

---

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

# **Die Relevanz genetischer Veränderungen (K-Ras und p53) in der Tumorbilogie des dukta- len Pankreasadenokarzinoms**

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

vorgelegt von  
**Noreen Otto**  
aus Mittweida

Berlin 2007

---

1. Gutachter: Prof. Dr. Bertram Wiedenmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Volker A. Erdmann

Tag der Disputation: 09.11.2007

---

*Meinen liebsten Ellis*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Pankreaskarzinom.....	1
1.2 Molekulare Ursachen des Pankreasadenokarzinoms.....	2
1.2.1 Der Tumorsuppressor p53.....	3
1.2.1.1 Regulation der p53-Aktivität.....	4
1.2.1.2 Biologische Effekte von wt p53.....	4
1.2.1.3 Mechanismus der wt p53-Inaktivierung und maligne Transformationen.....	7
1.2.2 Das Proto-Onkogen <i>K-Ras</i> .....	9
1.2.2.1 Aktivierung und Funktionen von <i>K-Ras</i> .....	9
1.2.2.2 Das Onkogen <i>K-Ras</i> im Pankreaskarzinom.....	11
1.3 Tumorangiogenese.....	12
1.4 Tiermodelle.....	15
<b>2 Zielstellung.....</b>	<b>17</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
3.1 Material.....	18
3.1.1 Lösungen für Zellkultur und Bakterien-Nährmedien.....	18
3.1.2 Biologisches Material.....	19
3.1.3 Antibiotika.....	19
3.1.4 Enzyme und Enzympuffer.....	20

---

3.1.5	Antikörper.....	20
3.1.6	Größenstandards .....	21
3.1.7	Vorgefertigte Systeme (Kit).....	21
3.1.8	Vektoren.....	22
3.1.9	Sonstige Substanzen und Materialien .....	22
3.1.10	Geräte .....	22
3.2	Methoden .....	24
3.2.1	Gentechnische und molekularbiologische Methoden .....	24
3.2.1.1	Elektrophoretische Auftrennung von DNA/RNA .....	24
3.2.1.2	Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA .....	24
3.2.1.3	RNA-Isolation und Reverse Transkription .....	25
3.2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	25
3.2.1.5	Klonierungstechniken.....	27
3.2.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA.....	28
3.2.2	Zellbiologische Methoden .....	29
3.2.2.1	Stabile Transfektion .....	29
3.2.2.2	Transiente Transfektion und Transienter Luziferase-Reporter-Gen-Assay.....	29
3.2.2.3	FACS-Analyse .....	31
3.2.2.4	Zellproliferationstest.....	32
3.2.3	Proteinanalytische Methoden.....	32
3.2.3.1	Herstellung von Zelllysaten.....	32
3.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	33
3.2.3.3	Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli.....	33
3.2.3.4	Western Blot.....	34
3.2.3.5	Zymogramm .....	35
3.2.4	<i>In vivo</i> -Experimente .....	36
3.2.4.1	Tumorbildung in der Nacktmaus.....	36
3.2.4.2	Immunhistologische/-zytologische Untersuchungen .....	36
3.2.5	Statistische Auswertung.....	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
4.1	Das induzierbare System.....	39

4.1.1	Etablierung induzierbarer Pankreaskarzinom-Zelllinien .....	40
4.1.2	Konstruktion und Transfektion eines Konstruktes zur induzierbaren Expression von wt p53 in Pankreaskarzinom-Zelllinien .....	43
4.1.3	Konstruktion und Transfektion eines Konstruktes zur induzierten Hemmung der K-Ras-Onkogen-Expression mittels siRNA-Technologie .....	44
4.1.4	Induzierbare Expression von K-Ras siRNA in Pankreaskarzinom-Zellen .....	45
4.1.5	Biologische Effekte der wt p53-Expression <i>in vitro</i> .....	46
4.1.5.1	Charakterisierung der MiaPaCa-2- und DanG-Zellklone mit induzierbarer wt p53-Expression	46
4.1.5.2	Effekt des induzierten wt p53 auf Zellzyklus-regulierende Proteine .....	49
4.1.5.3	Einfluss der wt p53-Induktion auf Apoptose .....	51
4.1.5.4	Effekte der wt p53-Induktion auf die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen .....	52
4.2	Das orthotope Mausmodell .....	54
4.2.1	Einfluss der Induktion von wt p53 auf das Primärtumorwachstum .....	55
4.2.2	Einfluss der induzierten wt p53-Expression auf die Ausbildung makroskopischer Läsionen in den Mäusen .....	56
4.2.3	Nachweis der wt p53-Flag-Expression in den Dox behandelten Tumoren .....	56
4.2.4	Einfluss der induzierten wt p53-Expression auf die Vaskularisierung .....	58
4.2.5	Einfluss der induzierten wt p53-Expression auf Metastasierung .....	63
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>65</b>
5.1	Das induzierbare System .....	65
5.2	Die <i>in vitro</i> -Auswirkungen der wt p53-Rekonstitution in Pankreasadenokarzinom-Zellen .....	67
5.3	Die <i>in vivo</i> -Auswirkungen der wt p53-Rekonstitution in Pankreasadenokarzinom-Zellen .....	70
5.3.1	Orthotopes Mausmodell des Pankreasadenokarzinoms .....	70
5.3.2	Kombination des orthotopen Mausmodells des Pankreaskarzinoms mit wt p53 induzierbaren MiaPaCa-2-Zellen .....	71
5.3.3	Folgen der wt p53-Induktion auf Tumorangiogenese und Metastasierung <i>in vivo</i> .....	74
5.4	Die wt p53-Rekonstitution als Therapieansatz und Schlussfolgerungen .....	77
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>79</b>

---

<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>80</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>95</b>
	<b>Eigene Veröffentlichungen .....</b>	<b>96</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>97</b>
	<b>Erklärung an Eides Statt.....</b>	<b>98</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Pathologischer Verlauf des Pankreasadenokarzinoms .....	2
Abb. 2: Einfluss von wt p53 auf Zellzyklus.....	5
Abb. 3: <i>Downstream</i> Effektoren von wt p53 .....	6
Abb. 4: Aktivierungssignalweg von Ras.....	10
Abb. 5: Signalwege <i>downstream</i> von Ras .....	10
Abb. 6: Blutgefäßentstehung .....	13
Abb. 7: Leuchtkäfer-Luziferase katalysierte Enzymreaktion.....	30
Abb. 8: Induzierbares System (T-REx <sup>TM</sup> , Invitrogen).....	40
Abb. 9: Etablierung Tetrazyklin regulierbarer Genexpression in Pankreaskarzinom-Zelllinien (pTet-on- und T-REx <sup>TM</sup> -System) .....	42
Abb. 10: Klonierungsstrategie von Wildtyp p53 in pcDNA4/TO .....	43
Abb. 11: Induzierbare wt p53-Überexpression in MiaPaCa-2 und DanG .....	44
Abb. 12: Schematische Darstellung des pTER <sup>+</sup> -K-Ras-Vektors und der siRNA-Technologie.....	45
Abb. 13: Induzierbare <i>K-Ras</i> -siRNA hemmt <i>K-Ras</i> -Expression in DanG-Zellen.....	46
Abb. 14: Stabile wt p53-Expression nach Dox-Zugabe in den Zellklonen DanG p53-3 und Mia p53-10.....	47
Abb. 15: Induziertes wt p53 inhibiert das Zellwachstum.....	47
Abb. 16: Zellzyklusanalyse der Zellklone zu frühen Zeitpunkten der induzierten wt p53- Expression .....	48
Abb. 17: Induktion von wt p53 führt zu G1-Zellzyklusarrest .....	49
Abb. 18: Western Blot-Analyse verschiedener Effektoren in den wt p53-induzierbaren Pankreaskarzinom-Zelllinien.....	50
Abb. 19: Induziertes wt p53 inhibiert Apoptose in den Pankreaskarzinom-Zelllinien .....	52
Abb. 20: Induziertes wt p53 zeigt keinen Einfluss auf die MMP-Regulation in den Pankreaskarzinom-Zelllinien.....	53
Abb. 21: Primärtumorwachstum ist in Dox behandelten Mäusen inhibiert .....	55
Abb. 22: Mäuse mit Dox-Behandlung wiesen keine intraabdominellen Läsionen auf .....	56
Abb. 23: Immunzytologischer Nachweis von wt p53-Flag in den Zellen Mia p53-10.....	57
Abb. 24: Immunhistologische Untersuchung der wt p53-Flag-Expression in den Tumorproben .....	58
Abb. 25: Effekt des induzierten wt p53 auf die Gefäßbildung in den Primärtumoren .....	59

---

Abb. 26: Effekt des induzierten wt p53 auf die Lymphgefäßbildung in den Primärtumoren ..	60
Abb. 27: Effekt des induzierten wt p53 auf die Blutgefäßbildung in den Primärtumoren .....	61
Abb. 28: Tumorserienschnitte von Mäusen der Gruppe II .....	61
Abb. 29: Einfluss des induzierten wt p53 auf das Metastasierungsverhalten in intraabdominelle Lymphknoten .....	63

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete humane Zelllinien mit Herkunft und Kulturmedium .....	19
Tabelle 2: Verwendete Primär-Antikörper mit Herkunft und Reaktionsbedingung .....	20
Tabelle 3: Verwendete Primer .....	26
Tabelle 4: Ausbeute der stabil transfizierten Pankreaskarzinom-Zelllinien mit den Erstvektoren pTet-on oder pcDNA6/TR .....	41
Tabelle 5: Einteilung der Nacktmäuse für die wt p53-Induktion zu verschiedenen Zeitpunkten und deren Kontrollen.....	54