

4. DISKUSSION

Angesichts der hohen Invasivität und der großen Bedeutung der Metastasierung beim Pankreaskarzinom erschien eine Aufklärung der Signaltransduktion, die hinter der durch p16 ausgelösten Apoptose nach Substratverlust steht, absolut erforderlich. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die molekularen Mechanismen der p16^{INK4a}-vermittelten Anoikisinduktion am Beispiel der humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie Capan-1 näher betrachtet. Der zentrale Befund der negativen K-Ras Regulation durch p16 konnte später in weiteren Zellsystemen bestätigt werden.

4.1. Anoikis-relevante Signalwege

Der Prozess der Anoikis läuft vermutlich in verschiedenen Zelltypen bzw. aufgrund verschiedener biologischer Effekte nach unterschiedlichen Mechanismen ab (Grossmann, 2002). In Capan-1/p16 Zellen reduzierte sich die Anoikis durch den Einsatz des Caspase-Inhibitors Z-IETD-FMK um 34%, so dass damit eine Beteiligung von Caspase-8 an der p16-vermittelten Anoikis belegt werden konnte. Dies steht im Einklang mit Studien an nicht transformierten epithelialen Zellen wie z.B. Keratinozyten (Puviani et al., 2003). Auch in der Cockerspaniel-Nierenzelllinie MDCK wurde eine starke Inhibition der Anoikis durch Z-IETD-FMK nachgewiesen, in der Caspase-8 als Initiatorcaspase beschrieben wurde (Rytomaa et al., 1999). Eine Rolle von Caspase-8 bei Anoikisprozessen konnte weiterhin in humanen intestinalen Epithelzellen belegt werden, nach deren Untersuchungen gefolgert wurde, dass die Aktivierung von Caspase-8 ein „Downstream-“ oder Rückkopplungsereignis ist, das erst nach der Aktivierung anderer Caspasen und Cytochrom C oder auch durch die Aktivierung des CD95/Fas-Signalweges eintritt (Grossmann et al., 2001). Dadurch wäre die unvollständige Inhibition der Anoikis durch den Caspase-8 Inhibitor zu erklären, die eine Beteiligung weiterer Signalwege impliziert.

Für die „klassischen“ Signalwege über PI3K/Akt oder MEK/ERK, die als Vermittler von Anoikisresistenz gelten, konnte in Capan-1 Zellen keine derartige Wirkung belegt werden. In Capan-1 Zellen verringerte sich die Akt-Aktivität nach Substratverlust. Sie konnte sowohl in adhärennten als auch Zellen in Suspension mit dem Inhibitor LY294002 deutlich inhibiert werden, die Anoikisresistenz der Zellen wurde durch den Einsatz des Inhibitors jedoch nicht beeinflusst. Dies steht im Gegensatz zu einer Studie an Kolonkarzinomzellen, in denen LY294002 die Anoikissensibilität steigerte – aber nur bei hoher Src-Aktivität (Windham et al., 2002). Die Src-Aktivität in Capan-1 Zellen +/- p16 ist nicht bekannt. Da sich die

Apoptoserate adhärenter Capan-1 und Capan-1/p16 Zellen durch die PI3K-Inhibition erhöhte, könnte der PI3K-Akt Weg hier an der Hemmung anderer Apoptosevorgänge beteiligt sein, so dass sich auch dadurch der Blick auf seine Rolle bei Anoikis(resistenz) erschwerte. In MDCK-Zellen konnte der mitochondriale Apoptoseweg mit Cytochrom C-Freisetzung durch die Expression von aktiviertem Akt blockiert werden, aktiviertes Raf hemmte jedoch andere Anoikis-Mechanismen (Rytomaa et al., 2000).

Auch für eine Beteiligung des Raf-MEK-ERK Signalweges an der Anoikisresistenz der Capan-1 Zellen waren hier durch den Einsatz des MEK-Inhibitors PD98059 keine Hinweise zu erhalten, obwohl die Anoikis-protectiven Eigenschaften des Raf-MEK-ERK Signalweges hinreichend bekannt sind (Chen et al., 1994; Howe et al., 2002; Jost et al., 2001; Le Gall et al., 2000). Dabei war aber eine genaue Aussage über die Rolle der MEK-ERK Signalkaskade im Modell der Capan-1 Zellen nicht möglich, da die ERK-Aktivierung in Suspension weder mit dem beschriebenen Inhibitor PD98059 noch mit einem zweiten MEK-Inhibitor, U0126, (Daten nicht gezeigt) zu inhibieren war. Ein solches Phänomen zusammen mit dem Anstieg der ERK-Aktivität in Suspension wurde gleichfalls in humanen Ovarialkarzinomzellen beobachtet (Sers, C., persönliche Kommunikation, unveröffentlicht). Dies steht im Gegensatz zu Studien an Mammakarzinom-Zelllinien und an einer intestinalen Rattenepithel-Zelllinie, in denen eine deutliche Inhibition auch in suspendierten Zellen erreicht wurde (Fukazawa et al., 2002; McFall et al., 2001). Interessanterweise scheint in suspendierten Kulturen nach einiger Zeit auch als Konsequenz der Caspase-Aktivität eine erhöhte Aktivität der MAPKinasen p42/44 aufzutreten (Jost et al., 2001), die möglicherweise nicht durch MEK-Inhibitoren zu hemmen ist. Sonst hätte der Einsatz beider Inhibitoren gleichzeitig vielversprechend sein können, da bereits für epitheliale Zellen beschrieben wurde, dass bei Inhibition des einen Signalweges der andere jeweils ausreichen kann, um vor Anoikis zu schützen (Danilkovitch et al., 2000). Da so eine Beteiligung dieser gut bekannten Anoikis-protectiven Signalwege im untersuchten System nicht belegt werden konnte, wurde im weiteren ein „Upstream“-Signalmolekül beider Wege, die kleine GTPase Ras, betrachtet.

4.2. Negative Regulation von K-Ras durch den Tumorsuppressor p16^{INK4a} in Capan-1 Zellen

Da onkogenes Ras bekanntermaßen Anoikisresistenz vermittelt und eine Mutation der Isoform K-ras mit der Folge der konstitutiven Aktivierung charakteristisch für Pankreaskarzinome und auch die Zelllinie Capan-1 ist, bot sich die Untersuchung der Ras-Aktivität in dem Modellsystem an. Die Aktivität von K-Ras in Capan-1 Zellen stieg nach

Substratverlust weit über das Expressionsniveau an, während die Aktivität anderer Isoformen unterhalb der Nachweisgrenze lag. Bemerkenswerterweise konnte sich die Aktivität der „konstitutiv aktiven“ K-Ras Mutante sogar in Suspension noch steigern, d.h. möglicherweise liegt ein Teil der K-Ras Moleküle in adhärent wachsenden Zellen in inaktiver Form vor. In Mitogen-stimulierten NIH3T3 Mausfibroblasten wurde nach Substratverlust ebenfalls eine gesteigerte Ras-Aktivität konstatiert, die jedoch Wildtyp-Ras betraf (Lin et al., 1997) und sich ohne Stimulation nicht zeigte (Renshaw et al., 1997). Dadurch, dass die Zellen in unserem Modell ständig mit 15% Serum kultiviert wurden, war eine Dauerstimulation durch Wachstumsfaktoren gegeben. Eine solche Aktivitätssteigerung wurde aber für mutante Ras-Formen noch nicht beschrieben.

Überraschenderweise war im Gegensatz zu Capan-1 Kontrollzellen ein totaler Verlust der K-Ras Aktivität und damit der gesamten mit dem verwendeten Pan-Ras Antikörper nachweisbaren Ras-Aktivität in Capan-1/p16 Klonen zu beobachten, bedingt durch eine selektive Verminderung der K-Ras Proteinexpression. Wie für nicht-embryonale humane Zellen üblich (Lowy und Willumsen, 1993) war dabei die Spleißform K-Ras2B vorherrschend gegenüber der 2A-Variante in Capan-1 Zellen. Eine derartige Beziehung zwischen p16 und onkogenem K-Ras ist bisher nicht bekannt. Bislang wurden nur kooperative Effekte der p16-Inaktivierung und der konstitutiven K-Ras Aktivität in der Tumorigenese, z.B. von Melanomen (Chin et al., 1997) und Adenokarzinomen der Lunge (Fisher et al., 2001) beschrieben, die durch die hier erhaltenen Erkenntnisse noch an Bedeutung gewinnen. In humanen Kolonkarzinomzellen wurde zwar durch die Inhibition des „heat shock“ Proteins Hsp90 auch die Expression von K-Ras verringert, doch waren dabei gleichzeitig mehrere Signalmoleküle betroffen, wie z.B. Akt, Raf-1 und das nahe verwandte N-Ras (Hostein et al., 2001). Dagegen war die p16-bedingte Verminderung der Ras Expression in der vorliegenden Arbeit hoch spezifisch und betraf nur die Kirsten-Isoform.

4.3. Onkogenes K-Ras vermittelt Anoikisresistenz in Capan-1 Zellen

Um die funktionelle Relevanz der K-Ras Regulation durch p16 zu klären, wurde zuerst die Wirkung einer Ras-Inhibition auf die Anoikisresistenz in Capan-1 Zellen überprüft. Sollte K-Ras vor Anoikis schützen, so war ein Anstieg der Anoikis bei Capan-1 Zellen mit reduziertem Ras-Gehalt zu erwarten. Ras wurde mit einem K-rasV12 Antisense-Oligonukleotid in Capan-1 Zellen erfolgreich inhibiert. Dabei wurde die Expression aller mit dem Pan-Ras Antikörper nachweisbaren Ras-Formen reduziert, obwohl das Antisense-Oligonukleotid als spezifisch für die K-ras Punktmutante beschrieben worden war (Kita et al., 1999). Da das 17-mer jedoch für

einen identischen Bereich der Ras-Isoformen N-, H- und K-ras (Bar-Sagi, 2001) gewählt worden war, erschien eine breitere Wirkung auch auf andere (Wildtyp-)Isoformen möglich. Die Ras-Inhibition resultierte bereits unter adhärennten Kulturbedingungen in Proliferationshemmung und Apoptose, Effekte, die schon bei der K-Ras Inhibition durch den Einsatz von Oligonukleotiden, Plasmiden, adenoviralen Transfer und hyperstabile RNA in diversen Pankreaskarzinom-Zelllinien beobachtet wurden (Aoki et al., 1997; Kato et al., 2002; Kita et al., 1999; Su et al., 2001). Wie anzunehmen war entspricht dies einer Verringerung der onkogenen K-Ras Wirkung, so dass dadurch jedoch Anoikis-relevante Veränderungen schwerer zu erkennen bzw. stabile K-rasV12 Antisense Klone kaum überlebensfähig waren. Eine Beurteilung der Anoikisrate Oligonukleotid-behandelter Zellen war trotzdem möglich: Die Ras-Inhibition durch das K-rasV12 Antisense-Oligonukleotid restituierte die Anoikis in Capan-1 Zellen signifikant. Eine Wachstumshemmung suspendierter Kulturen wurde auch für v-K-ras transformierte Rattenfibroblasten nach Applikation von K-ras Antisense-Oligonukleotiden gezeigt, die Apoptoserate wurde dabei aber nicht untersucht (Kawada et al., 1997). Eine vergleichbare Studie der Anoikis ist in der Literatur bisher nicht bekannt.

Umgekehrt konnte die Anoikis in Capan-1/p16 Zellen durch semi-stabile Transfektionen, noch effizienter aber durch eine stabile Transfektion des „verlorenen“ mutanten K-rasV12 aus der Ursprungszelllinie Capan-1 gehemmt werden. Somit konnte hier erstmals gezeigt werden, dass die p16-vermittelte Anoikis in Capan-1 Zellen durch K-RasV12 zu inhibieren ist. Da auch im zweiten funktionellen Ansatz eindeutig onkogenes K-Ras als eminenter Faktor bei der Vermittlung der Anoikisresistenz in Capan-1 Zellen ermittelt wurde, war im weiteren die Bedeutung der K-Ras Aktivität für den Grad der Transformation und die Tumorigenität der Zellen zu klären.

4.4. Onkogenes K-Ras bestimmt den Transformationscharakter von Capan-1 Zellen

Eine weitere Eigenschaft vieler Tumorzellen ist die Fähigkeit, in Soft-Agar Kolonien zu bilden, d.h. nicht nur ohne Matrixkontakt zu überleben, sondern dabei auch zu proliferieren. Je mehr Kolonien dabei gebildet werden können, um so höher ist der Grad der Transformation. Es wurde bereits gezeigt, dass onkogenes Ras die Transformation fördert. So löste z.B. die Überexpression von mutantern H-Ras in humanen Melanomzellen Wachstum in Soft-Agar aus (Fujita et al., 1999). Umgekehrt wurde sogar speziell für die Zelllinie Capan-1 schon beschrieben, dass die spezifische Inhibition von mutiertem K-rasV12 in den Zellen durch siRNA („stable interfering RNA“) das klonale Wachstum in Soft-Agar stoppen konnte (Brummelkamp et al., 2002). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen

die transformierende Wirkung der onkogenen Ras-Isoform in Capan-1 Zellen mit hoher Spezifität: Während die Inhibition des onkogenen K-Ras durch p16 verursacht wurde und mit stark verringerter Koloniebildung der Capan-1 Zellen einherging, hob sich dieser Effekt durch K-RasV12 Reexpression in Capan-1/p16 Zellen wieder auf. Die Koloniebildung der Capan-1/p16/K-ras Zellen in Soft-Agar ging sogar über das Maß der Ausgangszelllinie Capan-1 hinaus. So konnte der Einfluss auf den Transformationscharakter auch eindeutig auf das onkogene K-RasV12 der Capan-1 Zellen zurückgeführt werden.

4.5. Der p16-bedingte Verlust der Tumorigenität von Capan-1 Zellen bleibt trotz onkogener K-Ras Aktivität bestehen

Zur Einschätzung der Tumorigenität kultivierter Zellen wird generell ihr Tumorwachstum nach der Injektion in Nacktmäuse mit defektem Immunsystem überprüft. Die tumorigenen Eigenschaften von onkogenem Ras in Kombination mit anderen Zelldefekten sind vielfach beschrieben worden; so konnte z.B. die Überexpression von mutantern H-Ras in humanen Melanomzellen Tumore in Mäusen mit schwerem Immundefekt induzieren (Fujita et al., 1999). Auch die gezielte Expression von K-RasV12 in transgenen Mäusen führte zu spontaner Tumorigenese (Janssen et al., 2002). Umgekehrt konnte die spezifische Inhibition von mutiertem K-rasV12 in Capan-1 Zellen durch siRNA („stable interfering RNA“) deren Tumorigenität in Nacktmäusen hemmen (Brummelkamp et al., 2002). Auch durch den Einsatz spezifischer Antisense-Oligonukleotide konnte das Tumorwachstum von H-ras transformierten Blasenkarzinomzellen und K-ras transformierten Pankreaskarzinomzellen in immundefizienten Mäusen deutlich reduziert werden (Wickstrom, 2001). Nachdem jedoch in unserem Modellsystem die p16-Reexpression in Capan-1 Zellen einen Verlust der K-Ras Aktivität und der Tumorigenität verursacht hatte, wurde letztere überraschenderweise durch die Restitution von K-RasV12 nicht wiedererlangt. Offensichtlich stehen im hier verwendeten System also antitumorogene Effekte der p16-Reexpression der tumorigenen Wirkung des onkogenen K-Ras entgegen.

Die pRb-Defizienz der p16/K-ras Zellen könnte hierbei eine Rolle spielen. Rb-defiziente Mausembryo-Fibroblasten beispielsweise verloren aber nicht nur ihre Tumorigenität in Nacktmäusen, sondern waren auch kaum oder gar nicht mehr fähig, in Soft-Agar zu wachsen (Dannenbergh et al., 2000; Sage et al., 2000). Während sich in der vorliegenden Arbeit die Ras-Aktivität der Pankreaskarzinom-Zelllinie Capan-1 unabhängig von der pRb-Expression zeigte, wurde in Mausembryo-Fibroblasten und 3T3 Mausfibroblasten eine negative Regulation der Aktivität von K- und N-Ras durch pRb festgestellt, wobei die Ras-Isoformen

aber als Wildtyp vorlagen (Lee et al., 1999). In Schwann-Nervenzellen der Ratte wurde festgestellt, dass der Verlust des Tumorsuppressors p53 für onkogenes H-RasV12 zur Stimulation Mitogen-unabhängiger Proliferation ausreichte. Um Substratabhängigkeit und Kontaktinhibition der Zellen zu überwinden, bedurfte es aber zusätzlich entweder einer Inaktivierung der Proteine der Rb-Familie oder eines p16-Verlustes, der wiederum die Inaktivierung der Rb-Proteine nach sich zog (Mitchell et al., 2003). Diese Studie weist auf die große Bedeutung von onkogenem Ras und p16^{INK4a} als Gegenspieler hin. So könnte im vorliegenden Modell der Pankreaskarzinom-Zelllinie Capan-1 vor dem Hintergrund der inaktiven Tumorsuppressoren p53 und SMAD4 und der intakten Rb-Proteine p107 und p130 jeweils der Einfluss des onkogenen K-Ras oder des Tumorsuppressors p16 wieder die Oberhand haben, je nachdem, ob die Zellen substratunabhängig in vitro (Soft-Agar) oder in vivo im Umfeld der Signaltransduktion und „Matrixangebote“ der Nacktmaus gehalten werden.

Bei der Aufrechterhaltung des Tumorigenitätsverlustes kann auch eine Beteiligung des $\alpha 5\beta 1$ -Integrins nicht ausgeschlossen werden, da gerade dieser Rezeptor stark in Kontakt mit dem extrazellulären Raum steht. Er wurde unabhängig von der K-Ras Substitution in Capan-1/p16 Klonen exprimiert (Daten nicht gezeigt), so dass sich die $\alpha 5$ -Regulation durch die p16-Reexpression in Capan-1 Zellen als unabhängig von der K-Ras Regulation erwies. P16 scheint also trotz des Hintergrundes der konstitutiven K-Ras Aktivität und der Inaktivierung von p53 und SMAD4 starke tumorsuppressive Eigenschaften zu haben, deren genauer Mechanismus bisher unbekannt ist. Trotzdem konnte hier eindeutig die zentrale Rolle von onkogenem K-Ras für die Anoikisresistenz und substratunabhängiges Wachstum in der Zelllinie Capan-1 belegt werden.

4.6. P16 reguliert K-Ras in Capan-1 Zellen posttranslational

Um die Beziehung zwischen den beiden häufigsten Defekten des Pankreaskarzinoms besser verstehen zu können, wurde der Mechanismus der K-Ras Regulation durch p16 näher untersucht. Die Regulation konnte auf transkriptioneller oder (post-)translationaler Ebene erfolgen. Die klassischen ras-Gene H-ras, N-ras und K-ras werden wie Haushaltsgene kaum transkriptionell reguliert (Ellis und Clark, 2000), und so zeigte sich auch beim mutierten K-rasV12 der Capan-1 Zellen -/+ p16 keine transkriptionelle Regulation. Vielmehr wurden nach der p16-Substitution bei vergleichbarer Synthesemenge drastische Unterschiede in der Stabilität des K-Ras Proteins festgestellt, das in Capan-1/p16 Zellen schon nach 6 Stunden kaum mehr nachweisbar war, während in der Ausgangszelllinie Capan-1 auch nach 12

Stunden noch etwa ein Viertel des markierten Proteins vorlag. In Capan-1 Zellen war erst einmal ein Anstieg der K-Ras Menge beim Messpunkt 6 Stunden zu verzeichnen, bedingt durch die im Vergleich zur „Pulse“-Zeit von 14 Stunden sehr viel kürzere „Chase“-Zeit, so dass auf eine Bestimmung der Halbwertszeit verzichtet wurde. Kürzere Markierungszeiten hätten aber den Nachweis erschwert. Außerdem fiel im Vergleich zum anfangs synthetisierten Protein (Null-Stunden-Wert) ein „Banden-Shift“ auf, der durch Veränderungen der posttranslationalen Modifikationen der K-Ras Moleküle (Rebollo et al., 1999) im Verlauf des Abbaus zu Stande gekommen sein könnte. In der Literatur wird Wildtyp K-Ras2B als relativ instabiles Protein beschrieben (Ellis und Clark, 2000), die mutierte Form der Capan-1 Zellen scheint hingegen zu den längerlebigen Proteinen zu gehören. Elad et al. (1999) gaben in NIH3T3 Mausfibroblasten für exogenes K-Ras2BV12 aus einer stabilen Transfektion eine Halbwertszeit von 10-12 Stunden an, in deren Größenordnung auch die Halbwertszeit des onkogenen K-Ras2B der Capan-1 Zellen liegen müsste - eher etwas darunter. Die Isoform H-Ras ist jedoch noch stabiler: Bei einem Vergleich von zellulärem, humanem H-Ras mit der viralen Form der Maus in der Literatur zeigte sich die Halbwertszeit mehr als verdoppelt, 20 Stunden für das normale und für das virale Protein 42 Stunden (Ulsh und Shih, 1984). In Anbetracht der schon relativ hohen Stabilität des onkogenen K-Ras in der untersuchten Zelllinie Capan-1 war die starke Negativ-Regulation durch p16 umso erstaunlicher und warf die Frage nach dem zu Grunde liegenden Mechanismus auf.

In Kopräzipitationsexperimenten konnte K-Ras mit rekombinantem GST-p16 präzipitiert werden, so dass eine direkte Assoziation mit hoher Wahrscheinlichkeit als Mechanismus der p16-bedingten K-Ras Regulation anzunehmen ist. Diese Assoziation könnte eine Verankerung von K-Ras in der Membran verhindern und zu dem beobachteten beschleunigten Abbau des Proteins führen. P16 ist charakterisiert durch eine geringe Stabilität und seine Ankyrindomänen (Boice und Fairman, 1996; Tang et al., 1999), die an der Bindung von K-Ras beteiligt sein könnten. So liegt die Vermutung nahe, dass hier eine ähnlich schwache Assoziation existieren kann wie bei der gut untersuchten Interaktion von p16 mit CDK4 (Yang et al., 1996), denn die K-Ras Bindung war nur in einem wenig stringenten Puffer merklich nachweisbar, der auch zur Koimmunpräzipitation von CyclinD/CDK4- und p16/CDK4-Komplexen verwendet wurde (Matsushime et al., 1994; Plath et al., 2000). Im Gegensatz zu den leichter löslichen plasmatischen CDK4-Komplexen konnte unter Verwendung dieses Puffers jedoch kaum Membran-gebundenes K-Ras in Lösung gebracht werden. So sollte die nur schwach nachweisbare Kopräzipitation von K-Ras mit dem rekombinanten GST-p16 Protein nicht verwundern. Über den Mechanismus der Ras-

Degradation ist bisher nichts bekannt und lässt damit die angenommene direkte Assoziation mit p16 als besonders interessant erscheinen. Da p16 in Capan-1 Zellen, auch ungeachtet der direkten oder indirekten Wirkung, als effizienter „Inhibitor“ des mutierten K-Ras erkannt worden war, war dieser neue Befund nun in weiteren Zellsystemen zu überprüfen.

4.7. Die Bedeutung der Negativ-Regulation von onkogenem K-Ras durch p16^{INK4a}

Die negative Regulation der Expression von onkogenem K-Ras durch p16 konnte in zwei weiteren Zellsystemen mit p16-Reexpression, in der stabil transfizierten Pankreaskarzinom-Zelllinie DanG und in semi-stabilen Mischpopulationen der Kolonkarzinom-Zelllinie SW480, bestätigt werden, so dass diese Regulation ein generelles Prinzip zu sein scheint. Ein solcher Zusammenhang wurde hier erstmals beschrieben und eröffnet neue Möglichkeiten der Regulation von Ras-Aktivität mit einem guten Wirkungsgrad für onkogenes K-Ras. Dies wäre ein vielversprechender Ansatz zur Entwicklung neuer Therapien von Krebsformen, die neben der konstitutiven Aktivierung von K-Ras eine Inaktivierung des Tumorsuppressors p16^{INK4a} aufweisen, d.h. insbesondere für Pankreaskarzinome. In Studien zur Erkennung von Pankreaskarzinomen in frühem Stadium bzw. deren Metastasierungspotential wurde mutiertes K-ras bereits als geeigneter diagnostischer Marker eingestuft (Lu et al., 2002; Mohiuddin et al., 1996).

Therapeutische Ansätze sind noch in der Erforschung, z.T. auch schon in klinischen Studien. Sie setzen bei der Inhibition des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweges (Hilger et al., 2002), der Inhibition der Ras-Isoprenylierung und damit der Membranlokalisierung oder der direkten Inhibition der Ras-Expression durch Antisense-Oligonukleotide, Ribozyme oder RNA an (Adjei, 2001; Downward, 2003). In einer interessanten immunologischen Studie wurde Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom ein synthetisches Ras-Mutanten-Peptid in Kombination mit dem Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) injiziert. 58% der Patienten entwickelten daraufhin eine Peptid-spezifische Immunität und erreichten höhere Überlebenszeiten (Gjertsen et al., 2001). Nach den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen scheint jedoch besonders die Konzentration auf einen p16-spezifischen Ansatz erfolgversprechend, mit dem gleichzeitig die K-Ras Aktivität drastisch verringert werden könnte. So würden zwei tumorauslösende Defekte auf einmal behoben. Dabei ist eine Regulation speziell der mutierten Ras-Form, wie durch p16 erfolgt, wichtig, da so Ras-Wildtypformen erhalten werden und ihre beschriebene onkosuppressive Wirkung (Spandidos et al., 2002) entfalten können. Im Fokus waren bisher eher Therapeutika, die die Wirkung der Zellzyklusinhibitoren auf die CDKinasen imitieren (Mani et al., 2000;

Senderowicz und Sausville, 2000), bei denen aber noch keine Ras-spezifische Modulation untersucht wurde. Kürzlich wurde jedoch eine hyperstabile Variante von p16^{INK4a} vorgestellt, die strukturell dem Wildtyp-Protein gleicht und eine sehr gute CDK4-Bindungsaktivität aufweist (Cammett et al., 2003). Eine Untersuchung der Ras-Regulation und ein möglicher therapeutischer Ansatz beim Pankreaskarzinom wäre mit diesem modifizierten p16 sehr interessant.

4.8. Weiterführende Fragestellungen

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate stellen einen Meilenstein im Verständnis der Pathophysiologie des Pankreaskarzinoms dar und sollten mit weiteren Experimenten abgesichert werden. Wegen der Proliferationshemmung der meisten p16-transfizierten Zelllinien, die das pRb-Protein nicht verlieren, sollte die Regulation in weiteren Zellsystemen unter Zuhilfenahme des induzierbaren Tet-On- oder Tet-Off-Systems untersucht werden, mit dem p16 erst nach erfolgter Selektion exprimiert würde. Dann wäre auch eine Beurteilung der Ras-Aktivität und zugrundeliegender Mechanismen in einem breiteren Zellspektrum möglich. Am Modell der Zelllinie Capan-1 könnten die Signalwege der Anoikisresistenz (Capan-1) und der Anoikisvermittlung (Capan-1/p16) weiter entschlüsselt werden, auch im Hinblick darauf, Isoform-spezifische biologische Funktionen zu erforschen. So werden z.B. K-Ras bessere Bindungseigenschaften an Raf-1 zugeschrieben als H-Ras (Voice et al., 1999; Yan et al., 1998). Nach dem Verlust der K-Ras Aktivität mit der p16-Substitution in Capan-1 Zellen war keine Verringerung der ERK, Akt- oder Ral-Aktivität festzustellen (Daten nicht gezeigt), deren Signalwege in letzter Zeit oft als die drei Hauptwege der Ras-Signaltransduktion erwähnt wurden (Übersicht in Boettner und Van Aelst, 2002), so dass die Ras-Signaltransduktion hier auch über andere Wege laufen könnte, wie bereits in einer Studie an intestinalen Rattenepithelzellen vermutet wurde (McFall et al., 2001). Es wurde beispielsweise eine Beteiligung der Zytoskelett-regulatorischen Proteine Rho, Rac und Cdc42 bei substratunabhängigem Wachstum durch onkogenes Ras belegt (Qiu et al., 1995; Qiu et al., 1997; Olson et al., 1998), deren Aktivität im Capan-1 Zellsystem zu bestimmen wäre. Auch die Bedeutung der Proteinkinase C (PKC) sollte in Bezug auf die K-Ras vermittelte Anoikisresistenz geklärt werden, da der Einsatz eines PKC-Inhibitors, in Kooperation mit einem Anti-Ras-Peptid sogar verstärkt, die Transformation von Pankreaskarzinomzellen revertieren und substratunabhängiges Wachstum stark reduzieren konnte (Way et al., 2002). Die Erforschung der Signaltransduktion, die hinter der Anoikisregulation steht, könnte weitere therapeutische Angriffsziele bieten. Nicht zuletzt sollte aber auch per „Drug Design“

an neuen Medikamenten gearbeitet werden, die die beschriebene Funktion des p16-Proteins übernehmen können, um endlich wirksame Pharmaka für eine Therapie des aggressiven Pankreaskarzinoms zu finden.