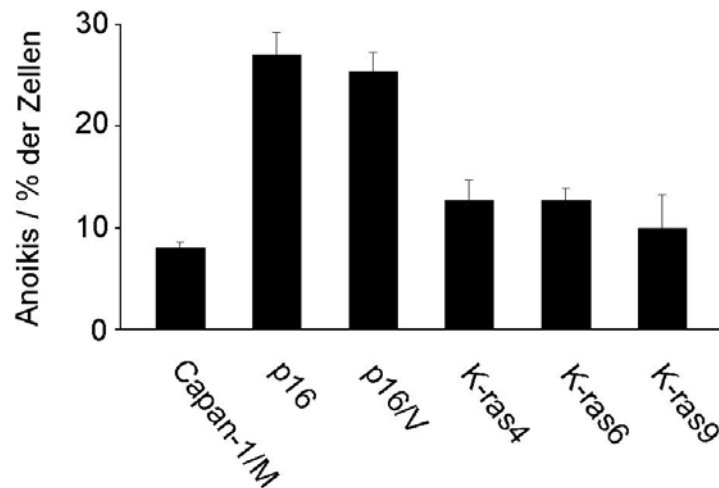


Abb. 27: Die K-ras Restitution in Capan-1/p16 Zellen reduziert die Anoikis-Sensitivität signifikant

Capan-1 bzw. Capan-1/Mock Zellen (Capan-1/M), Capan-1/p16-Kontrollzellen (p16 und p16/Vektor) und die drei p16/K-ras Klone 4, 6 und 9 wurden 24 Stunden adhären oder in Suspension kultiviert, mit Propidiumiodid gefärbt und im FACS analysiert. Der Anteil der Capan-1 Zellen in Anoikis stieg mit p16 um das Dreifache und reduzierte sich durch die K-ras Zweittransfektion wieder um mehr als 50% ($n=3$, $p < 0,05$).

3.5.6. K-ras Substitution in Capan-1/p16 Zellen restituiert klonales Wachstum in Soft-Agar

Ein typisches Merkmal von transformierten Zellen ist die Fähigkeit, Kolonien in Soft-Agar zu bilden. Capan-1 und Capan-1/p16 Kontrollzellen und die p16/K-ras Klone 4, 6 und 9 wurden zwölf Tage in einem Methylzellulose/0,5%Agar-Mix kultiviert, bevor die gebildeten Kolonien gezählt wurden. Hier konnte bestätigt werden, dass sich die Koloniebildung durch die p16-Reexpression im Vergleich zu Capan-1 Kontrollzellen erheblich reduzierte (Plath et al., 2000). Erstmals wurde darüber hinaus in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die K-ras Substitution in Capan-1/p16 Zellen die Fähigkeit zur Koloniebildung wiederherstellte, von p16/K-ras Klonen zum Teil sogar deutlich mehr Kolonien gebildet wurden als von der Ursprungszelllinie Capan-1 (Abb. 28). Auf die Kontrollen Capan-1 und Capan-1/Mock bezogen verringerte sich die Zahl der Kolonien pro 1000 Zellen um den Faktor 2,4 bei Capan-1/p16 und p16/K-ras Kontrollzellen, wohingegen die Koloniebildung in den K-rasB Klonen 4 und 6 um den Faktor 1,3 bzw. 1,5 anstieg. Der K-rasB9 Klon mit sehr hoher K-Ras Aktivität bildete viele kettenartige, sehr kleine Kolonien, die unterhalb der Zählgrenze lagen. So entsprach hier die Anzahl der Kolonien in etwa der der Ausgangszellen Capan-1/(Mock).

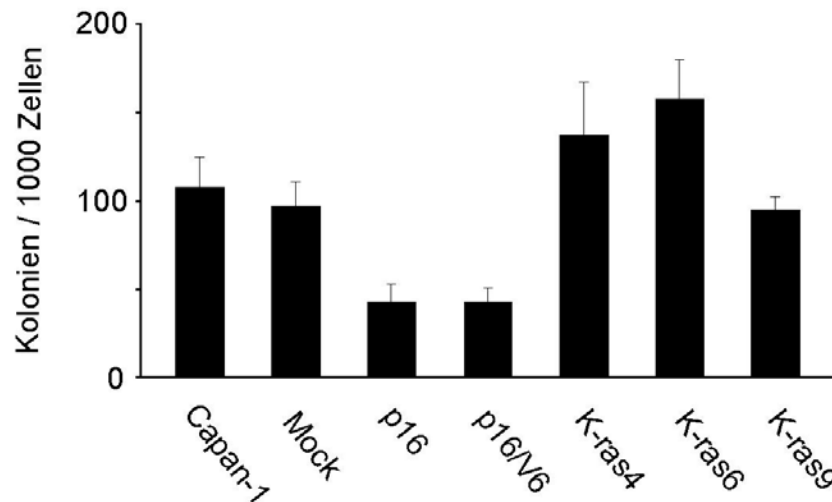


Abb. 28: Die K-ras Reexpression stellt die Fähigkeit des Capan-1/p16 Klons zur Koloniebildung in Soft-Agar wieder her

Capan-1- und Capan-1/p16-Kontrollzellen und die drei p16/K-ras Klone 4, 6 und 9 wurden je dreimal in Soft-Agar ausgesät und 12 Tage darin kultiviert. Alle Kolonien ab etwa 10 Zellen wurden gezählt. Die durch die p16-Transfektion in Capan-1 Zellen reduzierte Anzahl der Kolonien pro 1000 Zellen steigerte sich nach der K-ras Substitution wieder signifikant ($n=4$; $p < 0,05$).

3.5.7. Der p16-vermittelte Verlust der Tumorigenität wird durch die K-ras Reexpression in Capan-1/p16 Zellen nicht beeinflusst

Da die Fähigkeit zur Koloniebildung in Soft-Agar durch die K-ras Reexpression in Capan-1/p16 Zellen wiederhergestellt werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass die Zellen auch ihre Tumorigenität in vivo wiedererlangt hatten. Zur Überprüfung der Tumorigenität wurden je 5×10^5 Zellen der ausgewählten Klone (wie 3.5.6.) bzw. Capan-1 Zellen subkutan in die rechte Flankenregion von NMRI-nu/nu Mäusen injiziert. Pro Zelllinie wurden 8 Mäuse verwendet, das Experiment wurde einmal durchgeführt. Während Capan-1 und Capan-1/Mock Zellen Tumore bildeten, war auch 16 Wochen nach der Inokulation sowohl bei Capan-1/p16 Zellen als auch bei den K-ras Transfektanten keine Tumorbildung festzustellen (Tab. 3). Dabei kam es bei Capan-1 Zellen meist schon nach 7 Tagen zur Bildung von Tumoren, die relativ schnell wuchsen, Capan-1/Mock Zellen hingegen bildeten langsamer wachsende Tumore, zum Teil erst nach 24 Tagen. Bei den ersten Anzeichen ulzerativer Prozesse am Tumor wurde das entsprechende Tier schmerzfrei getötet und der Tumor konserviert.

Tab. 3: Tumorbildung in der Nacktmaus

Zelllinie	Tumorbildung
Capan-1	+
Mock	+
p16	-
p16/V6*	-
K-ras4	-
K-ras6	-
K-ras9	-

* Bei 2 von 8 Tieren bildeten sich nach 91 bzw. 112 Tagen unklare Strukturen.

Die vorangegangenen Experimente belegen eine essentielle Funktion der K-Ras Regulation in Capan-1 Zellen sowohl bei der p16-vermittelten Anoikis als auch bei substratunabhängigem Wachstum. Die antitumorogene Wirkung von p16 auf Capan-1 Zellen erschien jedoch durch K-Ras nicht beeinflusst.

3.6. Mechanismus der K-Ras Regulation durch p16 in Capan-1 Zellen

In den folgenden Experimenten wurde der Frage nachgegangen, auf welche Weise es zu einer Reduktion der K-Ras Expression in p16-restituierten Capan-1 Zellen kommen konnte. Außer einer möglichen transkriptionellen war eine Regulation auf post-translationaler Ebene denkbar, die zu einem beschleunigten Abbau von K-Ras führen könnte.

3.6.1. K-ras scheint nicht transkriptionell reguliert in Capan-1 Zellen -/+p16

Zum Vergleich der Transkriptionsraten von K-ras in Capan-1 und Capan-1/p16 Zellen wurden „Nuclear Run-Off“ Experimente durchgeführt. Dazu wurden die Kerne der Zellen isoliert, die dann in Gegenwart von radioaktiv markiertem UTP ihre Gene transkribierten. Die markierte mRNA konnte anschließend mit membranfixierter cDNA von K-ras2B bzw. Kontrollen von GAPDH und β -Aktin in einem Slot Blot hybridisiert werden. Da die cDNA im Überschuss eingesetzt wurde, sollte die spezifische mRNA quantitativ gebunden werden und so einen Vergleich der Transkriptionsraten durch Autoradiogramme ermöglichen. Die

Banden des K-ras Transkriptes waren nur relativ schwach erkennbar im Gegensatz zu anderen Transkripten (Beispiel „heat shock protein“ hsp27), (Abb. 29). Beim Vergleich der K-ras mit der mRNA-Synthese der Haushaltsgene GAPDH und β -Aktin konnte innerhalb der drei unabhängigen Experimente kein Unterschied in der Transkription zwischen Capan-1 Zellen -/+p16 festgestellt werden. Die mRNA-Synthese von K-ras schien also durch die p16-Restitution in Capan-1 Zellen unverändert zu sein.

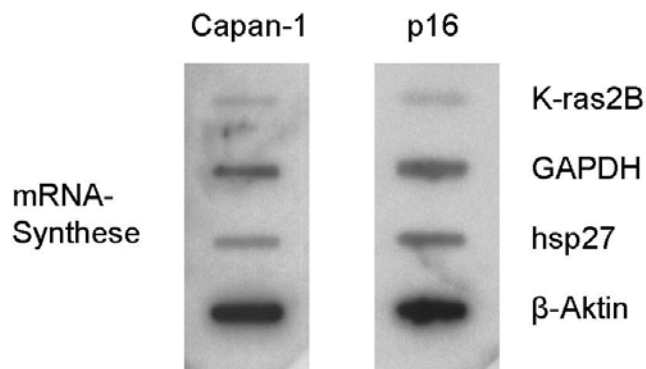


Abb. 29: Die Transkription von K-ras mRNA erscheint unverändert in Capan-1 Zellen -/+ p16.

UTP-markierte Kern-mRNA wurde in einem Slot Blot mit cDNA-Sonden von K-ras2B, hsp27 und zur Kontrolle mit GAPDH und β -Aktin hybridisiert. Es wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt. Die mRNA-Synthese, die mit der K-ras Sonde detektiert wurde, zeigte sich in Capan-1 Zellen und im p16/3-Klon gleich schwach im Vergleich zu den Kontrollen.

Zur Abschätzung des mRNA-Fließgleichgewichtes („steady state level“) wurde eine Duplex RT-PCR für K-ras2A/2B und GAPDH durchgeführt, d.h. beide cDNA-Produkte wurden in einem Ansatz amplifiziert. Bei gleichmäßiger Bandenintensität des Haushaltsgens GAPDH war nicht nur in Capan-1 und Capan-1/Mock Zellen, sondern auch in den p16-Klonen K-ras2B deutlich nachweisbar (Abb. 30). K-ras2A erschien wie bereits gezeigt erheblich schwächer in allen Zelllinien. Da durch die zum Teil relativ starke Intensität der K-ras2B Bande in den p16-Klonen eine Herabregulation höchst unwahrscheinlich war, wurde auf eine Quantifizierung der mRNA-Mengen mittels Northern Blot verzichtet.

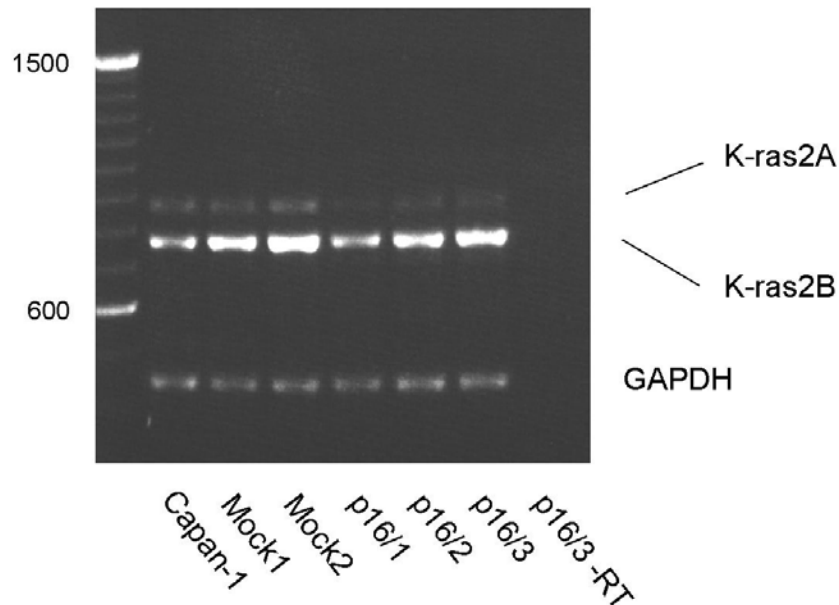


Abb. 30: K-ras2B mRNA ist auch in Capan-1/p16 Klonen deutlich nachweisbar

Nach der reversen Transkription der Gesamt-RNA von Capan-1 Kontrollzellen und 3 Capan-1/p16 Klonen wurde deren cDNA in einer PCR mit 4 Primern, 2 für K-ras und 2 für das Haushaltsgen GAPDH, in einem Ansatz vervielfältigt. Nach der Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel und Ethidiumbromid-Färbung waren alle Produkte nachweisbar, K-ras2A (897 bp) sehr schwach, K-ras2B (773 bp) unterschiedlich stark, auch in den p16-Klonen, und GAPDH (452 bp) gleichmäßig in allen Proben.

3.6.2. Die K-Ras Regulation durch p16 in Capan-1 Zellen ist posttranslational

Da sich keine Anhaltspunkte für eine Regulation von K-ras auf transkriptioneller Ebene ergeben hatten, wurde im weiteren in „Pulse-Chase“ Experimenten die Proteininstabilität des K-Ras Proteins überprüft. Das Gesamt-Protein von Capan-1 Zellen bzw. dem Capan-1/p16 Klon 3 wurde durch den Einbau der Aminosäuren ^{35}S -Methionin und ^{35}S -Cystein radioaktiv markiert („Pulse“). Anschließend wurde die Abbaukinetik bis zu 24 Stunden verfolgt („Chase“), indem zu verschiedenen Zeitpunkten Proteinlysate gewonnen wurden. K-Ras wurde daraus immunpräzipitiert und in einem SDS-PA-Gel autoradiografisch nachgewiesen (Abb. 31). Die synthetisierte Menge von K-Ras zum Zeitpunkt 0 war in den beiden Zelllinien in etwa vergleichbar, im p16-Klon erschien sie sogar etwas größer. Während die ^{35}S -K-Ras Expression in Capan-1 Zellen sich nach 6 Stunden Chase leicht erhöht hatte und nach 12 Stunden auf etwa ein Viertel des Ausgangsgehaltes reduzierte, war sie in Capan-1/p16 Zellen schon nach 6 Stunden kaum mehr nachzuweisen, d.h. das Protein K-Ras wurde nach der p16-Substitution erheblich schneller abgebaut. So beruhte die unterschiedliche Proteinexpression in Capan-1 Zellen +/- p16 ausschließlich auf dem beschleunigten Abbau von K-Ras. Auffällig war ein „Banden-Shift“ der Capan-1 Abbaukinetik im Vergleich zur Synthesebande von K-Ras.

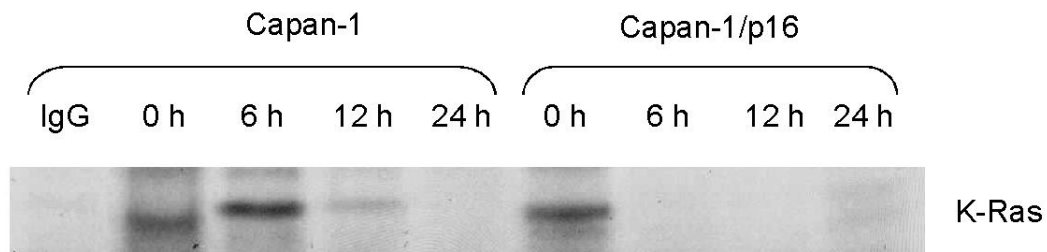


Abb. 31: Die p16-Substitution beschleunigt den Abbau von K-Ras in Capan-1 Zellen

Capan-1 und Capan-1/p16 Zellen wurden 14 Stunden mit einem ^{35}S -Methionin/-Cystein Labeling-Mix markiert, gewaschen und nach 0, 6, 12, und 24 Stunden in MLB lysiert. K-Ras wurde daraus mit einem K-Ras Antikörper präzipitiert, in einem 13,5%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und autoradiografisch detektiert. In p16-substituierten Capan-1 Zellen wird K-Ras erheblich schneller abgebaut als in der Ursprungszelllinie Capan-1.

Da exogenes p16 in Capan-1 Klonen nicht nur im Zellkern, sondern auch zytoplasmatisch vorliegt (Daten nicht gezeigt), wäre die K-Ras Regulation durch eine direkte Assoziation des Zellzyklusinhibitors mit K-Ras möglich. Eine solche Assoziation könnte aber weder in Capan-1 Zellen, die K-Ras, jedoch kein p16 exprimieren, noch in Capan-1/p16 Klonen mit p16-Expression bei mangelndem K-Ras Gehalt nachgewiesen werden.

So wurde in Kopräzipitations-Experimenten die Bindung von K-Ras aus dem überexprimierenden p16/K-rasb9 Klon bzw. als Negativ-Kontrolle aus dem Capan-1 p16/3-Klon an rekombinantes GST-p16 überprüft. Die Detektion ist im Western Blot mit einem K-Ras Antikörper und zur Kontrolle mit einem GST-Antikörper zu sehen (Abb. 32). In dem verwendeten nur wenig stringenten 0,1%Tween-Puffer, der auch zur Präzipitation von CDK4/6 mit p16 genutzt wird (Matsushime et al., 1994), konnte K-Ras aus dem p16/K-ras Klon mit rekombinantem GST-p16 kopräzipitiert werden. Lysate aus diesem Puffer können aber nur wenig membrangebundenes Ras enthalten, so dass trotz Nutzung der hohen K-Ras Expression des p16/K-rasb9 Klones vermutlich auch nur ein kleiner Anteil überhaupt zur Präzipitation zur Verfügung stand. Die unspezifische Bindung von K-Ras an Kontroll-GST, das in molarem Überschuss gegenüber GST-p16 eingesetzt wurde, war sehr gering.

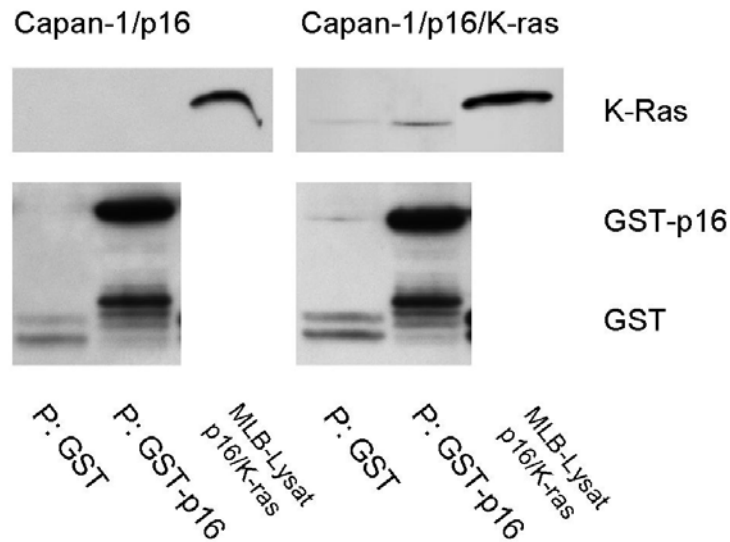


Abb. 32: K-Ras und p16 können kopräzipitiert werden

Je 1 mg Protein aus 0,1%Tween-Lysat des Capan-1/p16/3 bzw. des Capan-1/p16/K-rasb9 Klons wurden mit 1 μ g GST-p16 bzw. zur Kontrolle mit 1 μ g GST inkubiert, das an Glutathion-Agarose gekoppelt war. Die Präzipitate wurden in einem 13,5% SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit einem K-Ras (oben) und nach dem „Stripping“ der Membran mit einem GST-Antikörper (unten) analysiert. K-Ras (21 kDa) konnte aus dem p16/K-ras Klon mit GST-p16 kopräzipitiert werden (rechts), aus dem p16-Kontrollklon dagegen nicht (links). Wegen der sehr unterschiedlichen Proteinmengen in Präzipitat- und Kontrolllysate-Spuren erschien die K-Ras Kontrollbande des MLB-Lysates aus Capan-1/p16/K-rasb9 (jeweils rechts, 15 μ g Protein) etwas höher. GST-p16 und GST hatten eine Größe von 44 kDa bzw. 26-28 kDa. P: Präzipitation

In dem stringenteren Puffer MLB, der mehr Ras-Protein in Lösung bringen sollte, konnte K-Ras kaum nachweisbar mehr kopräzipitiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Assoziation konnte in vorhergehenden Experimenten ebenfalls durch Koimmunpräzipitationen mit einem p16- oder Pan-Ras Antikörper aus Capan-1/Capan-1/p16 Mischlysaten und aus dem p16/K-rasb9 Klon nachgewiesen werden, wobei aber die Ras-Detektion durch nahe liegende Immunglobulin-Banden erschwert war (Daten nicht gezeigt). So geben die vorgestellten Daten trotz der experimentellen Limitation starke Hinweise auf eine direkte Assoziation von K-Ras mit dem Tumorsuppressor p16.

3.7. Onkogenes K-Ras wird auch in anderen Zellsystemen durch p16 reguliert

Bisher wurde die Regulation von K-RasV12 durch p16 am Zellmodell der Capan-1 Zelllinie gezeigt. Hier wurde nun untersucht, ob auch in anderen Zellsystemen mit konstitutiv aktivem K-Ras und einer p16-Deletion eine solche Regulation vorliegt, die auf ein generelles Prinzip hinweisen würde. Dazu wurden die humane Pankreaskarzinom-Zelllinie DanG und die humane Kolonkarzinom-Zelllinie SW480 verwendet, die ebenfalls eine V12-Mutation in K-ras aufweisen (Daten nicht gezeigt und Urban et al., 1993). Die Ras-Expression der stabilen

DanG-Transfektanten DanG/Mock und DanG/p16, die in der Arbeitsgruppe generiert worden waren, wurde im Western Blot analysiert. In Abb. 33 ist die Expression von K-Ras bzw. p16 in den Klonen zu sehen. Zur Kontrolle ist die Expression der „Integrin-Linked Kinase“ ILK gezeigt, die bei Integrin-Ligandenbindung Anoikisresistenz vermittelt (Attwell et al., 2000). Mit der p16-Reexpression in DanG-Zellen wurde eine signifikante Abnahme der K-Ras Expression beobachtet, während die Expression des Kontrollproteins ILK durch die p16-Transfektion nicht reduziert wurde. Somit war die Regulation von K-Ras durch p16 in einem weiteren Modell des Pankreasadenokarzinoms nachweisbar. Experimente mit größerem Zellbedarf waren jedoch vorerst durch die geringe Proliferationsrate der DanG/p16-Klone und ihren allmählichen Verlust der p16-Expression nicht möglich.

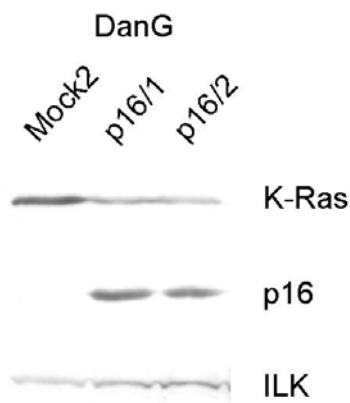


Abb. 33: Die p16-Reexpression reduziert die K-Ras Expression in DanG-Zellen

Je 30 µg Protein aus SDS-Lysaten von DanG/Mock- und DanG/p16-Zellen wurden in einem 13,5% SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western Blot nacheinander mit Antikörpern gegen K-Ras, p16 und ILK analysiert. Mit der p16-Expression in den Klonen p16/1 und p16/2 verringerte sich die Expression von K-Ras deutlich verglichen mit DanG/Mock Zellen. Die Detektion von ILK diente als Kontrolle.

Im zweiten Ansatz wurde die Regulation in der Zelllinie eines anderen Gewebetyps betrachtet. Die Kolonkarzinom-Zelllinie SW480 wurde semi-stabil mit pRC_{CMV}/p16 bzw. zur Kontrolle mit dem Vektor pRC_{CMV} transfiziert. Die p16-Transfektion – nicht aber die Kontrolltransfektion - reduzierte das Wachstum drastisch und führte später zum Absterben der Zellen, so dass die Populationen 10 Tage nach Selektionsbeginn aufgearbeitet werden mussten. Die Expression von K-Ras, p16 und dem Kontrollprotein ILK wurde mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. Im Gegensatz zu transienten Transfektionen (Daten nicht gezeigt) war hier eine sehr deutliche Reduktion der K-Ras Expression durch p16 zu beobachten (Abb. 34). Im Vergleich zu den anderen Zelllinien wurde p16 in SW480-Zellen extrem hoch exprimiert, entsprechend war die verringerte K-Ras Expression in den Kolonkarzinom-Zellen sehr ausgeprägt. Die für Anoikisprozesse so bedeutsame Regulation von K-Ras durch p16 bestätigte sich also nicht nur für Pankreaskarzinomzellen, sondern auch in Zellen eines weiteren Gewebetyps.

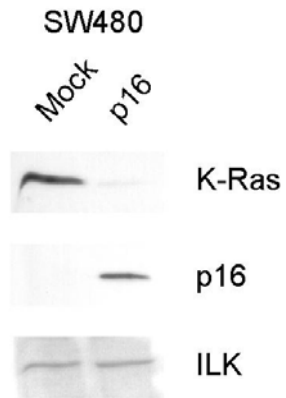


Abb. 34: Die p16-Reexpression reduziert die K-Ras Expression in SW480-Zellen

Je 15 μ g Protein aus MLB-Lysaten von semi-stabilen SW480/Mock- und SW480/p16-Populationen wurden in einem 13,5% SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen K-Ras, p16 und ILK analysiert. Durch die starke p16-Expression in SW480-Zellen (hier im Bild eine kurze Filmexposition) wurde die Expression von K-Ras drastisch verringert. Die Detektion von ILK diente als Kontrolle.