
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 Tumorbologie des duktales 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

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
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
2 Zielstellung.....	17
3 Material und Methoden.....	18
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
4	Ergebnisse	39
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
5	Diskussion	65
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
6	Zusammenfassung	79

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

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 TM , Invitrogen).....	40
Abb. 9: Etablierung Tetrazyklin regulierbarer Genexpression in Pankreaskarzinom-Zelllinien (pTet-on- und T-REx TM -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 ⁺ -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