

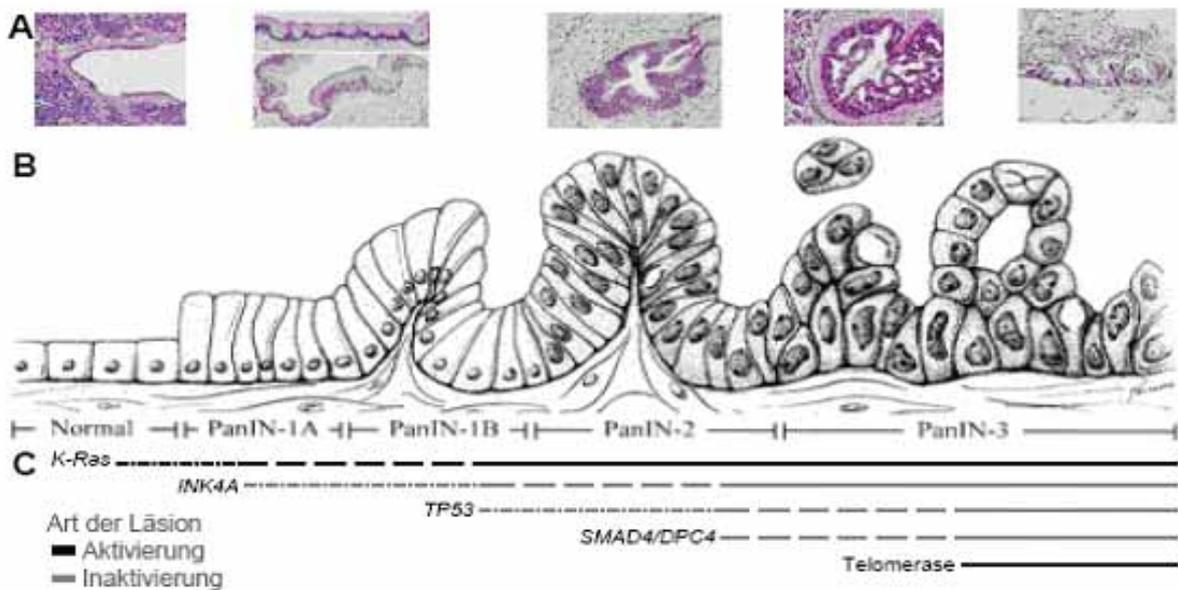
# 1 Einleitung

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

In Deutschland und den anderen westlichen Industrienationen stellen maligne Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar (DKFZ, 2003; Jemal et al., 2005). Davon werden ca. 20% der Todesfälle durch das Pankreaskarzinom verursacht. Trotz medizinischer Fortschritte überleben nur bis zu 3% der Betroffenen die ersten fünf Jahre (DKFZ, 2003; Jemal et al., 2005).

Das Pankreas ist eine der wichtigsten Anhangsdrüsen des Verdauungskanals und lässt sich in zwei funktionelle Einheiten unterteilen. Das exokrine Kompartiment besteht hauptsächlich aus Azinar- und Duktzellen, die Verdauungsenzyme produzieren. Den endokrinen Teil bilden Langerhans'sche Inseln, die Hormone zur Regulation des Kohlehydratstoffwechsels synthetisieren (Bardeesy and DePinho, 2002; Endoline, 2007). Maligne Erkrankungen können sich von beiden Teilen des Pankreas ableiten, wobei ca. 90% aller Pankreaskarzinome aus den exokrinen Zellen entstehen und einen duktaalen Phänotyp aufweisen (Rosewicz and Wiedenmann, 1997). Die Diagnose des duktaalen Pankreasadenokarzinoms erfolgt aufgrund seiner weitgehend symptomlosen Entstehung und seiner schwachen antigenen Reaktion (Laheru and Jaffee, 2005) oftmals in einem bereits fortgeschrittenen Stadium. Durch die frühe Metastasierung und häufig auftretende Resistenz gegenüber chemo- und strahlentherapeutischer Behandlung ist die Heilung sehr oft nicht möglich (Hruban et al., 2000; Rosewicz and Wiedenmann, 1997). Damit zählt das Pankreasadenokarzinom zu den Tumorerkrankungen mit der ungünstigsten Prognose überhaupt.

Ähnlich wie beim Kolonkarzinom geht man inzwischen auch beim Pankreaskarzinom von einem schrittweisen Transformationsprozeß aus, dessen einzelne Abschnitte mit charakteristischen morphologischen und molekularen Veränderungen verbunden sind. Gemäß diesen Veränderungen werden verschiedene Phasen der malignen Transformation duktaaler Zellen klassifiziert, beginnend mit prämaligen Läsionen, die als *Pancreatic Intraepithelial Neoplasias* (PanIN) bezeichneten (Nationales Krebsinstitut, 1999) (Abb. 1). Am Ende steht das Adenokarzinom mit invasivem Wachstum und ausgeprägten stromalen Veränderungen (Hruban et al., 2000). Veränderungen der duktaalen Epithelzellen umfassen eine erhöhte Mukzinproduktion, eine gesteigerte Proliferationsrate, Verlust der Polarität und ein verändertes Mitoseverhalten. Im Folgenden lösen sie sich vom Zellverband und gehen in das Duktumen über (Abb. 1A/B) (Hruban et al., 2000).



**Abb. 1: Pathologischer Verlauf des Pankreasadenokarzinoms**

A) immunhistochemische Schnitte, B) schematische Darstellung mit Abgrenzung und Einteilung in die *Pancreatic Intraepithelial Neoplasias* (PanIN) und C) genetische Alterationen in den einzelnen Stufen (Bardeesy and DePinho, 2002; Hruban et al., 2000)

Das Adenokarzinom tritt meist am Pankreaskopf (zu 60% aller Pankreasadenokarzinome) auf. Die Tumorzellen infiltrieren das restliche Pankreasgewebe und das umliegende Gewebe wie Magen, Duodenum, Ductus choledochus, Kolon, peripankreatisches Fettgewebe und Mesenterium, Milz oder benachbarte große Gefäße. Neben diesem lokal invasiven Wachstum kommt es zu einer Ausbreitung in die regionären Lymphknoten. Zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorprogression metastasieren Tumorzellen in Leber und/oder Lunge (Hermanek, 1998; Jura et al., 2005). Die Metastasierung beschreibt eine Serie aufeinander folgender Schritte, die die Tumorzelle überleben muss. Diese sind der Übertritt der Zelle in das Gefäßsystem, Überleben im Blut- bzw. Lymphstrom, Festhalten im Kapillarnetz und Wiederaufnahme der Proliferation im „fremden“ Organ (Mehlen and Puisieux, 2006).

## 1.2 Molekulare Ursachen des Pankreasadenokarzinoms

Die morphologischen Veränderungen der duktaalen Zellen in den PanINs korrelieren mit einer steigenden Anzahl genetischer Veränderungen (Abb. 1C), wie der konstitutiven Aktivierung von Onkogenen und der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Eine der ersten molekularen Veränderungen in fast allen duktaalen Pankreasadenokarzinomen ist die konstitutive Aktivierung des *Kirsten-Ras* (*K-Ras*) Onkogens (Bos, 1989). Während der fortschreitenden Tumorprogression treten mit starker Häufigkeit Inaktivierungen der Tumorsuppressorgene  $p16^{INK4A}$  (*p16*) (Schutte et al., 1997), *p53* (Pellegata et al., 1994; Redston et al., 1994; Rozenblum et al., 1997) und *Smad4/DPC4* (Hahn et al., 1996) auf. Die Veränderungen in *K-Ras*, *p16*, *p53* und *Smad/DPC4* sind die vier häufigsten Alterationen im

Pankreasadenokarzinom und drei dieser Veränderungen liegen in 75% aller Fälle simultan vor. Die Veränderungen in den genannten Genen führen im einzelnen zu einer Deregulation des Zellzyklus und Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod (Apoptose) (Bardeesy and DePinho, 2002; Schneider and Schmid, 2003). In den nächsten Abschnitten wird näher auf K-Ras und p53 eingegangen und versucht, deren Bedeutung für die Entstehung und das Fortschreiten des Pankreasadenokarzinoms zu erläutern.

### 1.2.1 Der Tumorsuppressor p53

Der Tumorsuppressor p53 ist ein Transkriptionsfaktor mit einer Schlüsselfunktion in der zellulären Wachstumskontrolle. Er bestimmt die zelluläre Antwort auf eine Reihe von Stressfaktoren, indem p53-abhängige Kontrollpunkte unter diesen Bedingungen Zellzyklusarrest oder Apoptose einleiten können. Diese Kontrollfunktion ist wesentlich für die genetische Stabilität sowie für die Verhinderung von zellulärer Transformation und Tumorigenese.

Mehrere Befunde unterstreichen die Bedeutung von p53 als Tumorsuppressor:

- (i) In humanen malignen Tumoren repräsentiert p53 das am häufigsten mutierte Gen (50% aller malignen Tumore) (Soussi and Beroud, 2001).
- (ii) Das Li-Fraumeni-Syndrom, eine autosomal dominant vererbliche Erkrankung, ist mit einer p53-Keimzellmutation verbunden und führt zur Entwicklung maligner Tumore im frühen Alter (Malkin et al., 1990).
- (iii) p53-defiziente Mäuse zeigen eine normale Entwicklung, weisen jedoch eine erhebliche Prädisposition für die Entstehung verschiedener maligner Erkrankungen und eine dadurch erhebliche reduzierte Lebensdauer auf (Donehower et al., 1992; Jacks, 1996).

Humanes p53, lokalisiert auf dem Chromosom 17p13.1, ist ein nukleäres Phosphoprotein von 53 kDa. Zusammen mit p63 und p73 bildet es eine hoch konservierte Genfamilie von Transkriptionsfaktoren (Levrero et al., 2000; Marin and Kaelin, Jr., 2000). Das Protein ist in mehrere Domänen strukturiert und besteht aus einer Transaktivierungsdomäne im N-Terminus (AS 1-50; enthält Mdm2-Bindestelle), einer Prolin-reichen Domäne (AS 63-97), einer DNA-Bindungsdomäne (AS 102-292), einer Oligomerisierungsdomäne (AS 323-356) und einer C-terminalen Regulationsdomäne (AS 363-393) (Wang et al., 2003). Die Domänen werden durch verschiedene Mechanismen posttranslationell modifiziert und übernehmen unterschiedliche Aufgaben (Wang et al., 2003).

### 1.2.1.1 Regulation der p53-Aktivität

Wildtyp (wt) p53 wird in fast allen Geweben exprimiert und liegt in Stress-freien Zellen im inaktiven Zustand vor (Giaccia and Kastan, 1998). Ein negativer autoregulatorischer Rückkopplungseffekt garantiert die sehr geringe Halbwertszeit des wt p53 von nur 5 – 20 Minuten (Momand and Zambetti, 1997). Dabei wird wt p53 von Proteinen wie dem *Murine double minute (Mdm)-2* Proto-Onkogen gebunden, die zum Abbau des wt p53-Proteins führen. Zugleich ist dieses *Mdm2* transkriptionelles Zielgen von wt p53 (Momand and Zambetti, 1997; Prives, 1998). Die Mdm2-Bindung initiiert Ubiquitylierungen, woraufhin wt p53 aus dem Zellkern transportiert und von Proteasen abgebaut wird (Tao and Levine, 1999).

Eine Aktivierung Stress induzierter Signalwege infolge von DNA-Defekten, Aktivierung von Onkogenen oder Hypoxien führt zu posttranslationellen Modifikationen am wt p53-Protein (Cadwell and Zambetti, 2001), was eine allosterische Konformationsänderung bedingt. Diese begünstigt die Bildung von p53-Dimere, die sich wiederum zu Tetrameren zusammenschließen (Friedman et al., 1993). So erhöht sich die Halbwertszeit von wt p53, was mit einer bis zu 10fachen Konzentrationserhöhung des Proteins im Nukleus einhergeht (Pluquet and Hainaut, 2001). Weiterhin wird die sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität von wt p53 durch posttranslationelle Modifikationen stark erhöht. Durch DNA-Bindung in der Promoterregion von mehr als 300 Zielgenen wird von wt p53 deren Expression induziert. Viele dieser Zielgene spielen eine zentrale Rolle in der zellulären Wachstumskontrolle (Ginsberg et al., 1991; Hall et al., 1996; Mack et al., 1993).

### 1.2.1.2 Biologische Effekte von wt p53

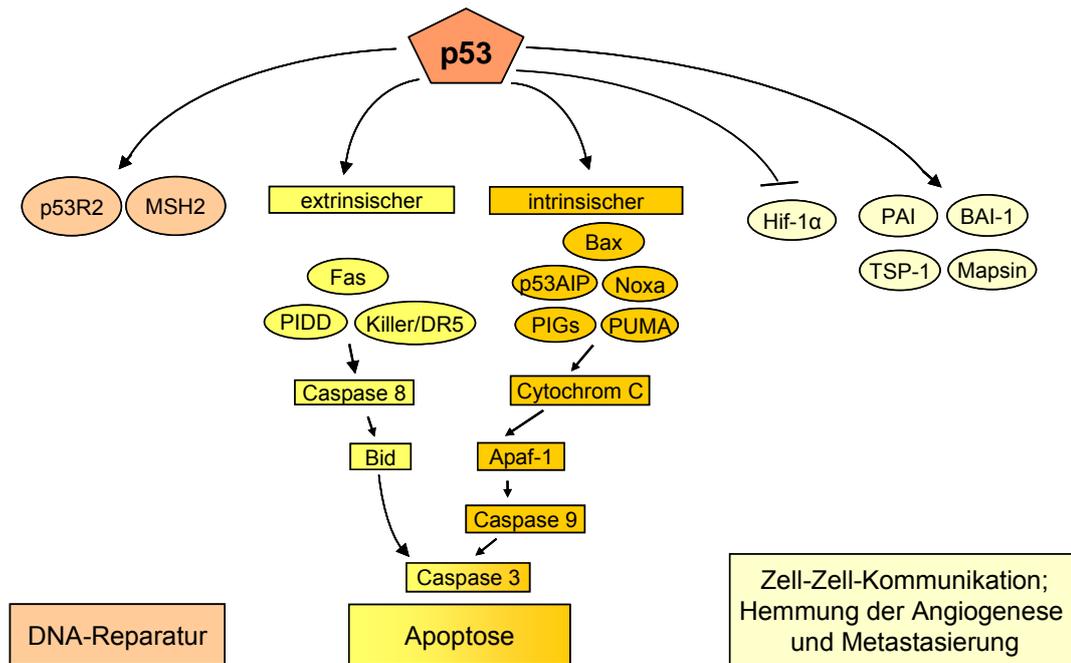
Stabilisierung und Aktivierung von wt p53 resultieren im Regelfall zunächst in einer Aktivierung von G1- und G2-Zellzykluskontrollpunkten. Je nach Art und Ausmaß der Schädigung bzw. des Stresssignals setzen Reparaturmechanismen oder Apoptoseinduktion ein (Ginsberg et al., 1991; Hall et al., 1996; Mack et al., 1993). Zunächst wird der Einfluss von wt p53 auf den Zellzyklus näher erläutert, bevor die p53-abhängige Apoptose beschrieben wird.

Der Zellzyklus, der sich in Mitose und Interphase mit G1-, S- und G2-Phase unterteilt, wird von einem komplexen „Netzwerk“ aus Zyklinen und Zyklin-abhängigen Kinasen, den CDKs, kontrolliert (Morgan, 1995; Pines, 1995) (Abb. 2). Ihre sequentielle Expression und Aktivierung garantieren die Integrität und Identität proliferierender Zellen.

Die der G1-Phase zugeordneten Zyklone und CDKs bilden zusammen Kinase-Komplexe aus, die durch Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (RB) dessen Repressorfunktion



Interaktion von Cytochrom C mit Apaf-1 führt zur Aktivierung der Caspase 9 und nachfolgender Aktivierung der Caspase-Kaskade (Harris and Levine, 2005; Yu and Zhang, 2005). Bezüglich des extrinsischen Signalwegs aktiviert wt p53 an der Plasmamembran gelegene Todesrezeptoren der Tumornekrosisfaktor-Rezeptor(TNFR)-familie wie beispielsweise DR4, Killer/DR5 und Fas/Apo-1 (Owen-Schaub et al., 1995; Wu et al., 1997). Diese aktivieren dann Caspase-8 und initiieren auf diese Weise ebenfalls die Caspase-Kaskade (Abb. 3).



**Abb. 3: Downstream Effektoren von wt p53**

Wt p53 aktiviert über den intrinsischen und extrinsischen Apoptosesignalweg Caspase 3 und damit den Untergang der Zelle. Wt p53 ist in der Lage durch Aktivierung bzw. Inhibierung der Transkription verschiedener Gene oder durch Protein-Protein-Interaktion die Angiogenese und Metastasierung zu hemmen, die Zell-Zell-Kommunikation zu fördern und die DNA-Reparatur einzuleiten (Harris and Levine, 2005).

Trotz großer Bemühungen, hat es sich als schwierig erwiesen, einen spezifischen pro-apoptotischen Effektor zu identifizieren, dessen Inaktivierung die biologischen Effekte der wt p53-Inaktivierung in vollem Umfang widerspiegelt. Am ehesten lässt sich dies durch ein Modell erklären, in dem wt p53 an verschiedenen Knotenpunkten des zellulären Signalnetzwerkes die Balance in Richtung pro-apoptotischer Signale verschiebt. Anders als in einem hierarchisch angeordneten Modell gewährleistet wt p53 so auf verschiedenen Ebenen und mit großer Ausfallsicherheit die Induktion von Apoptose. Ebenfalls könnte ein solches Konzept die auffällige Spannbreite der biologischen Effekte von wt p53 erklären, die neben Apoptose und Zellzyklusarrest auch Seneszenz oder die DNA-Reparatur umfassen, da zelltyp- und gewebespezifische Faktoren sowie Art und Stärke der wt p53-Aktivierung auf vielfältige Weise integriert werden (Fridman and Lowe, 2003). Beispielsweise können durch die unterschiedliche Bindungsaffinität von wt p53 an verschiedenen Promotoren je nach

Ausmaß der wt p53-Induktion unterschiedliche Effektormuster entstehen. So führen geringere Mengen wt p53 zum Zellzyklusarrest, höhere dagegen induzieren Apoptose (Chen et al., 1996). Eine weitere Ursache ist vermutlich die p21-vermittelte Inhibierung der wt p53-abhängigen Apoptose (Bissonnette and Hunting, 1998; Zhang et al., 1999).

Auch indirekte Wirkmechanismen unterstützen die biologischen Effekte von wt p53. Ein Beispiel hierfür ist die Regulation pro-angiogener Faktoren. So hemmt wt p53 die Hif(*hypoxia-inducible factor*)-1 $\alpha$ -Aktivität, ein trans-Aktivator, der bei Sauerstoffmangel dimerisiert und somit stabilisiert wird (Semenza, 2001). Hif-1 $\alpha$  ist in die VEGF(*vascular endothelial growth factor*)-Regulation involviert (Forsythe et al., 1996) und fördert die Neovaskularisierung (Matsuda et al., 2005). Auch durch Komplexbildung mit dem Sp1-Protein inhibiert wt p53 im Komplex direkt die VPF/VEGF-Transkription, wohlgleich der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist (Mukhopadhyay and Datta, 2004; Neid et al., 2004). Der Verlust von wt p53 führt in Fibroblasten zu einer Reduzierung des Angiogeneseinhibitors Thrombospondin-1 (Tsp-1), der nach Aktivierung VEGF und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) inhibiert (Dameron et al., 1994).

Zusammenfassend ergeben sich aus dem Funktionsverlust von wt p53 schwerwiegende Störungen der Kontrolle der DNA-Integrität, da wesentliche Zellzykluskontrollpunkte inaktiviert und die Induktion von Apoptose nach irreparabler Schädigung nicht mehr gesichert ist. Die Auswirkung und Rolle dieser Störungen für die Tumorentstehung werden nachfolgend beschrieben.

### 1.2.1.3 Mechanismus der wt p53-Inaktivierung und maligne Transformationen

In ca. der Hälfte aller Krebserkrankungen liegen Mutationen des Tumorsuppressorgens *p53* vor (Soussi and Beroud, 2001). Im Unterschied zur Inaktivierung anderer Tumorsuppressoren weist der Modus der wt p53-Inaktivierung aber einzigartige Merkmale auf.

Bei den meisten Tumorsuppressoren verursachen Mutation oder Promotormethylierung die Bildung eines verkürzten Proteins bzw. den Verlust der Expression. Veränderungen im *p53*-Gen sind hingegen sehr häufig Missensmutationen in der DNA-Bindedomäne (Hollstein et al., 1994; Soussi and Lozano, 2005), die zur Synthese eines stabilen *full-length* Proteins und zu dessen Akkumulation in der Zelle führen. Trotz des Verlustes der Tumorsuppressorfunktion zeigt mutiertes p53 dabei noch eine regulatorische Wirkung. Zum einen hemmt es im Sinne einer dominant-negativen Funktion das wt p53, welches durch das zweite Allel exprimiert wird. Zum anderen können p53-Missensmutationen in einem *gain of function* resultieren, einer Transformation des mutierten *p53* in ein dominantes Onkogen (Dittmer et al., 1993; Lane and Benchimol, 1990; Soussi and Beroud, 2003). Diese

onkogenen Varianten sind trotz Verlustes der sequenzspezifischen DNA-Bindung an der transkriptionellen Regulation beteiligt, so wird z.B. eine Stimulation von Multidrug-Resistenz-Protein(MDR)-1, EGFR und VEGF beobachtet (Cadwell and Zambetti, 2001). Somit lassen sich die Effekte mutierter p53-Varianten in Tumorzellen auf mehrere wesentliche Wirkmechanismen zurückführen. Als Folgen werden eine Vielzahl von zellulären Funktionen *in vitro* und *in vivo* modifiziert. Hierzu zählen unter anderem die Inaktivierung des Spindelkontrollpunktes und Verlust der genomischen Stabilität (Gorunova et al., 1998) sowie vermehrte Tumorigenität, Invasivität, Metastasierung und geringe Reaktion auf Chemotherapie und Bestrahlung (Blandino et al., 1999; Li et al., 1998).

Im humanen Pankreaskarzinom liegt p53 in 50-70% der Fälle mutiert vor (Rozenblum et al., 1997). Allerdings konnte ein Zusammenhang zwischen p53-Expression und histopathologischen Befunden bislang nicht sicher dargestellt werden. Studien, die p53 als prognostischen Parameter untersucht haben, sind ebenfalls außerordentlich kontrovers geblieben und lassen gegenwärtig kein klares Bild erkennen, obwohl ein Zusammenhang mit kürzeren mittleren Überlebenszeiten gelegentlich beobachtet wurde (Dergham et al., 1998; Jeong et al., 2005; Nakamori et al., 1995; Yokoyama et al., 1994). Dabei treten p53-Mutationen beim Pankreaskarzinom erst in Läsionen auf, die bereits einen hohen Grad an Dysplasie aufweisen, so dass insbesondere eine Funktion für die Progression der Erkrankung angenommen wird. So wird eine Verbindung zur gut dokumentierten genomischen Instabilität des Pankreaskarzinoms hergestellt (Digiuseppe et al., 1994), die auch durch tierexperimentelle Ansätze unterstützt wird, in denen die Kombination von mutiertem p53 und onkogenem *K-ras* vermehrte genomische Instabilität und ein erhöhtes metastatisches Potential zur Folge hatte. Des Weiteren konnten Joo und Kollegen zeigen, dass die Detektion des mutierten p53 mit einer erhöhten VEGF-Expression korreliert (Joo et al., 2002).

Die meisten duktaalen Pankreaskarzinom-Zelllinien tragen eine p53-Mutation überwiegend in der DNA-Bindedomäne (Hollstein et al., 1994). Die Wiederherstellung der wt p53-Funktion in den Zellen war bereits das Ziel vieler Arbeitsgruppen, um zum einen die Auswirkungen des Wildtyp-Verlustes und zum anderen Ansatzpunkte für Therapiemöglichkeiten zu untersuchen. D. Lang und Kollegen etablierten zur stabilen wt p53-Rekonstitution ein Temperatur sensitives System in Panc-1-Zellen, bei dem sie nach der wt p53-Induktion in 60-70% der Zellen Apoptose bzw. einen G1-Arrest und in den restlichen Zellen einen nicht reversiblen Zellzyklusarrest auf Grundlage der Zellmorphologie beobachten konnten (Lang et al., 1998). Andere Arbeitsgruppen nutzten den Adenovirus vermittelten Gentransfer, um wt p53 zu reexprimieren. Dabei konnten Cascallo und Kollegen nach der wt p53-Expression einen G1-Zellzyklusarrest oder Apoptose in menschlichen Pankreasadenokarzinom-Zelllinien

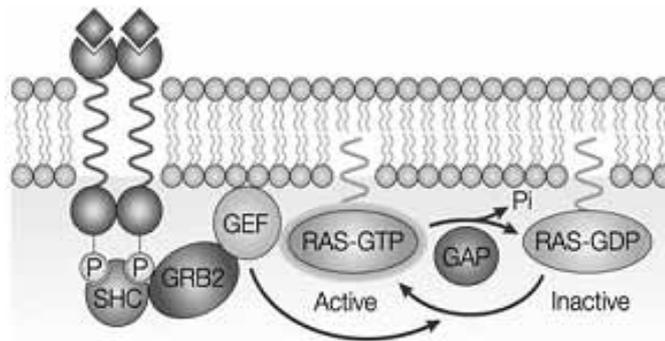
zeigen (Cascallo et al., 1999). Diese wt p53-Reaktion war jedoch abhängig vom genetischen Hintergrund der jeweiligen Zelllinie, wobei die Zellen durch Expression des Tumorsuppressors p16 zu einer Apoptosereaktion neigten. Ghaneh und Kollegen nutzten ein ähnliches System. Sie zeigten durch die wt p53-Rekonstitution ebenfalls eine Apoptoseinduktion in den Pankreaskarzinom-Zellen, aber unabhängig vom p16-Status (Ghaneh et al., 2001). Diese Arbeitsgruppe konnte eine Inhibition des Tumorwachstums nach wt p53-Gentransfer mit Hilfe des Adenovirus *in vivo* (Xenograft Maus, subkutan) beobachten.

## 1.2.2 Das Proto-Onkogen *K-Ras*

Das humane Homolog zum Proto-Onkogen *Kirsten-Rattensarkomvirus (K-Ras)* (Kirsten and Mayer, 1969) ist im menschlichen Organismus auf Chromosom 12p12.1 lokalisiert. Das Gen wird der Ras-Subfamilie, die noch *Harvey-* und *Neuroblastom-Ras* enthält, zugeordnet (Barbacid, 1987). Durch alternatives Spleißen entstehen die beiden jeweils 21 kDa großen Varianten *K-Ras2A (K-Ras4A)* und *K-Ras2B (K-Ras4B)* (Barbacid, 1987). Während *K-Ras2B* ubiquitär exprimiert wird (Watzinger et al., 1998), wird die *K-Ras2A*-Expression nur in Lunge, Leber und Niere detektiert (Wang et al., 2001). Die Isoformen der Ras-Familie sind sehr stark konserviert. Die Struktur der Proteine unterteilt sich in eine Bindedomäne für die Ras-Effektoren im N-Terminus (AS 32-40), eine anschließende GTPase-Funktionsdomäne (AS 86-165) und eine hypervariable Region im C-Terminus. In dem letzten Proteinsegment ist nur das CAAX-Motiv (C: Cystein, A: Aliphatische AS, X: Methionin oder Serin) am Ende des C-Terminus konserviert. Ras-Proteine werden für den Transport an die Zellmembran posttranslational prozessiert, da sie nur nach Bindung an die Zellmembran aktiv sind (Apolloni et al., 2000; Bar-Sagi, 2001; Choy et al., 1999).

### 1.2.2.1 Aktivierung und Funktionen von *K-Ras*

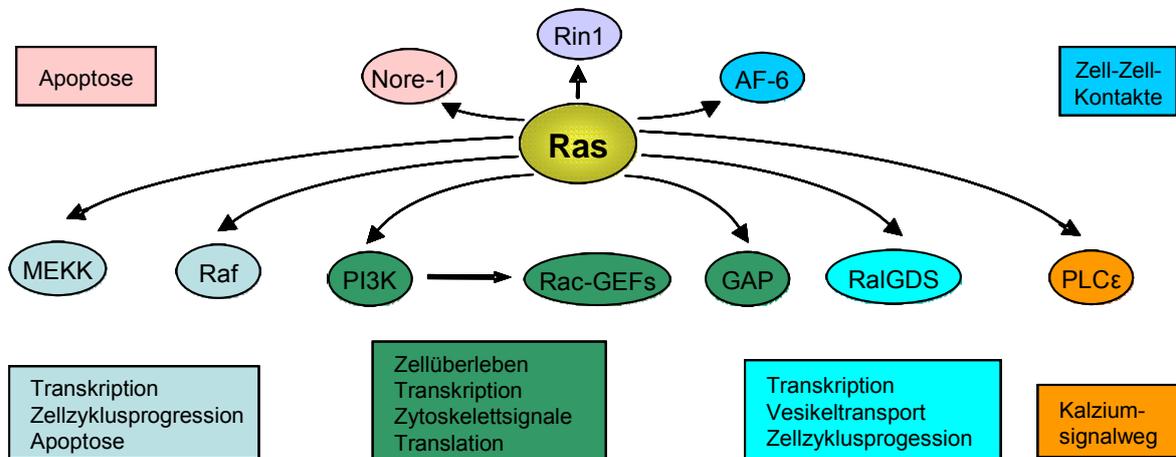
Die Ras-Superfamilie, zu der neben der Ras-Subfamilie noch fünf weitere Familien (Rho, Rab, Ran, Arf, Rad) gehören, beschreibt die Proteinklasse der kleinen GTPasen, deren Aktivität über den Austausch von gebundenem GDP gegen GTP reguliert wird. Dieser Austausch wird durch sogenannte *guanine-nucleotide exchange factors (GEFs)* stimuliert, die selbst durch eine Vielzahl von Zelloberflächenrezeptoren und intrazelluläre Signale aktiviert werden können (Ehrhardt et al., 2002; Reuther and Der, 2000). Durch die Hydrolyse von GTP zu GDP werden die Ras-Proteine inaktiviert, wobei GTPase aktivierende Proteine (GAPs) eine verstärkende Funktion besitzen (Bourne et al., 1990) (Abb. 4).



**Abb. 4: Aktivierungssignalweg von Ras**

Ras-Aktivierung ist durch den Kreislauf von GTP-Hydrolyse und Ersetzen von gebundenem GDP durch GTP gekennzeichnet. Der bekannteste Aktivierungsmechanismus umfasst die Komplexbildung von aktivierten, autophosphorylierten Wachstumsfaktor und Tyrosinkinase mit dem GEF SOS durch das Adaptorprotein GRB2 und eventuell SHC. Das resultiert in der Plasmamembranbindung von SOS, wo Ras lokalisiert ist (Downward, 2003).

Im aktivierten Zustand ist K-Ras in der Lage, an eine Vielzahl von Effektorenzymen, z.B. Raf, eine Phosphatidylinositol 3-Kinase-Untereinheit, Phospholipase C oder RAL zu binden und zu aktivieren. Durch diese verschiedenen *downstream* Effektoren nimmt aktiviertes K-Ras eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus, der Differenzierung, bei der Induktion von Seneszenz oder Apoptose und bei der Zelladhäsion ein (Crespo and Leon, 2000; Ehrhardt et al., 2002; Spandidos et al., 2002) (Abb. 5). Dabei ist es jedoch Zelltyp-abhängig, welcher Effektorweg durch K-Ras-Aktivierung initiiert wird (Shields et al., 2000).



**Abb. 5: Signalwege *downstream* von Ras**

Als zentrales Zellprotein übernimmt Ras verschiedene Aufgaben: Bindeglied zwischen extrazellulären Signalen und deren intrazellulärer Übertragung in den Zellkern, Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten, Bildung von Golgi-Transportvesikeln, Zytoskelettveränderungen, transkriptionelle und translationelle Prozesse, Zellzyklusprogression und Apoptoseregulation. (Downward, 2003; Malumbres and Pellicer, 1998)

K-Ras nimmt eine herausragende Stellung innerhalb der Ras-Familie ein und ist im Pankreasadenokarzinom häufig von Mutationen betroffen. Deshalb wird im nachfolgenden Abschnitt besonders auf seine Alterationen und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Entstehung des Pankreaskarzinoms eingegangen.

### 1.2.2.2 Das Onkogen *K-Ras* im Pankreaskarzinom

*K-Ras* ist in ca. 20% aller Karzinome mutiert (Khief et al., 1999), jedoch zeigt es mit nahezu 100% die höchste Rate an aktivierenden Mutationen in Pankreasadenokarzinomen (Friess et al., 1996; Sirivatanauksorn et al., 1998). Dies macht das Pankreaskarzinom zur Tumorentität mit der höchsten Prävalenz an *Ras*-Mutationen. Häufig betreffen Einzel-Basenpaar-Mutationen Kodon 12 des *K-Ras*-Gens, wodurch es zum Austausch der Aminosäure Glycin (GGT) durch Asparaginsäure (GAT) oder Valin (GTT) kommt (Abrams et al., 1993; Almoguera et al., 1988). Doch auch die weniger häufigen Mutationen in den Kodons 13 und 61 zeigen Funktionsänderungen (Bos, 1989; Cerny et al., 1992). *Ras*-Mutationen resultieren in einem Verlust der GTPase-Aktivität und somit in konstitutiver Aktivierung (Downward, 2003; Scheffzek et al., 1998; Trahey and McCormick, 1987). Entsprechend werden auch *downstream* gelegene *Ras*-Effektoren unabhängig von physiologischen Aktivierungssignalen reguliert, was beispielsweise eine Wachstumsfaktor-unabhängige Zellzyklusprogression ermöglicht (Shields et al., 2000). Zur Induktion eines voll transformierten Phänotyps wird aber neben der konstitutiven *Ras*-Aktivierung noch eine zweite Alteration benötigt. In Primärzellen wird zur Transformation zusätzlich ein immortalisierendes Onkogen wie *c-myc* oder die Inaktivierung eines Tumorsuppressors wie eine *p16*-Deletion benötigt, da ansonsten durch die *Ras*-Aktivität Seneszenz oder Zellzyklusarrest ausgelöst wird (Malumbres and Pellicer, 1998). Eine erhöhte *Ras*-Aktivität führt unter anderem zu einer gesteigerten Expression der Zellzyklusinhibitoren p16 (Serrano et al., 1995) und p21 (Michieli et al., 1996). Mutiertes *K-Ras* fördert über verschiedene *downstream* Signalwege ebenfalls die Tumorangiogenese, indem es

- i) die Produktion pro-angiogener Faktoren wie VEGF, EGF stimuliert,
- ii) die Produktion anti-angiogener Faktoren wie Tsp-1, Ang-1 hemmt und
- iii) die Freisetzung der pro-angiogenen Faktoren durch Degradation der extrazellulären Membran mittels Aktivierung der MMP-2 und -9 gewährleistet (Kranenburg et al., 2004). Des Weiteren könnte eine *K-Ras*-Mutation auch eine Rolle auf die Erfolgsaussichten der Bestrahlungstherapie haben. So sprechen Pankreaskarzinom-Patienten ohne *K-Ras*-Mutation besser auf Bestrahlung an und haben eine erhöhte mittlere Überlebensrate als Patienten mit mutiertem *K-Ras* (Dergham et al., 1998).

Bei Patienten werden die meisten Mutationen in Kodon 12 festgestellt. Entsprechend tragen auch die meisten Pankreaskarzinom-Zelllinien eine aktivierende *K-Ras*-Mutation in Kodon 12 (Moore et al., 2001; Sipos et al., 2003). Obschon diese *K-Ras*-Mutationen bereits lange bekannt sind, sind die spezifisch durch *K-Ras* vermittelten transformierenden Effekte aber lange Zeit unklar geblieben. Um dies experimentell aufzuklären, wurden pharmakologische

Inhibitoren, wie der Farnesyltransferase-Inhibitor (FTI), zur Hemmung der Aktivität angewendet. Dabei inhibierte FTI in Pankreasadenokarzinom-Zelllinien das Zellwachstum. Zur Untersuchung der anti-Tumorwirkung wurden verschiedene *in vivo*-Tierexperimente mit und ohne FTI-Gabe durchgeführt, wobei das Tumorwachstum durch den K-Ras-Inhibitor komplett unterdrückt bzw. gravierend gegenüber der Kontrollgruppe reduziert wurde (Weisz et al., 1999). Neuere Ansätze nutzten den sequenzspezifischen RNA-Abbau durch *small interfering* RNA (siRNA). Der *K-Ras*-Knockdown verursachte eine Hemmung des Zellwachstums von Capan-1-Zellen (Brummelkamp et al., 2002) bzw. eine Apoptose-Induktion in MiaPaCa-2-Zellen (Wang et al., 2005). Ebenso wie die Anwendung eines K-Ras-Inhibitors führte der Knockdown dieses Gens zur kompletten Unterdrückung der Tumorentwicklung *in vivo* (Brummelkamp et al., 2002).

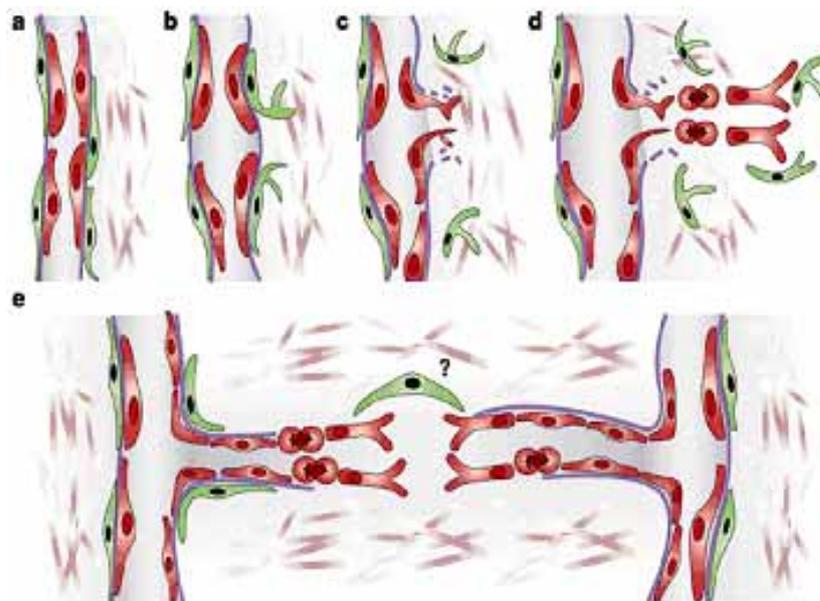
### 1.3 Tumorangiogenese

In guter Übereinstimmung mit der klinisch bekannten frühen Metastasierung von Pankreaskarzinomen (Hezel et al., 2006) zeigen selbst kleine Primärtumore des Pankreas im Allgemeinen bereits perineurale und lympho-vaskuläre Invasion. Zudem sind die Pankreaskarzinome in den epithelialen Anteilen gut vaskularisiert (Von Marschall et al., 2005). Basierend auf diesen Befunden sind in den vergangenen Jahren die tumorbiologische Bedeutung der Angiogenese für das Pankreaskarzinom sowie die Möglichkeit anti-angiogener Therapieansätze intensiv erforscht worden.

Die Bedeutung der Tumorneoangiogenese für das Wachstum solider Tumore darf inzwischen als gesichert angesehen werden. Für ein erfolgreiches Tumorwachstum (> 2 mm) und für den Metastasierungsprozess ist es essentiell, dass der Tumor einen Anschluss an das Gefäßsystem des Organismus erhält. Da ab dieser Größe die Diffusionsstrecke für eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen aus bereits bestehenden Kapillaren zu lang wird, tritt in den Tumorzellen Hypoxie, Azidose und Hypoglykämie auf. Diese Faktoren initiieren die Produktion pro-angiogener Wachstumsfaktoren und verschieben so die Balance zwischen pro-angiogenen, wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*)-A, Mitglieder der FGF (*fibroblast growth factor*)-Familie, Angiogenin, TGF (*transforming growth factor*)- $\alpha$  und  $\beta$ , PDGF (*platelet-derived growth factor*), TNF (*tumor necrosis factor*)- $\alpha$  und Angiopoietine und anti-angiogenen (z.B. Angiostatin, Endostatin, Tsp-1) Faktoren zu Gunsten der Angiogeneseinitiation („Angiogenic Switch“) (Bergers and Benjamin, 2003). Ebenfalls verursachen genetische Veränderungen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen während der Tumorigenese eine gesteigerte Expression und Freisetzung pro-angiogener Faktoren (Rak et al., 2000). Infolge des „Angiogenic Switch“ ist eine verstärkte Neubildung

von Gefäßen zu beobachten. Im Folgenden wird die Bildung von Blut- und Lymphgefäßen unterschieden.

Unter physiologischen Bedingungen tritt die Gefäßneubildung im adulten Organismus nur an Orten des Wachstums oder der Neubildung von Geweben zur Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität auf. Während die physiologische Angiogenese (z.B. Wundheilung, Entzündung und Menstruation) strikt reguliert wird, kommt es in pathologischen Situationen häufig zu übermäßig verstärkter Blutgefäßneubildung (Carmeliet and Jain, 2000; Ferrara, 2001; Marme, 1999). Blutgefäße entstehen durch Längsteilung vorhandener Gefäße (Intussuszeption) oder durch Einsprossung feiner Kapillaren vom Tumor nahe gelegenen Gefäßen (Carmeliet and Jain, 2000). Durch die Ausschüttung proangiogener Faktoren aus Tumor-, Endothel- und/oder Stromazellen wird die Angiogenese initiiert (Fischer und Berger, 2003). Zunächst erfolgt der lokale Abbau der Basalmembran durch verschiedene MMPs (Stetler-Stevenson, 1999). Nachfolgend kommt es zur Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen (Munoz-Chapuli et al., 2004), bis schließlich aus Fibronektin, Kollagen und weiteren Komponenten eine neue Basalmembran gebildet wird und glatte Muskelzellen das neugebildete Gefäß umgeben (Abb. 6).



**Abb. 6: Blutgefäßentstehung**

a) vorhandenes Blutgefäß, von dem aus neue Gefäße in den Tumor einwachsen b) Perizyten (grün) lösen sich ab, dort weitet sich das Gefäß bevor die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix aufgelöst werden c) Endothelzellen (rot) migrieren in den perivaskulären Raum in Richtung angiogener Stimuli d) Endothelzellen proliferieren, werden dabei von den Perizyten in eine Richtung dirigiert e) Endothelzellen verbinden sich und formen ein Lumen, was mit dem Aufbau einer Basalmembran und der Perizyten-Anheftung einhergeht, aber dieser Prozess ist noch nicht komplett geklärt (Bergers and Benjamin, 2003).

Auf diese Weise entsteht ein verzweigtes primär vaskuläres Netzwerk (Flamme et al., 1995). Diese Art der Gefäßbildung wird auch als Vaskulogenese bezeichnet (Risau and Flamme,

1995). Die mit malignem Tumorwachstum und Metastasierung assoziierte Neoangiogenese weist oftmals eine direkte Korrelation zwischen Gefäßdichte, Grad der Metastasierung und damit der Prognose auf (Weidner et al., 1991).

Auch die Lymphangiogenese wird ähnlich wie die Hämangiogenese durch vom Tumor sezernierte Faktoren initiiert. Lymphgefäße bestehen ebenfalls aus einer Endothelzellschicht und einer umgebenen glatten Muskulatur, weisen jedoch im Unterschied zu den Blutgefäßen eine diskontinuierliche Basalmembran und das Fehlen von *tight junctions* auf, so dass sie permeabel für Interstitialflüssigkeit (enthält Proteine, Flüssigkeiten, Zellen) sind. Weiterhin sind Lymphgefäße in einem wesentlich weniger komplexen Netzwerk organisiert (Karkkainen et al., 2001; Pepper, 2001). Erst mit der Identifizierung Lymphgefäß-spezifischer Marker wie Lyve-1 (*lymphatic vascular endothelial cell marker-1*) (Banerji et al., 1999) ist inzwischen eine sichere immunhistochemische Erkennung von Lymphgefäßen möglich geworden.

Durch die Ausschüttung pro-lymphangiogener Faktoren invadieren entweder Zellen von präexistenten Lymphgefäßen in den sich ausbreitenden Tumor ein oder eine Neubildung von Lymphgefäßen setzt ein (Papoutsi et al., 2000). Weiterhin wird vermutet, dass eine starke Hämangiogenese indirekt die Ausbreitung von Tumorzellen in Lymphgefäße unterstützt (Partanen and Paavonen, 2001). Oftmals werden vergrößerte peritumorale Lymphgefäße beobachtet, die vermutlich im Unterschied zu den intratumoralen Lymphgefäßen für Metastasierungsprozesse verantwortlich sind (Beasley et al., 2002; Padera et al., 2002).

Obschon die Regulation der Lymphangiogenese bislang nur unvollständig verstanden ist, konnten mit VEGF-C und -D und ihrem Rezeptor VEGFR-3 bereits pro-lymphangiogene Faktoren charakterisiert werden, die nun erlauben, die Prozesse der Lymphangiogenese und der lymphogenen Metastasierung auch funktionell zu charakterisieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Studien dokumentieren klar einen funktionellen Zusammenhang zwischen Lymphangiogenese und lymphogener Metastasierung (Keleg et al., 2003). Dieser Zusammenhang konnte auch für das Pankreaskarzinom bereits untermauert werden. So wird in Tumorproben sowohl eine Überexpression von VEGF-C als auch von VEGF-D beobachtet, die im Falle von VEGF-C mit erhöhter Lymphgefäßdichte und auch klinisch mit vermehrter lymphogener Metastasierung assoziiert ist (Tang et al., 2001). Ebenfalls ist bei gesteigerter Lymphgefäßdichte infolge experimenteller Überexpression von VEGF-D in subkutanen Xenografttumoren eine vermehrte lymphogene Ausbreitung gefunden worden (Von Marschall et al., 2005).

## 1.4 Tiermodelle

Tiermodelle sind ein wichtiges Mittel zur Ursachen- und Therapieerforschung humaner Tumorerkrankungen und spielen eine große Rolle zur Beurteilung von Risikofaktoren und präventiven bzw. therapeutischen Modalitäten. Prinzipiell benötigt der tierexperimentelle Ansatz Modelle, die dem menschlichen Tumor in der Morphologie, den klinischen und den biologischen Aspekten sehr ähnlich sind (Standop et al., 2001). Die ersten Studien zur Tumorprogression des Pankreaskarzinoms umfassten die Gabe oder Injektion von selektiven Pankreaskarzinogenen (z.B. Nitrosaminen, Azaserin, Benzopyrene) an kleinen Nagetieren wie Ratte, Hamster oder Maus (Standop et al., 2001). Diese Modelle eignen sich zur Untersuchung von Nahrungsmittel- und Umwelteinflüssen auf die Tumorentstehung bis hin zur Streuung der Tumorzellen im Organismus. Einige dieser durch Karzinogene verursachten Tumore zeigen histologische Ähnlichkeit mit dem humanen Karzinom und weisen Metastasierung auf. Jedoch fehlt in der Regel die für die humane Erkrankung charakteristische Kombination genetischer Veränderungen in den Zellen und die daraus resultierenden Änderungen in der Aktivierung biochemischer Signalwege (Bardeesy et al., 2001).

Die Möglichkeit, transgene Tiere mit Veränderungen in der Keimbahn zu generieren, schaffte die Grundlage neuer Pankreaskarzinom-Modelle (Jaenisch, 1988). Anwendung fand diese Technologie vor allem in Mäusen. Veränderungen im SV40 T-Antigen (Hager and Hanahan, 1999) und in H-Ras (Quaife et al., 1987) führten zur Bildung von Pankreaskarzinomen des Azinarzelltyps. Ein besonders erwähnenswertes Mausmodell ist die Expression von TGF- $\alpha$  unter einem Elastase-Promotor in einem p53 mutierten Hintergrund, da es einige histologische Merkmale der humanen Krankheit, wie die Duktzell-Morphologie und die Expression Duktzell-spezifischer Marker, widerspiegelt (Wagner et al., 2001). Die Rolle von Onkogenen wurde auch unter Nutzung des induzierbaren Systems in transgenen Tieren verwendet, um den Einfluss auf die Tumorigenität festzustellen (Bardeesy et al., 2001; Bujard, 1999; Ryding et al., 2001). Bei diesen Ansätzen mit einem gewebespezifischen Promotor durchlaufen nur bestimmte Zelltypen Veränderungen, wobei der restliche Organismus unbetroffen ist. Das stellt die Erhaltung der physiologischen Tumor-Host-Interaktion sicher (Bardeesy et al., 2001).

Eine weitere Möglichkeit, Pankreastumore im Tier zu studieren, stellt das Xenograft-Modell dar. Dafür werden immundefizienten Mäusen menschliche Tumorzellen oder -gewebe orthotop (in das Zielorgan) oder ektopisch (außerhalb des Zielorgans) injiziert (Shi and Xie, 2000). Aufgrund seiner hohen biologischen Vergleichbarkeit mit der humanen Krankheit eignet sich das Modell der Zellimplantation besonders für Untersuchungen zu Wachstum,

Metastasierungsverhalten und Therapiemöglichkeiten (Sharkey and Fogh, 1984; Shimosato et al., 1976). Dabei spiegelt die orthotope Zellimplantation das Verhalten und die Symptome eines humanen Tumors eher wider als das subkutane Modell. Dies wurde nicht nur für Pankreaskarzinom-Zellen sondern auch für kolorektale Tumorzellen, Nierenkarzinomzellen, Melanomzellen und Lungentumorzellen gezeigt (Fidler et al., 1991; Fidler, 1991; Kameya et al., 1976; Outzen and Custer, 1975; Sharkey and Fogh, 1984; Stanbridge and Perkins, 1976). Speziell die orthotope Zellimplantation in den Pankreas erreicht ein extensives Tumorwachstum, eine Invasion in das umliegende Gewebe und sowohl eine lokale als auch distale Metastasierungen, was den Charakteristika des humanen Pankreasadenokarzinoms entspricht (Alves et al., 2001b; Tan and Chu, 1985). Des Weiteren stellt vermutlich die Tumor-Stroma-Interaktion, wie sie beim orthotopen Modell gegeben ist, eine wichtige Voraussetzung für die Expression von Wachstumsfaktoren dar und könnte einen Einfluss auf die Reaktion des Tumors auf Chemotherapeutika nehmen (Alves et al., 2001b; Fidler, 1995).